



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารบ่งชี้มะเร็งโดยการฟังก์ชันทองนาโนไวร์ร่วมกับไคโตซานเชื่อมไขว้คาร์บอนนาโนทิวบ์

The immunosensors development for tumor marker based on functionalization of gold nanowires-chitosan cross linked carbon nanotube

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2559
จำนวน 256,300 บาท

หัวหน้าโครงการ ธาณินทร์ แต่งกวารัมย์

ผู้ร่วมโครงการ จิราภรณ์ กิตติกุล
ติก อัยรัมย์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
1 กันยายน 2560

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุน
ทุนอุดหนุนวิจัย ประจำปี 2559

ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี และสาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่ให้
ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณโรงพยาบาลสันทราย ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือด

ขอขอบคุณ Dr. Supachai Sakkhachornphop คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ในความกรุณาสอบเทียบอิมมูโนเซนเซอร์กับผลทางฟลูออเรสเซนส์

คณะผู้วิจัย

การพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารบ่งชี้มะเร็งโดยการฟังก์ชัน
ทองคำนาโนไวร์ร่วมกับไคโตซานเชื่อมไขว้คาร์บอนนาโนทิวบ์
The immunosensor development for tumor marker based on
functionalization of gold nanowires-chitosan
cross linked carbon nanotube

ธานินทร์ แดงกวารัมย์ จิราภรณ์ กิติกุล และ ตึก อู๋รัมย์
Tanin Tangkuaram, Jiraporn Kitikul and Tik Ouiram

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารบ่งชี้มะเร็งโดยการฟังก์ชันทองคำนาโนไวร์ร่วมกับไคโตซานเชื่อมไขว้คาร์บอนนาโนทิวบ์ ประกอบด้วยงานวิจัย 2 ส่วนดังนี้

1. การประดิษฐ์เซนเซอร์ทางเคมีสำหรับตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ทำขึ้นโดยการเชื่อมไขว้ไคโตซานกับคาร์บอนนาโนทิวบ์ ทองคำนาโนไวร์ และไทโอโนนบนขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน โดยการเคลือบลงบนขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน ไทโอโนนจะทำงานร่วมกับไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวบ์โดยทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนทำให้เซนเซอร์ทางเคมีมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากการใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีในการติดตาม โดยสามารถตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับต่ำ ๆ ได้ การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเซนเซอร์นี้ใช้เทคนิคแอมเพโรเมตรี โดยใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ -0.45 โวลต์ พบช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 10 ไมโครโมลาร์ ถึง 5 มิลลิโมลาร์ มีขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ที่ 3.79 ไมโครโมลาร์ เซนเซอร์ดัดแปรแสดงความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทันที มีความไวสูงถึง 41.80 ไมโครแอมป์ต่อมิลลิโมลาร์ และมีความเลือกเฉพาะที่ดีต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยไม่มีผลจากสารรบกวนที่เลือกมาใช้ในการทดสอบได้แก่ กรดแอสคอร์บิก กลูโคส โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไนเตรต โซเดียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ กรดยูริก คาเฟอีน และกรดออกซาลิก มีอายุการใช้งานที่ยาวนานถึง 68 ครั้ง มีค่าการวัดซ้ำ 5.89 เปอร์เซ็นต์อาร์เอสดี มีค่าการผลิตซ้ำ 1.10 เปอร์เซ็นต์อาร์เอสดี เซนเซอร์นี้สามารถนำไปตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างยา ย้อมผม น้ำยาบ้วนปาก น้ำยาล้างแผล และน้ำผลไม้ ผลจากการตรวจวิเคราะห์พบว่าเซนเซอร์นี้ให้ผลที่ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2. การประดิษฐ์แอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารบ่งชี้มะเร็ง ทำโดยการนำประติสัมพันธ์ไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าขั้วไฟฟ้ามีความหนา 150 นาโนเมตร ตัวแปรต่าง ๆ ในการปรับปรุงขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE โดยทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี มีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ให้ เท่ากับ -0.30 โวลต์ ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีน เท่ากับ 75 นาโนกรัม ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์เท่ากับ 80 ไมโครกรัม ปริมาณของทองคำนาโนไวร์เท่ากับ 100 ไมโครกรัม และปริมาณของไทโอนีนเท่ากับ 80 ไมโครกรัม การหาคุณลักษณะของแอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์พบว่ามีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 15 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0.1 – 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีอายุการใช้งาน 15 ครั้ง

เมื่อทำการทดสอบในตัวอย่างเลือดเพื่อหาแอลฟาฟิโตโปรตีนโดยวิธีเดิมสารมาตรฐานพบว่าสามารถทดสอบกับตัวอย่างเลือดได้ และเมื่อนำไปสอบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (ELISA-fluorescence) พบว่าอิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการวิเคราะห์ทั้งความแม่นยำและความเที่ยงไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

คำสำคัญ: แอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ คาร์บอนนาโนทิวบ์ ทองนาโนไวร์

Abstract

The development of immunosensors for determination of tumor marker using the gold nanowire functionalized chitosan-carbon nanotube was constructed. This work was composed of 2 parts, following:

1. The fabrication of hydrogen peroxide sensor has been constructed based on cross-linking chitosan with carbon nanotube (CHIT-CNT), gold nanowire (AuNW) and thionine (Th) by coating on a glassy carbon electrode (CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE). Thionine was employed in the matrix of CHIT-CNT to establish a highly effective chemical sensor for low-level hydrogen peroxide determination since it acted as an electron transfer mediator that could be seen in the cyclic voltammograms. The analytical specification of this sensor was studied by an amperometric technique at a constant potential of -0.45 V. Linear calibration was obtained from 10 μM to 5 mM with a detection limit of 3.79 μM . The modified sensor exhibited excellent electrocatalytic activity, fast amperometric response, high sensitivity (41.80 $\mu\text{A mM}^{-1}$) and good selectivity for hydrogen peroxide. Selected interferences such as ascorbic acid, glucose, potassium chloride, potassium nitrate, sodium sulfate, sodium chloride, uric acid, caffeine and oxalic acid were not affected by the analytical signal. This sensor showed long life time usage (68 times), with repeatability and reproducibility at 5.89 and 1.10 % RSD, respectively. Hair dyes, mouthwashes, antiseptic formulation and juices samples were selected to test the detective ability of this developed sensor and

showed no different significant results to the standard method at a confidence level of 95 %.

2. The fabrication of alpha fetoprotein immunosensors was constructed based on the functionalization of gold nanowires-chitosan cross linked carbon nanotube covered by the anti alpha fetoprotein on glassy carbon electrode (CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE). The fabricated film was characterized using scanning electron microscope and the thickness was found to be 150 nm. Optimization parameters of applied potential, amount of anti alpha fetoprotein, amount of carbon nanotube, amount of nanowires and amount of thionine were done with the value of -0.30 V, 75 ng, 80 μg , 100 μg and 80 μg , respectively. The linearity was found to be 0.1 – 10 ng mL⁻¹ with the limit of detection of 15 pg mL⁻¹ and with the life time usage of 15.

This alpha fetoprotein was applied for the determination of tumor marker in real blood samples. The results were tested with the standard method (ELIZA-fluorescence). There were not significantly different for both accuracy and precision of this immunosensors compared to the ELIZA-fluorescence method.

Keywords: Alpha fetoprotein immunosensors, Hydrogen peroxide biosensor, Carbon nanotube, Gold nanowires

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ง
Abstract	จ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อและสัญลักษณ์	ฐ
บทนำ.....	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
อุปกรณ์และวิธีการ	7
การประดิษฐ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์	9
การประดิษฐ์แอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์.....	19
ผลการวิจัยและวิจารณ์	27
การประดิษฐ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์	27
อัลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์	46
สรุปผลการวิจัย.....	72
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์	72
แอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์	74
เอกสารอ้างอิง.....	75
ผลลัพธ์ที่ได้	80
International proceedings	81

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 หลักการทำงานของอิมมูโนเซนเซอร์	3
รูปที่ 2 ไดอะแกรมของไบโอเซนเซอร์.....	4
รูปที่ 3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ทองคำนาโนไวร์.....	11
รูปที่ 4 การเตรียมขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน.....	12
รูปที่ 5 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT/GCE.....	12
รูปที่ 6 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW/GCE.....	13
รูปที่ 7 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE.....	14
รูปที่ 8 การจัดเซลล์สำหรับทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี.....	14
รูปที่ 9 การจัดเซลล์สำหรับทดสอบด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี	15
รูปที่ 10 การเตรียมขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน	19
รูปที่ 11 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE	20
รูปที่ 12 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-anti AFP/GCE.....	20
รูปที่ 13 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-anti AFP/GCE	21
รูปที่ 14 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE.....	21
รูปที่ 15 การจัดเซลล์สำหรับทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี	22
รูปที่ 16 การจัดเซลล์สำหรับทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมตรี.....	22
รูปที่ 17 รูป SEM ของทองคำนาโนไวร์ โดย (ก) กำลังขยาย 5,000 เท่า และ (ข) กำลังขยาย 25,000 เท่า.....	27
รูปที่ 18 สเปกตรัมจากเครื่อง EDX ของทองคำนาโนไวร์	27
รูปที่ 19 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนเปลือย (Bare GCE).....	28
รูปที่ 20 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT/GCE	29
รูปที่ 21 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW/GCE	30
รูปที่ 22 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE	31
รูปที่ 23 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าต่าง ๆ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์.....	32
รูปที่ 24 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT- AuNW-Th/GCE ตรวจวัด ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	33
รูปที่ 25 กลไกการทำงานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ที่เกิดผ่านขั้วไฟฟ้าทำงานที่ดัด แปรโดยคาร์บอนนาโนทิวบ์ โคโคซาน ทองคำนาโนไวร์ และไทโอนีน.....	34

รูปที่ 26 กลไกการทำงานของไทโอนีนที่เกิดผ่านชีวไฟฟ้าทำงาน	34
รูปที่ 27 ผลของศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	35
รูปที่ 28 ผลของความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในการดัดแปรชีวไฟฟ้า.....	36
รูปที่ 29 ผลของความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์ที่ใช้ในการดัดแปรชีวไฟฟ้า.....	36
รูปที่ 30 ผลของความเข้มข้นของไทโอนีนที่ใช้ในการดัดแปรชีวไฟฟ้า.....	37
รูปที่ 31 แอมเพโรแกรมของชีวไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ที่มีการเติม สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	38
รูปที่ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่ ความเข้มข้น 10 – 5,000 ไมโครโมลาร์.....	39
รูปที่ 33 แอมเพโรแกรมของชีวไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE.....	42
รูปที่ 34 ผลการศึกษาอายุการใช้งาน	43
รูปที่ 35 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของสารบนชีวไฟฟ้า CNTs- CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	46
รูปที่ 36 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อวัดความหนาของสารที่ตรึงบนชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE.....	46
รูปที่ 37 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของชีวไฟฟ้ากลาสคาร์บอนเปลือย (Bare GCE).....	47
รูปที่ 38 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของชีวไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE	48
รูปที่ 39 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-anti AFP/GCE	49
รูปที่ 40 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของชีวไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-anti AFP/GCE.....	50
รูปที่ 41 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE.....	51
รูปที่ 42 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	52
รูปที่ 43 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัด AFP ของ ชีว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	53
รูปที่ 44 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนที่ใช้ ในการตรึงบนชีว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	54
รูปที่ 45 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในการ ตรึงบนชีว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	55
รูปที่ 46 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับปริมาณของทองคำนาโนไวร์ในการตรึงบนชีว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE.....	56
รูปที่ 47 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับปริมาณของไทโอนีนที่ใช้ในการตรึงบนชีว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE.....	57

รูปที่ 48 โครโนแอมเพโรแกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ทดสอบกับ AFP ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์.....	58
รูปที่ 49 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโดโปรตีนกับกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	58
รูปที่ 50 โครโนแอมเพโรแกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ทดสอบกับ AFP ที่ความเข้มข้น 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์	59
รูปที่ 51 กราฟระหว่างจำนวนครั้งที่วิเคราะห์เทียบกับเปอร์เซ็นต์การลดลงของกระแสเมื่อเทียบกับครั้งแรกของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	60
รูปที่ 52 โครโนแอมเพโรแกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ทำการวัดซ้ำทั้งหมด 7 ซ้ำ.....	61
รูปที่ 53 โครโนแอมเพโรแกรมของการศึกษาสารบวกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE.....	64
รูปที่ 54 โครโนแอมเพโรแกรมของการศึกษาสารบวกลูคาเฟอีน ($C_8H_{10}N_4O_2$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE	64
รูปที่ 55 โครโนแอมเพโรแกรมของการศึกษาสารบวกลูโดปามีน ($C_8H_{11}NO_2$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE	65
รูปที่ 56 โครโนแอมเพโรแกรมของการศึกษาสารบวกลูกรดยูริก ($C_5H_4N_4O_3$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE	65
รูปที่ 57 โครโนแอมเพโรแกรมของการศึกษาสารบวกลูแอสคอร์บิก ($C_6H_8O_6$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE	66
รูปที่ 58 โครโนแอมเพโรแกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE ที่ทดสอบกับฉีดสารบวกลู	66
รูปที่ 59 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโดโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่างเลือด ตัวอย่างที่ 1 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	67
รูปที่ 60 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโดโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่างเลือด ตัวอย่างที่ 2 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	68

รูปที่ 61 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่าง เลือด ตัวอย่างที่ 3 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	68
รูปที่ 62 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่าง เลือด ตัวอย่างที่ 4 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	69
รูปที่ 63 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่าง เลือด ตัวอย่างที่ 5 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	69
รูปที่ 64 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่าง เลือด ตัวอย่างที่ 6 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE	70

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ตารางที่ 2 สารเคมีและวัสดุ.....	7
ตารางที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	8
ตารางที่ 4 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์.....	38
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัดของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์กับงานวิจัยอื่น ๆ.....	39
ตารางที่ 6 การศึกษาการวัดซ้ำ (Repeatability).....	40
ตารางที่ 7 ผลการศึกษาค่าการประเมินซ้ำ (Reproducibility)	40
ตารางที่ 8 ผลการศึกษาสารรบกวน	41
ตารางที่ 9 อายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้า.....	43
ตารางที่ 10 ผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2 ในตัวอย่าง โดยขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE เทียบกับเครื่อง Spectrophotometer.....	45
ตารางที่ 11 การศึกษาการวัดซ้ำ (Repeatability).....	61
ตารางที่ 12 ผลการศึกษาค่าการประเมินซ้ำ (Reproducibility)	62
ตารางที่ 13 เปรียบเทียบคุณลักษณะของอิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาได้กับงานวิจัยอื่น	63
ตารางที่ 14 ผลการตรวจวัด AFP ในตัวอย่างเลือดโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่ปรับปรุง เทียบกับผลจากเครื่องมือมาตรฐาน	70
ตารางที่ 15 ค่าทางสถิติ t-test ระหว่างผลการตรวจวัด AFP ในตัวอย่างเลือดโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่ปรับปรุง เทียบกับผลจากเครื่องมือมาตรฐาน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	71
ตารางที่ 16 ค่าทางสถิติ F-test ระหว่างผลการตรวจวัด AFP ในตัวอย่างเลือดโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่ปรับปรุง เทียบกับผลจากเครื่องมือมาตรฐาน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	71
ตารางที่ 17 สภาวะและคุณลักษณะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์.....	73
ตารางที่ 18 สภาวะและคุณลักษณะของแอลฟาฟิโดโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์.....	74

คำย่อและสัญลักษณ์

AFP	Alpha fetoprotein
Anti AFP	Anti alpha Fetoprotein
AuNW	Gold nanowires
Bare GCE	Bare glassy carbon electrode
CHIT	Chitosan
CL	Confidence level
CNT	Carbon nanotube
ELIZA	Enzyme linked immunosorbent assay
g cm^{-3}	Gram per cubic centimeter
LOD	Limit of detection
ng mL^{-1}	Nanogram per milliliter
M	Molar
mL	Milliliter
mV	Millivolt
M.W.	Molecular weight
ppm	Part per million
s	Second
Th	Thionine
μL	Microliter
V	Volt

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ในศตวรรษที่ 21 ประเทศไทยอยู่ในช่วงเวลาที่ต้องเผชิญกับสถานการณ์ทางเศรษฐกิจและสังคมที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของประชากรที่อยู่ในสภาวะสังคมของผู้สูงอายุอันเนื่องมาจากอัตราการเกิดของประชากรลดลง จากรายงานของปีทมาและปราโมทย์ [1] พบว่าโครงสร้างอายุของประชากรเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัดเจน หากดูที่จำนวนประชากร เด็กอายุต่ำกว่า 15 ปี ในช่วงปี พ.ศ. 2548 – 2578 จะมีจำนวนลดลงจาก 14 ล้าน (ร้อยละ 23 ของประชากรทั้งหมด) เหลือ 9 ล้านคนเศษ (ร้อยละ 14) ส่วนประชากรวัยแรงงาน (อายุ 15 – 59 ปี) นั้นมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย กล่าวคือในช่วง พ.ศ. 2548 – 2558 จำนวนจะเพิ่มขึ้นจาก 41 ล้าน เป็น 43 ล้านคน หลังจากนั้นจะลดจำนวนลงเหลือ 38 ล้านคนในปี พ.ศ. 2578 การที่จำนวนประชากรในระดับมัธยมศึกษาที่เป็นประชากรที่สำคัญในการพัฒนาประเทศลดน้อยลง ก่อปรกับประชากรวัยทำงานที่เป็นกำลังหลักของประเทศกำลังจะกลายเป็นผู้สูงวัยในอีก 10 ปีข้างหน้าจะมีจำนวนสูงทำให้มีผลกระทบต่อการพัฒนาของประเทศไทยในอีก 1-2 ทศวรรษข้างหน้าอย่างมาก

การพัฒนาทางด้านการแพทย์มีการพัฒนาแบบก้าวกระโดด อันเป็นผลเนื่องมาจากความก้าวหน้าของนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวเคมี ทำให้ผู้สูงวัยมีอายุยืนยาวขึ้นแต่ก็ต้องแลกกับตรวจร่างกายและการรักษาที่มีค่าใช้จ่ายสูงขึ้นตามสภาพเศรษฐกิจเนื่องมาจากการรักษาที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่มีความจำเป็นต้องดูแลอย่างใกล้ชิด ทำให้ประเทศต้องนำเข้าอุปกรณ์ครุภัณฑ์ เวชภัณฑ์และเครื่องมือทางการแพทย์ และมีแนวโน้มที่จะมากขึ้นทุก ๆ ปี ในปัจจุบันรัฐบาลต้องการให้ประชาชนมีการดูแลและรักษาสุขภาพของตนให้มีสุขภาพแข็งแรง หากมีการส่งเสริมให้ประชาชนสังเกตและตรวจความผิดปกติของร่างกายตนโดยอาศัยความรู้และมีอุปกรณ์ราคาถูกลง มีความเชื่อถือ จะส่งผลให้ประเทศประหยัดงบประมาณและนำไปสู่การเตรียมความพร้อมของการเข้าสู่สังคมผู้สูงวัยในอนาคตอันใกล้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังจะทำให้ประหยัดงบประมาณของประเทศอย่างมหาศาล

ในปัจจุบัน โรคนีื้องอก (Tumor) เป็นสาเหตุหนึ่งที่จะก่อให้เกิดการลุกลามไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง (Cancer) ซึ่งมักจะพบมากในผู้สูงอายุ ในสมัยก่อนมีความเชื่อกันว่าโรคมะเร็งรักษาไม่ได้ หากเป็นแล้วมักจะเสียชีวิตภายในระยะเวลาอันสั้น ที่ความเชื่อดังกล่าวเป็นจริงเพราะผู้ป่วยโรคมะเร็งมักมาพบแพทย์เมื่ออยู่ในระยะที่เป็นมากแล้วทำให้ต้องเสียชีวิต แต่ในความเป็นจริงโรคมะเร็งสามารถรักษาให้หายขาดได้หากตรวจพบตั้งแต่ระยะแรกของโรค จากข้อมูลปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้นี้จะทราบว่าตัวเองเป็นโรคมะเร็งก็เข้าสู่ระยะสุดท้ายของโรค การรักษาที่ระยะสุดท้ายดังกล่าวนอกจากจะไม่หายแล้วยังก่อให้เกิดการสิ้นเปลืองงบประมาณของประเทศ

เพื่อให้ประชาชนทราบถึงภาวะความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งหรือทราบว่าตัวเองเป็นโรคมะเร็งในระยะแรกเริ่มจึงเป็นเรื่องสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องตรวจวัดสารบ่งชี้โรคมะเร็ง (Tumor marker) ซึ่งระยะที่มะเร็งยังไม่แสดงอาการสามารถตรวจได้โดยใช้การเจาะเลือดเพื่อตรวจดูสารเคมีชนิดหนึ่งที่เรียกว่า อัลฟาฟีโตโปรตีน (Alpha fetoprotein หรือเรียกว่า AFP) สารเอเอฟพีเป็นสารไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 กิโลดาลตัน (70 kDa) สารนี้สร้างโดยเซลล์ตับที่ยังเจริญ

ไม่เต็มที ส่วนใหญ่จะสร้างขึ้นจากตับในระยะที่มีการแบ่งตัว ในคนปกติจะมีระดับของสารดังกล่าวในเลือดในช่วง 2 – 40 ไมโครกรัมต่อลิตร สารนี้จะตรวจพบมากในบุคคลที่มีความบกพร่องเช่นตับแข็ง ตับอักเสบ มะเร็งตับ และพบในหญิงตั้งครรภ์ ดังนั้นหากตรวจพบสารนี้ในคนปกติในระดับที่มากเกินไป อาจตั้งข้อสังเกตได้ว่าบุคคลดังกล่าวเป็นโรคตับอักเสบ ตับแข็ง มะเร็งถุงน้ำดีหรืออาจจะเป็นโรคมะเร็งตับก็ได้

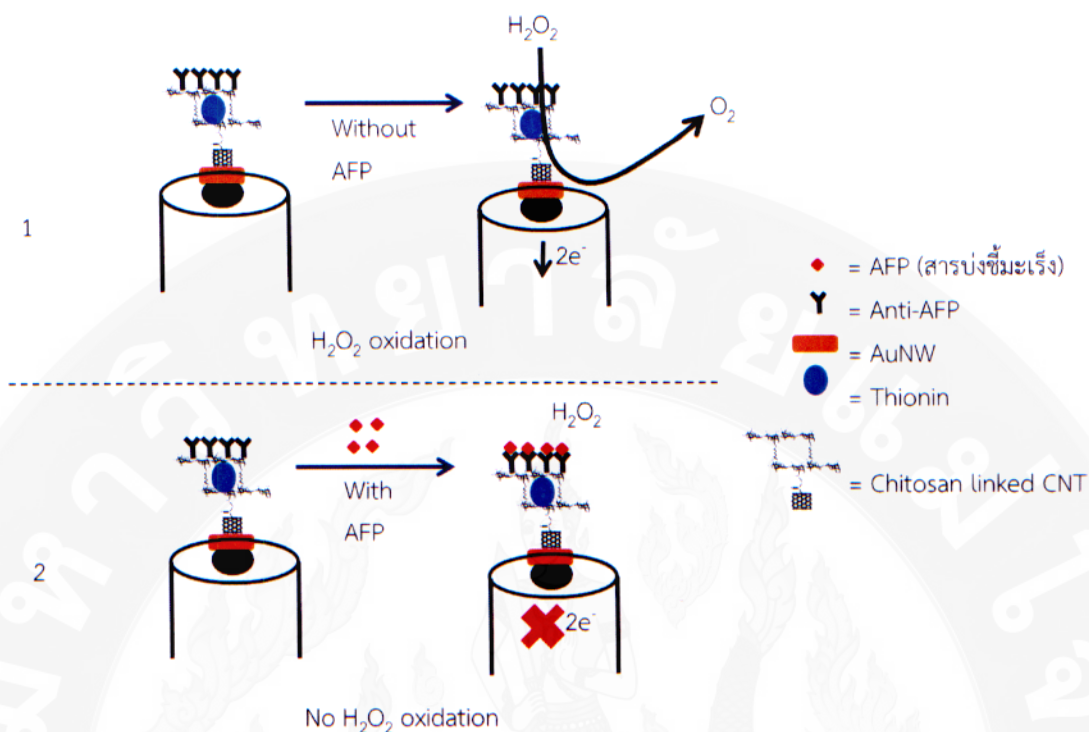
จากการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง ยังไม่พบการพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์โดยการฟังก์ชันทองคำนาโนไวร์ร่วมกับไคโตซานเชื่อมไว้คาร์บอนนาโนทิวส์และตรึงไทโอนินเป็นสารตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor) สำหรับตรวจวัดสารเอเอพี โดยจะประกอบขึ้นโดยใช้ไคโตซาน (Chitosan) คาร์บอนนาโนทิวส์ (Carbon nanotube) และทองคำนาโนไวร์ (Gold nanowires) และใช้สารไทโอนินเป็นสารส่งผ่านอิเล็กตรอน อิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจะมีหลักการทำงานแบบอินเวอร์สคือเมื่อไม่มีสารบ่งชี้มะเร็งจะเห็นสัญญาณทางไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่านไทโอนิน แต่ถ้ามีสารบ่งชี้มะเร็งอยู่ในตัวอย่างจะทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับไทโอนินได้ กลไกการตรวจวัดเป็นดังรูปที่ 1 การลดลงของกระแสไฟฟ้าเมื่อมีสารบ่งชี้มะเร็งจะทำให้ทราบความเข้มข้นของสารบ่งชี้มะเร็งได้ ซึ่งกระแสไฟฟ้าจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารบ่งชี้มะเร็ง การพัฒนาโครงการวิจัยนี้จะทำให้การตรวจสารบ่งชี้มะเร็งมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำ การตรวจวัดมีความแม่นยำ รวดเร็ว และไม่เปลืองสารตัวอย่าง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารบ่งชี้โรคมะเร็งในตัวอย่างเลือดโดยการฟังก์ชันทองคำนาโนไวร์ร่วมกับไคโตซานเชื่อมไว้คาร์บอนนาโนทิวส์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ประดิษฐ์และทดสอบคุณลักษณะของทองคำนาโนไวร์
2. ฟังก์ชันทองคำนาโนไวร์ร่วมกับไคโตซานเชื่อมไว้คาร์บอนนาโนทิวส์และตรึงสารตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนแบบวิธีฝังตัว เพื่อสร้างขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นขั้วไฟฟ้าพื้นฐานของอิมมูโนเซนเซอร์
3. ศึกษาตัวแปรต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อกระแสไฟฟ้าที่ได้จากอิมมูโนเซนเซอร์
4. ศึกษาช่วงที่เป็นเส้นตรงของขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาได้
5. ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด
6. ศึกษาผลของสารรบกวน
7. ศึกษาการทำซ้ำ ค่าการผลิตซ้ำ
8. ทำการเทียบสอบ (Validation) อิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน
9. ทดสอบอิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาได้เพื่อหาปริมาณสารบ่งชี้มะเร็งในตัวอย่างเลือด



รูปที่ 1 หลักการทำงานของอิมมูโนเซนเซอร์

โดย 1 เมื่อไม่มีสารบ่งชี้มะเร็ง (AFP) จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่านไทโอนิน และ 2 เมื่อมีสารบ่งชี้มะเร็งจะทำให้ไฮโดรเจนไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้จึงไม่เกิดปฏิกิริยาใด ๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้คาดว่าจะได้รับประโยชน์ด้านวิชาการ ในแขนงต่าง ๆ ตามดัชนีตัววัดความสำเร็จ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

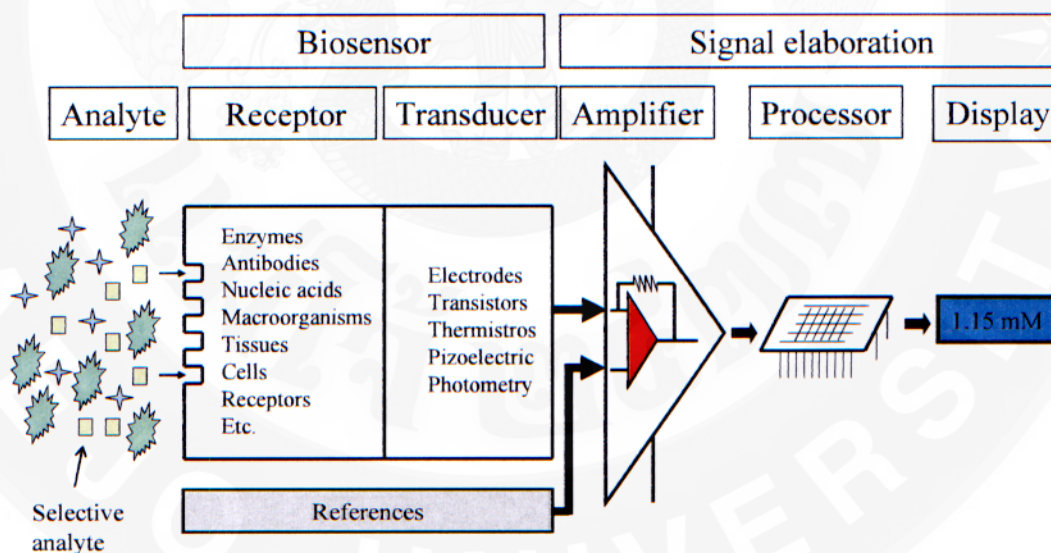
ประโยชน์	ดัชนีตัววัดความสำเร็จ
1. นวัตกรรม	ได้อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจสอบคัดกรองโรคมะเร็ง
2. องค์ความรู้ใหม่	การประดิษฐ์วัสดุนาโนไวร์
3. หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์	3.1 ชุมชนในท้องถิ่น 3.2 โรงเรียนและสถาบันการศึกษาต่าง ๆ
4. การผลิตนักศึกษา	ผลิตนักศึกษาปริญญาโทจำนวน 1 คน/ปี
5. การตีพิมพ์ผลงานวิชาการ	ตีพิมพ์ผลการวิจัยในการประชุมวิชาการ (Proceeding) หรือในวารสารวิชาการระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง

ประโยชน์	ดัชนีวัดความสำเร็จ
6. การนำเสนอผลงานในที่ประชุม	นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ หรือระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ครั้ง

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensors)

อิมมูโนเซนเซอร์ เป็นชนิดหนึ่งของไบโอเซนเซอร์ (Biosensors) ที่ใช้วัดปริมาณของสารกลุ่มพวกแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยสัญญาณที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณทางเคมีให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า คุณลักษณะของอิมมูโนเซนเซอร์จะมีความเลือกเฉพาะสูงมากเมื่อเทียบกับไบโอเซนเซอร์ชนิดอื่น มีความไวสูงเมื่อเทียบกับเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี ไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วน [2, 3] คือ (1) ส่วนของสารทางชีวภาพ (Biomaterials) ที่ทำหน้าที่จดจำ (Recognition) หรือเลือกเฉพาะ (selection) สารตัวอย่างที่จะทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีอย่างจำเพาะ ส่วนที่ (1) นี้จะถูกตรึง (Immobilization) อยู่บนผิวหน้าของ (2) ทรานสดิวเซอร์ (Transducer) ซึ่งทรานสดิวเซอร์นี้จะทำหน้าที่ในการส่งผ่านสัญญาณดังกล่าวไปยังส่วนประมวลผล (Processor) เพื่อวัดหรือแสดงสัญญาณให้เราได้ทราบ (Signal elaboration) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการวัดสัญญาณและแปรค่าออกมาเป็นหน่วยต่าง ๆ ที่ต้องการ ไบโอเซนเซอร์นี้แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างของไบโอเซนเซอร์

ประกอบด้วย (1) ส่วนของรีเซพเตอร์ (Receptors) ที่เป็นสารชีวโมเลกุล และ (2) ทรานสดิวเซอร์ (Transducer) ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณ ให้แก่ส่วนของการประมวลผล

ไบโอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าจะใช้ขั้วไฟฟ้าเป็นทรานสดิวเซอร์ แต่ในการจัดเซลล์สำหรับการทดลองทางเคมีไฟฟ้านั้น จะต้องใช้ขั้วไฟฟ้า 3 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดทำหน้าที่ดังนี้

1. ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (Working electrode : WE) จะมีขนาดของขั้วไฟฟ้าที่ขนาดเล็ก ทำให้สามารถเกิดสภาวะของโพลาไรเซชันตลอดการวิเคราะห์

2. ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode : RE) เป็นขั้วไฟฟ้าที่ใช้เทียบศักย์ไฟฟ้าให้กับขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงนี้จะมีค่าศักย์ที่แน่นอน ไม่แปรหรือขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในวงจร ไม่ขึ้นกับส่วนประกอบของสารตัวอย่าง ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่ดีต้องมีส่วนประกอบคงตัว ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายเมื่อเก็บไว้ และไม่แปรเปลี่ยนตามอุณหภูมิด้วย ปกติแล้วค่าศักย์ของวงจรที่อ่านได้จากอุปกรณ์คุมศักย์-วัดกระแสไฟฟ้า (Potentiostat) เป็นค่าที่เกิดจากผลต่างของศักย์จากขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (RE) และขั้วไฟฟ้าทำงาน (WE) อาจเรียกค่าศักย์ของวงจรที่วัดได้นี้ว่า ค่าศักย์สัมพันธ์ (Relative potentials) ถ้าขั้วไฟฟ้าตัวหนึ่งของวงจรเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ที่รู้ค่าศักย์แน่นอน ย่อมทำให้สามารถหาค่าศักย์ของอีกขั้วไฟฟ้าที่ต่อในวงจรซึ่งเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานได้

3. ขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode : CE) จะมีคุณลักษณะที่เฉพาะคือทำหน้าที่เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี เป็นขั้วที่รับพลังงานไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าทำงาน ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารตัวอย่างที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า แล้วส่งต่อพลังงานที่รับได้เข้าสู่เครื่องคุมศักย์-วัดกระแสไฟฟ้า ขั้วไฟฟ้าช่วยนี้ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้นในขณะเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างระหว่างการวิเคราะห์ ขั้วไฟฟ้าช่วยมักมีพื้นที่ผิวมาก ๆ เพื่อให้การนำไฟฟ้าเป็นไปได้ดี

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวัดสารอัลฟาฟิโดโปรตีนอาจทำได้โดยหลายวิธีเช่นวิธี Radio immunoassay (RIA) [4, 5] วิธี Chemiluminescence immunoassay (CLIA) [6, 7] วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [8, 9] วิธี Chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) [10, 11] วิธี Time resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) [12-14] แต่อย่างไรก็ดีวิธีที่ได้กล่าวมามีข้อจำกัดด้านอุปกรณ์ที่ใหญ่และราคาแพง เวลาที่ใช้ทดสอบนาน สำหรับประเทศไทยจากการสืบค้นฐานข้อมูลงานวิจัยยังไม่พบรายงานการพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารบ่งชี้มะเร็ง

ในงานวิจัยสนใจที่จะนำไบโอโพลิเมอร์ชนิดไคโตซานมาใช้ในการประดิษฐ์อิมมูโนเซนเซอร์ โดยการฟังก์ชันทองนาโนไวร์แล้วใช้ไคโตซานเชื่อมไขว้คาร์บอนนาโนทิวบ์ ไคโตซานถูกใช้อย่างแพร่หลายโดยมีข้อดีที่เด่น ๆ คือความเข้ากันได้กับสารชีวโมเลกุล การใช้ไคโตซานมีรายงานในฐานข้อมูลอย่างมากมายเช่น Krajewska [15] ได้รวบรวมการประยุกต์ใช้งานไคโตซานร่วมกับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น Glucose isomerase, Galactosidase, Lipase, Cholesterol oxidase [16, 17] พบว่าไคโตซานช่วยให้การเตรียมเอนไซม์ง่ายขึ้น การเก็บรักษานานขึ้น การใช้งานดีขึ้น ไคโตซานถูกนำไปใช้ในด้านทางการแพทย์ สิ่งแวดล้อม การผลิตอาหาร ชีวการแพทย์ การวิเคราะห์ทางยา ในรายงานของ Guibal [18] ได้รวบรวมการใช้ไคโตซานกับกลุ่มของโลหะทรานซิชัน โดยนำคุณสมบัติของไคโตซานไปช่วยเสริมการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน รีดักชันและปฏิกิริยาอื่น ๆ ของโลหะเหล่านั้น ทำให้การเกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นเนื่องจากความมีสภาพพรุนของไคโตซานทำให้โลหะสามารถเข้าไปจับเกาะได้ดีขึ้น ส่วน Kumar [19] ได้รีวิวกไคโตซานและไคติน ในด้านการผลิต การสังเคราะห์ การวิเคราะห์คุณลักษณะของไคโตซานด้านเคมีและฟิสิกส์ รวมถึงการประยุกต์ใช้งานด้านต่าง ๆ เช่นการถ่ายภาพ ผลิตภัณฑ์ความงาม การทำผิวหนังเทียม การทำเสื้อผ้า อาหาร วิศวกรรมการจัดการน้ำ การทำแบตเตอรี่ชนิดโซลิตสแตต การขนถ่ายยา และด้านไบโอเทคโนโลยี โดยไคโตซานและไคตินสามารถทำให้การประยุกต์ต่าง ๆ ทำได้ดีและมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากรายงานการวิจัยของนักวิจัยเอง

(Tanguaram และคณะ [20]) ในการนำโคโคซานไปเพิ่มประสิทธิภาพของไฮโดรเจนเซนเซอร์ในด้านอายุการใช้งานโดยอาศัยสมบัติไฮโดรเจลทำให้เซนเซอร์มีอายุการใช้งานนานขึ้น



อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองสำหรับเตรียมสารละลาย หรือใช้ในการสังเคราะห์สารและใช้สำหรับการพัฒนาการปรับปรุงแอลฟาฟีโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารเคมีและวัสดุ

ลำดับ	ชื่อสารเคมี	เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ / เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1	Acetic acid (CH_3COOH)	99.7	Merck	Germany
2	Alpha Fetoprotein	Ab207113	Abcam	England
3	Anti-alpha fetoprotein	Ab3980	Abcam	England
4	Alumina powder	99.99	Sigma	USA
5	Ascorbic acid (C_8H_8)	99.5	Sigma	USA
6	Carbon nanotube	95	Sigma	USA
7	Caffeine ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$)	99	Sigma	USA
8	Chitosan	93	Sigma	USA
9	Diethyl ether ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)	99.5	Sigma	USA
10	Dopamine	99.5	Sigma	USA
11	Ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)	99.5	Sigma	USA
12	Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	96	Merck	USA
13	Glutaraldehyde ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$)	50	Ajax	Australia
14	Gold (III) chloride trihydrate (HAuCl_4)	49	Sigma	USA
15	Hydrogen peroxide (H_2O_2)	30	Sigma	USA
16	Nitric acid (HNO_3)	65	Sigma	USA
17	Oxalic Acid ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$)	99.5	Sigma	USA
18	Potassium chloride (KCl)	99	Sigma	USA
19	Potassium nitrate (KNO_3)	99	Sigma	USA
20	Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	99	Sigma	USA
21	Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	99	Sigma	USA
22	Sodium chloride (NaCl)	99	Sigma	USA
23	Sodium hydroxide (NaOH)	99	Sigma	USA
24	Sodium sulfate (NaSO_4)	99	Sigma	USA
25	Thionine acetate ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{S C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	95	Sigma	USA
26	Uric acid ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$)	99	Sigma	USA

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญเพื่อใช้ในการทดลองเช่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารหรือเครื่องมือที่ใช้ในการประดิษฐ์แอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์

ลำดับ	ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทที่ผลิต	ประเทศ
1	ขั้วไฟฟ้าทำงาน; กลาสสิคาร์บอน	CH Instruments/ $\varnothing$ 3 mm	USA
2	ขั้วไฟฟ้าช่วย; แพลทินัม	CH Instruments/ $\varnothing$ 3 mm	USA
3	ขั้วไฟฟ้าช่วย; กราไฟต์	Home-made/ $\varnothing$ 10 mm	Thailand
4	ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง; ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์	CH Instruments/ 3 M KCl	USA
5	เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง	Mettler Toledo	Switzerland
6	เครื่องวัดค่า พีเอช	Metrohm/pH lab 827	Switzerland
7	เครื่องวัดความดัน-กระแสไฟฟ้า	CH Instruments/ CH1230A	USA
8	เครื่องอัลตราโซนิก	Labquip	England
9	เครื่องสปีดเตอร์ริง	Jeol/JFC1200	Japan
10	Anodisc membrane $\varnothing$ 0.02 ไมโครเมตร	Whatman	Germany
11	Electrochemical Cell	Home-made ขนาด 5 มิลลิลิตร	Thailand

การประดิษฐ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมคาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotube : CNT)

ชั่งผงคาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotube powder) 0.10xx กรัม แล้วเติมกรดไนตริกเข้มข้น (Conc. HNO_3) ลงไป 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 10 – 12 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน รินเอากรดออกให้เหลือแต่ตะกอนคาร์บอนนาโนทิวบ์ ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนวัดค่าพีเอช ให้ได้ค่าประมาณ 7 แต่ถ้าพีเอชไม่ใกล้เคียงกับ 7 ให้ทำการตกตะกอนซ้ำไปเรื่อย ๆ จนได้ค่าพีเอช เท่ากับ 7 เมื่อได้แล้วให้เทน้ำออก นำเฉพาะตะกอนที่ได้อบแห้งที่อุณหภูมิ 90°C

การเตรียมสารละลายไคโตซาน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (0.5 % Chitosan : CHIT)

ชั่งไคโตซาน 0.54 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อย แล้วค่อย ๆ เติมกรดอะซิติกเข้มข้นลงไปทีละหยดจนมีค่าพีเอช ประมาณ 4-5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อไม่ใช้

การเตรียมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde : GA)

ปิเปตสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 5.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมสารละลายทองคำคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Gold chloride : HAuCl_4)

ชั่งทองคำคลอไรด์มา 0.10xx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้เป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายไนตริก (Nitric : HNO_3)

ปิเปตกรดไนตริกเข้มข้นมา 50.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.0 มิลลิลิตร ที่มีน้ำปราศจากไอออนอยู่ในขวดเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จนครบ 100.0 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดไนตริกที่มีความเข้มข้น 32.5 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 12.0x กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 3.0 โมลาร์

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4

เตรียม 1.0 โมลาร์ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต : K_2HPO_4 (สาร A)

ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 43.55xx กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250.00 มิลลิลิตร

เตรียม 1.0 โมลาร์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต : KH_2PO_4 (สาร B)

ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 34.02xx กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนแล้ว
ปรับปริมาตรให้เป็น 250.00 มิลลิลิตร

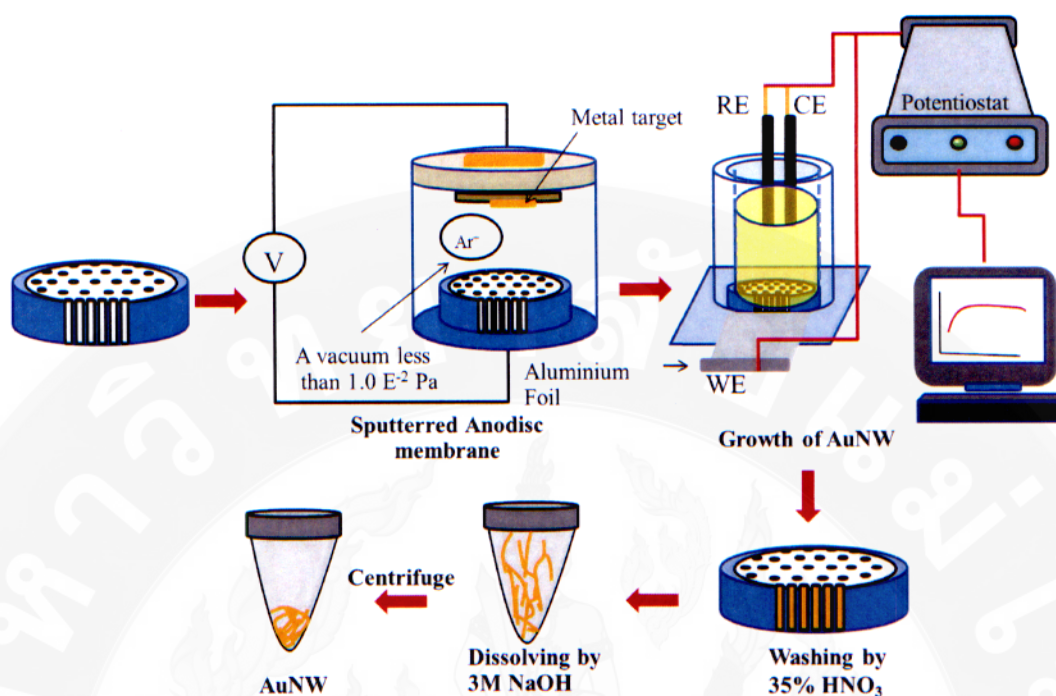
นำสารละลาย A ปริมาตร 40.00 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 10.00
มิลลิลิตร ลงขวดวัดปริมาตรขนาด 500.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ
500.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4

การเตรียมสารละลายไอออนรบกวน (Interference)

นำสารละลายไอออนรบกวนที่ต้องการวิเคราะห์การรบกวนได้แก่ กรดแอสคอร์บิก 1.87
โมลาร์ กลูโคส 5.05 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ 4.56 โมลาร์ โพแทสเซียมไนเตรต 3.12 โมลาร์
โซเดียมซัลเฟต 0.92 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 6.14 โมลาร์ กรดยูริก 0.04 โมลาร์ คาเฟอีน 0.08 โม
ลาร์ กรดออกซาลิก 0.20 โมลาร์ จากนั้นนำมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โม
ลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร แล้วใช้ทดสอบการรบกวน

การสังเคราะห์ทองคำนาโนไวร์ (Synthesis of gold nanowire)

นำแผ่นเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.02 ไมครอน ไปผ่านการสปัตเตอร์ด้วยทองโดยใช้กระแส
15 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 150 วินาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนประกอบเข้ากับเซลล์ ดังรูปที่ 3 โดย
ให้แผ่นเมมเบรนสัมผัสกับอะลูมิเนียมฟอสฟอรัสให้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์เป็น
ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และกราไฟต์เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย จากนั้นนำสารละลายทองคลอไรด์ เข้มข้น 0.1
เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เทลงในเซลล์ที่จัดขึ้นและให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.9 โวลต์ เป็นเวลา
20,000 วินาที เมื่อครบเวลาย้ายแผ่นเมมเบรน ออกมาจากเซลล์ เช็ดแผ่นเมมเบรนด้านที่ผ่านการ
สปัตเตอร์ด้วย 35 เปอร์เซ็นต์ กรดไนตริก จากนั้นย่อยแผ่นเมมเบรนด้วย 3 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอก
ไซด์ และนำเข้าเครื่อง บั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกจากสารละลาย แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำ
ปราศจากไอออน หากคุณลักษณะของทองคำนาโนไวร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



รูปที่ 3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ทองคำนาโนไวร์

การเตรียมสารละลายไคโตซานเชื่อมไข้วด้วยกลูตาราลดีไฮด์

นำสารละลายไคโตซาน เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเชื่อมไข้ว (Crosslinks) ด้วยกลูตาราลดีไฮด์ เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราส่วนโดยโมลระหว่างไคโตซานต่อกลูตาราลดีไฮด์เท่ากับ 1 : 200 โดยปิเปตสารละลายไคโตซาน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร และกลูตาราลดีไฮด์ เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร นำมาผสมกัน สารที่ได้จะเป็นสเลอรีสีเหลือง จากนั้นนำไป Sonicate เป็นเวลา 5 ชั่วโมงเพื่อให้สารละลายทั้งสองเข้ากัน นำไปคนให้เป็นสารละลายในเวลา 8 ชั่วโมง จะได้สารในลักษณะของเหลวหนืด ทำการสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ใส่ในกรวยแยก เพื่อแยกน้ำออกจากสารที่สังเคราะห์ขึ้น นำส่วนสเลอรีสีทองมาใช้ในการทำการทดลองต่อไป

การฟังก์ชันนอลไลซ์ไคโตซานด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์

ชั่งคาร์บอนนาโนทิวบ์ 6.00 มิลลิกรัม แล้วทำการเติมด้วยสารละลายไคโตซานที่ผ่านการเชื่อมไข้วด้วยกลูตาราลดีไฮด์ 1.0 มิลลิลิตร นำสเลอรีไป sonicate เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

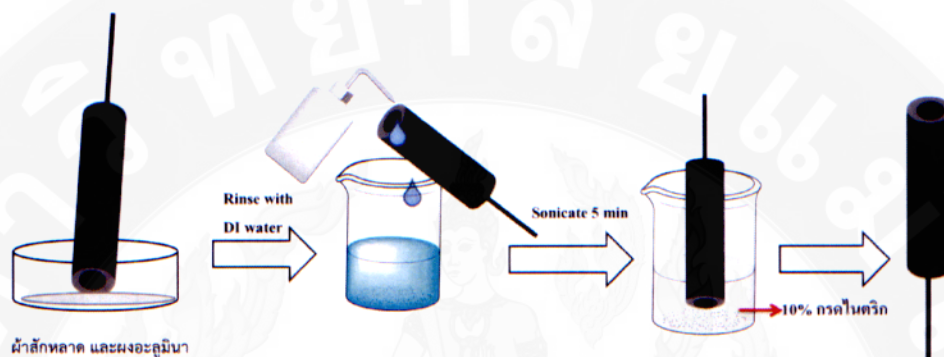
การฟังก์ชันนอลไลซ์ไคโตซานด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์และทองคำนาโนไวร์

ชั่งทองคำนาโนไวร์ 4.00 มิลลิกรัม ใส่ลงในสารที่ได้ทำการฟังก์ชันนอลไลซ์ไคโตซานด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์แล้ว จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

การเตรียมขั้วไฟฟ้าทำงาน

ขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนเปลือย (Bare GCE)

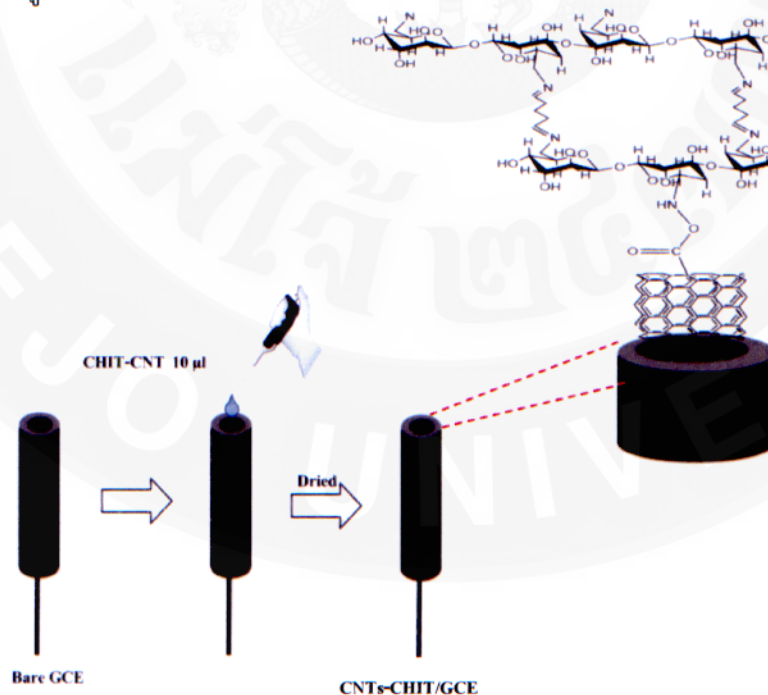
ขัดขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนด้วยผงอะลูมินา (Al_2O_3) บนผ้าสักหลาด ล้างด้วยน้ำอัลตราเพียว จากนั้นแช่ด้วยกรดไนตริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เข้าเครื่องอัลตราโซนิก แล้วล้างน้ำอัลตราเพียวอีกครั้ง จะได้ขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่สะอาด ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การเตรียมขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน

ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT/GCE

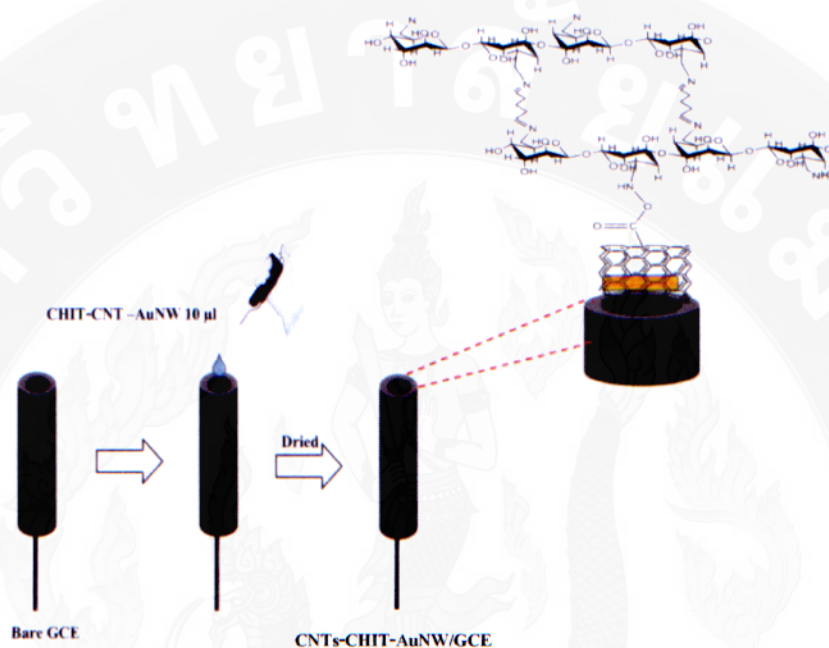
ตรึงสเลอรีคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง ล้างด้วยน้ำอัลตราเพียวตามขั้นตอนแสดงวิธีการเตรียมขั้วไฟฟ้างดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT/GCE

ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT/GCE

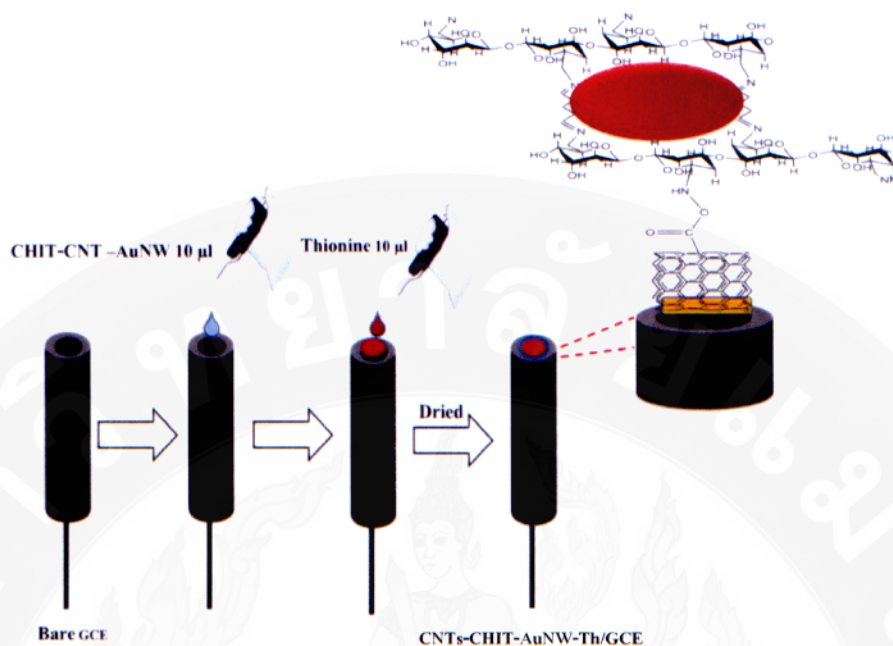
ตรึงสเลอรีทองนาโนไวร์-คาร์บอนนาโนทิวป์-ไคโตซานปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง ล้างด้วยน้ำอัลตราเพียวตามขั้นตอนแสดงวิธีการเตรียมขั้วไฟฟ้างดรูปที่ 6



รูปที่ 6 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW/GCE

ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE

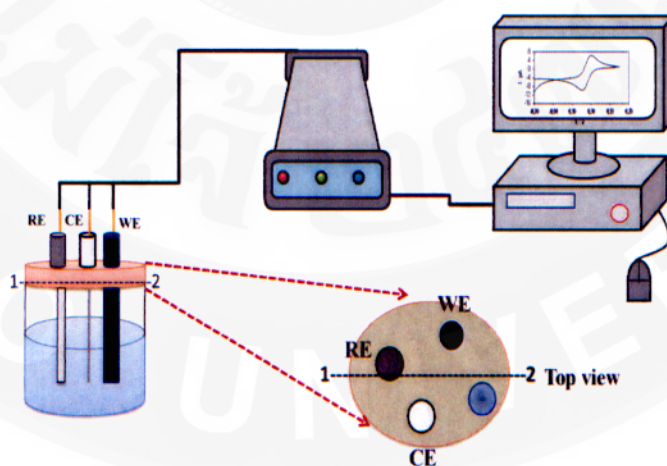
ตรึงสเลอรีทองนาโนไวร์-คาร์บอนนาโนทิวป์-ไคโตซานปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นทำการตรึงไทโอนีนที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรลงไปอีก 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วล้างด้วยน้ำอัลตราเพียวตามขั้นตอน แสดงวิธีการเตรียมขั้วไฟฟ้างดรูปที่ 7



รูปที่ 7 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE

การทดสอบขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

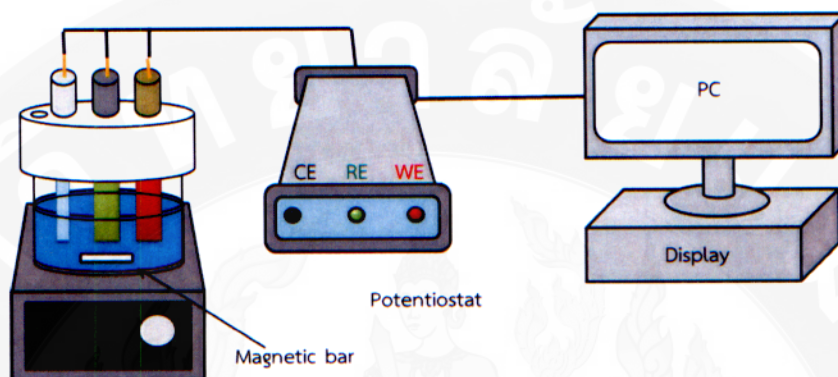
นำขั้วไฟฟ้าทำงานปรับปรุงขึ้นข้างต้นมาทดสอบโดยตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ศักย์ไฟฟ้าที่ให้อยู่ในช่วง -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 การจัดเซลล์สำหรับทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

การทดสอบชีวไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี

เป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่แก่ชีวไฟฟ้าทำงาน วัดในสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง จะเกิดการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าเมื่อเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าชีวไฟฟ้า โดยในการทดลองจะมีการคนสารละลายอยู่ตลอดเวลา ดังรูปที่ 9 เป็นขั้นตอนการทดสอบชีวไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี



รูปที่ 9 การจัดเซลล์สำหรับทดสอบด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี

การศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม (Applied potential)

ชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 0.15 ถึง -0.65 โวลต์ โดยลดศักย์ไฟฟ้าครั้งละ 0.1 โวลต์ โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย คือ 5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าที่สูงที่สุดในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ณ ศักย์ไฟฟ้านั้น ๆ

การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารที่นำมาปรับปรุงชีวไฟฟ้าทำงาน

การศึกษาผลของความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์ในการทำฟังก์ชันนอลไลส์ (Concentration of carbon nanotube)

นำชีวไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีมาทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวบ์ โดยใช้เทคนิคแอมเพโรเมตรีซึ่งทำการศึกษาปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในการตรึงลงบนชีวไฟฟ้าคือ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวบ์ สำหรับปรับปรุงชีวไฟฟ้าทำงาน

การศึกษาผลของความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์ในการทำฟังก์ชันนอลไลซ์ (Concentration of gold nanowire)

นำขั้วไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีทำการศึกษาค่าผลของความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์โดยใช้เทคนิคแอมเปอร์โรเมทรีซึ่งทำการศึกษาค่าปริมาณของทองคำนาโนไวร์ที่ใช้ในการตรึงลงบนขั้วไฟฟ้าคือ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์สำหรับปรับปรุงขั้วไฟฟ้าทำงาน

การศึกษาผลของความเข้มข้นไทโอนีนในการทำฟังก์ชันนอลไลซ์ (Concentration of thionine)

นำขั้วไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีทำการศึกษาค่าผลของความเข้มข้นของไทโอนีนโดยใช้เทคนิคแอมเปอร์โรเมทรีซึ่งทำการศึกษาค่าปริมาณของไทโอนีนที่ใช้ในการตรึงลงบนขั้วไฟฟ้าคือ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของไทโอนีนสำหรับปรับปรุงขั้วไฟฟ้าทำงาน

การศึกษาคูณลักษณะเฉพาะของขั้วไฟฟ้าดัดแปรสำหรับตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัด (Linearity and Limit of Detection)

ขั้วไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรีโดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 โดยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500 และ 5,000 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นนำค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแส (แกน y) มาพล็อตกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (แกน x) หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจวัด โดยนำสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าที่ได้จากสารละลายมาตรฐานหารด้วยค่าความชันจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน แล้วหาค่าความเข้มข้นออกมาจะทำให้ทราบความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจวัด

การศึกษาการทำซ้ำของการวัดของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น (Repeatability)

นำชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ชีวไฟฟ้าเดียวมาทำการทดสอบด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในเซลล์ที่ทดสอบเป็น 5 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ทำการทดสอบชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น ทำการวัดซ้ำจำนวน 7 รอบ เพื่อทดสอบความคงตัวของสัญญาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

การศึกษาการผลิตซ้ำของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุง (Reproducibility)

นำชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE มาทำการทดสอบด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในเซลล์ที่ทดสอบเป็น 5 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ทำการทดสอบชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น 3 ซ้ำ จากนั้นทำการปรับปรุงชีวไฟฟ้าใหม่แล้วทดสอบเช่นเดิมจำนวน 7 ชีวไฟฟ้า เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้นในการวัดซ้ำ (ทดสอบความเที่ยง)

การศึกษาอายุการใช้งานของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น (Life times)

นำชีวไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE มาทดสอบด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในเซลล์ที่ทดสอบเป็น 5 มิลลิโมลาร์ โดยทดสอบไปเรื่อย ๆ จนการเปลี่ยนแปลงของกระแสที่ได้ลดลงต่ำถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของกระแสที่ตรวจวัดครั้งแรก (100 เปอร์เซ็นต์) ที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป เพื่อทดสอบความคงตัวของสารต่าง ๆ ที่นำมาปรับปรุงชีวไฟฟ้าทำงาน

การศึกษารบกวนที่มีผลต่อชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น (Interferences)

ชีวไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในเซลล์ที่ทดสอบเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 จากนั้นทำการเติมสารรบกวนที่ใช้ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก กลูโคส โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไนเตรต โซเดียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ กรดยูริก คาเฟอีน กรดออกซาลิก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในสารละลาย โดยสารดังกล่าวเป็นสารที่ถูกออกซิไดส์ได้ง่าย สามารถรบกวนการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จนกว่าจะมีความเข้มข้นที่ทำให้สัญญาณขึ้นและมากกว่าสามเท่าของสัญญาณพื้นจะถือว่าความเข้มข้นดังกล่าวรบกวนชีวไฟฟ้า

การตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในตัวอย่างโดยวิธีไฟฟ้าที่ปรับปรุง

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้วิธีเติมสารละลายมาตรฐาน (Standard addition method) ในการเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารตัวอย่างที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงไปอย่างละ 100 ไมโครลิตร

ทำการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 14 ชนิดจากข้อไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ด้วยเทคนิค แอมเพโรเมตรี โดยเติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมขึ้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 จากนั้น นำกระแสที่เกิดขึ้นมาพล็อตกับความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เติม แล้วไปคำนวณหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารตัวอย่างนั้น ๆ

การตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในน้ำยาข้อมผมโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ในการตรวจวัดครั้งนี้จะใช้วิธีการของ Tom Markee หมายเลข (GSI/SOP/BS/RA/C/7) ซึ่งมีวิธีทดสอบดังนี้

เตรียมสารรีเอเจนต์ (สาร A)

ชั่งโพแทสเซียมไอโอไดต์ 6.6xxx กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2xxx กรัม และแอมโมเนียมโมลิบเดต เติมน้ำกรด 0.02xx กรัม ผสมสารทั้งสามชนิดละลายด้วยน้ำอัลตราเพียว ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำอัลตราเพียว เก็บสารรีเอเจนต์ไว้ในที่มืด เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไอโอไดต์ไอออน จะได้สารละลายใสไม่มีสี ถ้าหากเกิดสีต้องเตรียมใหม่

เตรียมสารรีเอเจนต์ (สาร B)

ชั่งโพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟลาธาเลต (KHP) 2.0xxx กรัม ละลายด้วยน้ำอัลตราเพียว ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยเติมลงในสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เริ่มจากปิเปตสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ลงในขวดเตรียมตัวอย่าง 4 ขวด ปิเปตสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0, 30, 150 และ 300 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 มิลลิลิตร ลงในขวดที่ 1-4 ขวดตามลำดับ ปิเปตสารละลาย A ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลาย B ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวด จะได้สารละลายมีสีเหลืองเกิดขึ้น จากนั้นทำการสแกนหาความยาวคลื่นของสารผสมที่เกิดขึ้น โดยเลือกใช้ความยาวคลื่นในช่วง 300 – 500 นาโนเมตร (จะพบสเปกตรัมของสารผสมที่มีความยาวคลื่น 351 นาโนเมตร) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมที่มีความยาวคลื่น 351 นาโนเมตร พล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Abs) กับความเข้มข้น

นำค่าการทดลองทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ทดลองไว้ ว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด โดยนำผลการทดลองที่ได้ไปทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำในทางสถิติ

การประดิษฐ์แอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

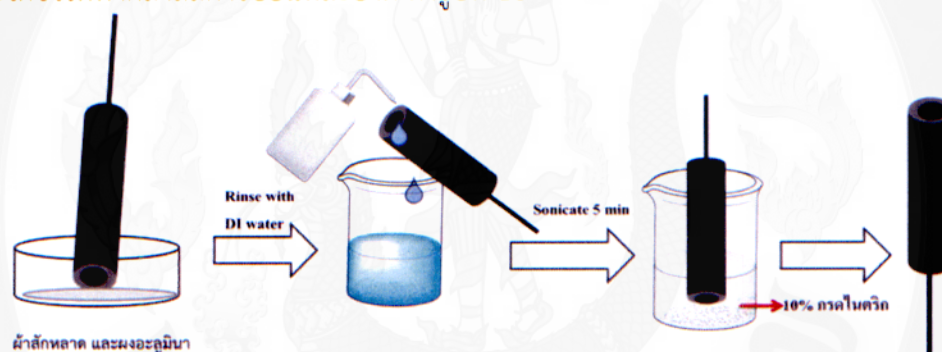
การเตรียมสารละลายไอออนรบกวน (Interference)

นำสารละลายไอออนรบกวนที่ต้องการวิเคราะห์การรบกวนได้แก่ กรดแอสคอร์บิก 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคส 0.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรดยูริก 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คาเฟอีน 16.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดปามีน 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แล้วใช้ทดสอบการรบกวน

การเตรียมขั้วไฟฟ้าทำงาน

ขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอนเปลือย (Bare GCE)

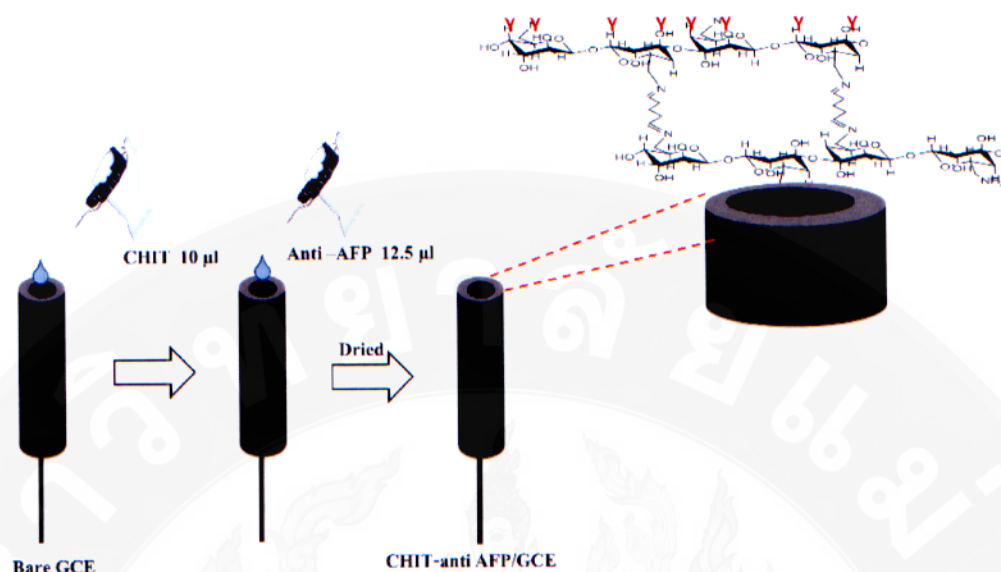
ขัดขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอนด้วยผงอะลูมินา (Al_2O_3) บนผ้าสักหลาด ล้างด้วยน้ำอัลตราเพียว จากนั้นแช่ด้วยกรดไนตริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เข้าเครื่องอัลตราโซนิก แล้วล้างน้ำอัลตราเพียวอีกครั้ง จะได้ขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอนที่สะอาด ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 การเตรียมขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอน

ขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE

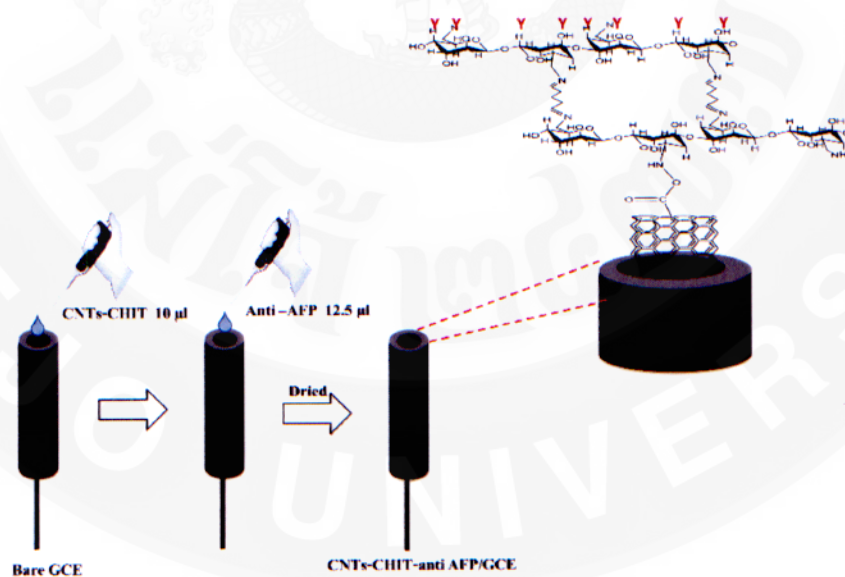
โคโตซานปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้ว จากนั้นหยด anti AFP 15 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งจะได้ปริมาณของ anti AFP 75 นาโนกรัมบนขั้วกลาสสิคาร์บอน วิธีการเตรียมขั้วไฟฟ้างี้ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE

ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-anti AFP/GCE

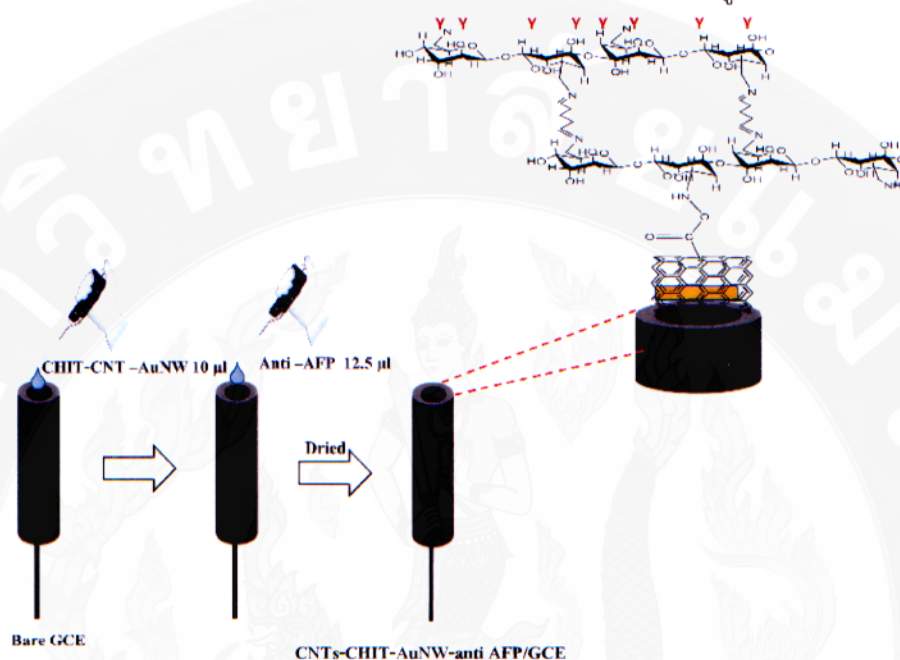
ตรึงสเลอรีคาร์บอนนาโนทิวบ์-โคโตนปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาส
สคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้ว จากนั้นหยด anti AFP 12.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง วิธีการเตรียมขั้วไฟฟ้างี้รูปที่ 12



รูปที่ 12 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-anti AFP/GCE

ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-anti AFP/GCE

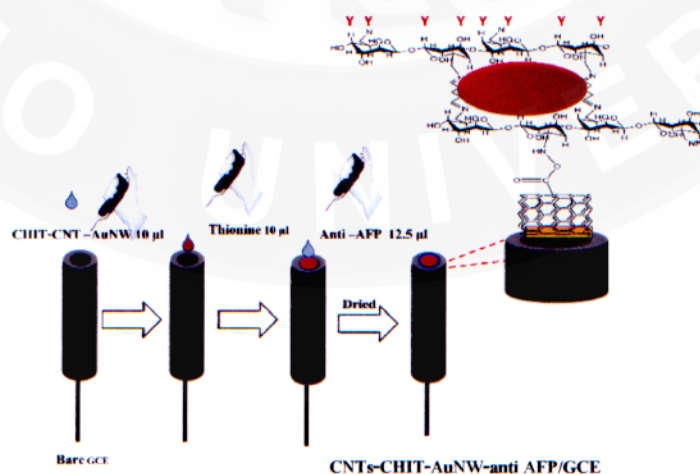
ตรึงสเลอรีทองนาโนไวร์-คาร์บอนนาโนทิวป์-ไคโตซานปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นหยด anti AFP 12.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งวิธีการเตรียมขั้วไฟฟ้างี้รูปที่ 13



รูปที่ 13 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-anti AFP/GCE

ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

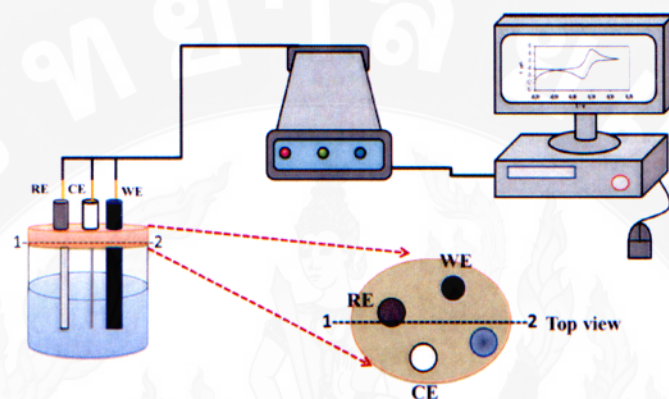
ตรึงสเลอรีทองนาโนไวร์-คาร์บอนนาโนทิวป์-ไคโตซานปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นทำการตรึงไทโอนีนที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปอีก 10 ไมโครลิตร จากนั้นหยด anti AFP 12.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง วิธีการเตรียมขั้วไฟฟ้างี้รูปที่ 14



รูปที่ 14 การเตรียมขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

การทดสอบชีวไฟฟ้าด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

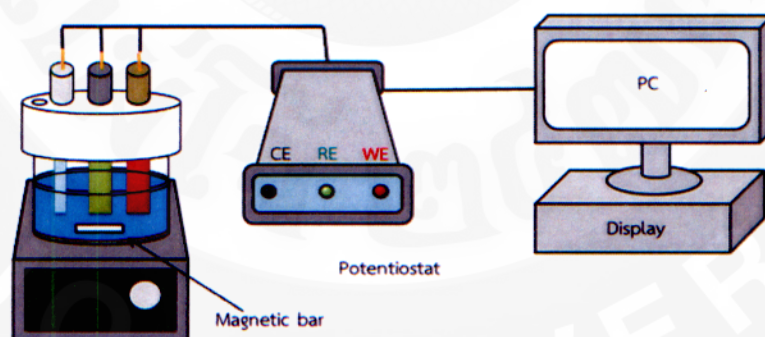
นำชีวไฟฟ้าทำงานปรับปรุงขึ้นทั้ง 5 แบบ มาทดสอบโดยตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และ AFP 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ศักย์ไฟฟ้าที่ให้อยู่ในช่วง -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ ศึกษา การเกิดปฏิกิริยาบนผิวหน้าชีวไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 การจัดเซลล์สำหรับทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

การทดสอบชีวไฟฟ้าด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี

เป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่แก่ชีวไฟฟ้าทำงาน วัดในสารละลายมาตรฐานหรือสารละลาย ตัวอย่าง จะเกิดการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าเมื่อเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าชีวไฟฟ้า โดยในการทดลองจะมีการคนสารละลายอยู่ตลอดเวลา ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 การจัดเซลล์สำหรับทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี

การศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม (Applied potential)

ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 0.0 ถึง -0.6 โวลต์ โดยลดศักย์ไฟฟ้าครั้งละ 0.1 โวลต์ โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย คือ 2.5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าที่สูงที่สุดในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ณ ศักย์ไฟฟ้านั้น ๆ จากนั้นทำการเติม AFP 0.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ AFP 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารที่นำมาปรับปรุงขั้วไฟฟ้าทำงาน

การศึกษาผลของความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์ในการทำฟังก์ชันนอลไลส์ (Concentration of carbon nanotube)

นำขั้วไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีมาทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวบ์ โดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมทรีซึ่งทำการศึกษาปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในการตรึงลงบนขั้วไฟฟ้าคือ 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 และ 160 ไมโครกรัมตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่จากนั้นทำการเติม AFP 0.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ AFP 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษากระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงกับความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวบ์สำหรับปรับปรุงขั้วไฟฟ้าทำงาน

การศึกษาผลของความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์ในการทำฟังก์ชันนอลไลส์ (Concentration of gold nanowire)

นำขั้วไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีมาทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์โดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีซึ่งทำการศึกษาปริมาณของทองคำนาโนไวร์ที่ใช้ในการตรึงลงบนขั้วไฟฟ้าคือ 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 ไมโครกรัม ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่จากนั้นทำการเติม AFP 0.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ AFP 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษากระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงกับความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์สำหรับปรับปรุงขั้วไฟฟ้าทำงาน

การศึกษาผลของความเข้มข้นไทโอนีนในการทำฟังก์ชันนอลไลซ์ (Concentration of thionine)

นำขั้วไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกซิเดชันเพื่อการศึกษาผลของความเข้มข้นของไทโอนีนโดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรีซึ่งทำการศึกษาปริมาณของไทโอนีนที่ใช้ในการตรึงลงบนขั้วไฟฟ้าคือ 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 และ 160 ไมโครกรัมตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่จากนั้นทำการเติม AFP 0.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ AFP 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษากระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงกับความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์สำหรับปรับปรุงขั้วไฟฟ้าทำงาน

ผลการศึกษาคูณลักษณะเฉพาะของขั้วไฟฟ้าตัดแปร

การทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัด (Linearity and Limit of Detection)

ขั้วไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 โดยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5 มิลลิโมลาร์ และเติม AFP ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นนำค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแส (แกน y) มาพล็อตกับความเข้มข้นของ AFP (แกน x) หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจวัด โดยนำสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าที่ได้จากสารละลายมาตรฐานหารด้วยค่าความชันจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน แล้วหาค่าความเข้มข้นออกมาจะทำให้ทราบความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจวัด

การศึกษการทำซ้ำของการวัดของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น (Repeatability)

นำขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ขั้วไฟฟ้าเดียวมาทำการทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี โดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่จากนั้นทำการเติม AFP 0.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ AFP 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวัดซ้ำจำนวน 7 รอบ เพื่อทดสอบความคงตัวของสัญญาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

การศึกษาการผลิตซ้ำของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุง (Reproducibility)

นำชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE มาทำการทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี โดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่จากนั้นทำการเติม AFP 0.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ AFP 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวัดซ้ำจำนวน 7 รอบ เพื่อทดสอบความคงตัวของสัญญาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ทำการทดสอบชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น 3 ซ้ำ จากนั้นทำการปรับปรุงชีวไฟฟ้าใหม่แล้วทดสอบเช่นเดิมจำนวน 5 ชั่วไฟฟ้า เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้นในการวัดซ้ำ (ทดสอบความเที่ยง)

การศึกษาอายุการใช้งานของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น (Life times)

นำชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ชั่วไฟฟ้าเดียวมาทำการทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี โดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เพื่อหากระแสไฟฟ้าสูงสุด จากนั้นทำการเติม AFP 0.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ AFP 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบไปเรื่อย ๆ จนการเปลี่ยนแปลงของกระแสที่ได้สูงขึ้นหรือลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของความต่างของกระแสที่ตรวจวัดครั้งแรก (100 เปอร์เซ็นต์) เพื่อทดสอบความคงตัวของสารต่าง ๆ ที่นำมาปรับปรุงชีวไฟฟ้าทำงาน

การศึกษาสารรบกวนที่มีผลต่อชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น (Interferences)

ชีวไฟฟ้าปรับปรุง CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรีโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในเซลล์ที่ทดสอบเป็น 2.5 มิลลิโมลาร์ ในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 จากนั้นทำการเติมสารรบกวนที่ใช้ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก กลูโคส กรดยูริก คาเฟอีน กรดออกซาลิก โดยสารดังกล่าวเป็นสารที่ถูกรบกวนมากในของเหลวจากร่างกายเช่น เลือด เป็นต้น ซึ่งอาจมีผลต่อการตรวจวัด AFP โดยตรวจวัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จนกว่าจะมีความเข้มข้นที่ทำให้สัญญาณขึ้นและมากกว่าสามเท่าของสัญญาณพื้นจะถือว่าความเข้มข้นดังกล่าวรบกวนชีวไฟฟ้า

การตรวจแอลฟาฟิโตโปรตีน (AFP) ในตัวอย่างเลือดโดยชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุง

เตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับการตรวจวัดโดยวิธี standard addition โดยการใช้ตัวอย่างเลือด 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายมาตรฐาน AFP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากนั้นใช้สาร 100 ไมโครลิตรที่ได้จากการเตรียมข้างต้น จากนั้นนำมาทดสอบโดยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรีโดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในเซลล์ที่ทดสอบเป็น 2.5 มิลลิโมลาร์ ในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 จากนั้นทำการเติมสารตัวจากที่ได้จากการเตรียมแบบ standard addition โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายในเซลล์เป็น 0.1, 0.25 และ 0.50

นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษาค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง แล้วนำความต่างของค่ากระแสไฟฟ้ามาพล็อตกราฟเทียบกับความเข้มข้น และคำนวณย้อนกลับเพื่อหา AFP ในตัวอย่างเลือด

นำค่าที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทางคลินิก เพื่อศึกษาค่าความเข้มข้น AFP ที่ทดลองกับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทางคลินิกว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด โดยนำผลการทดลองที่ได้ไปทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำในทางสถิติ

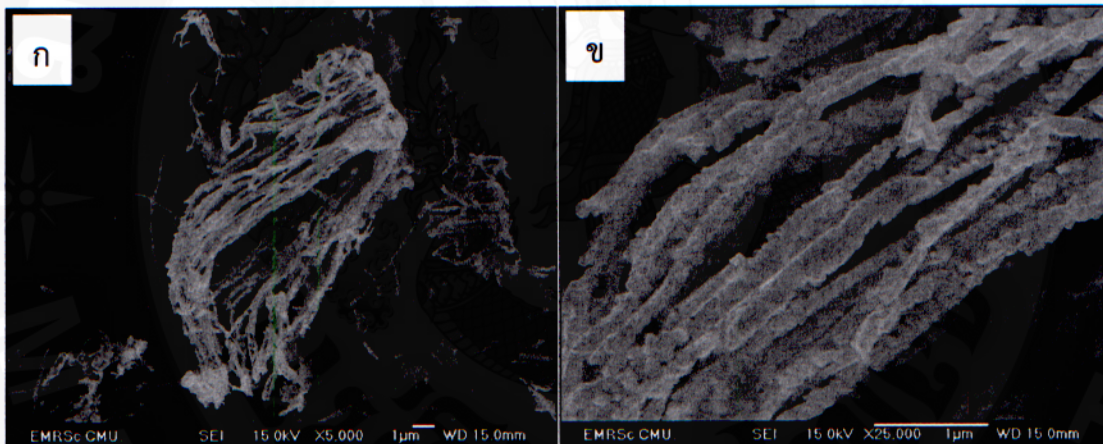


ผลการวิจัยและวิจารณ์

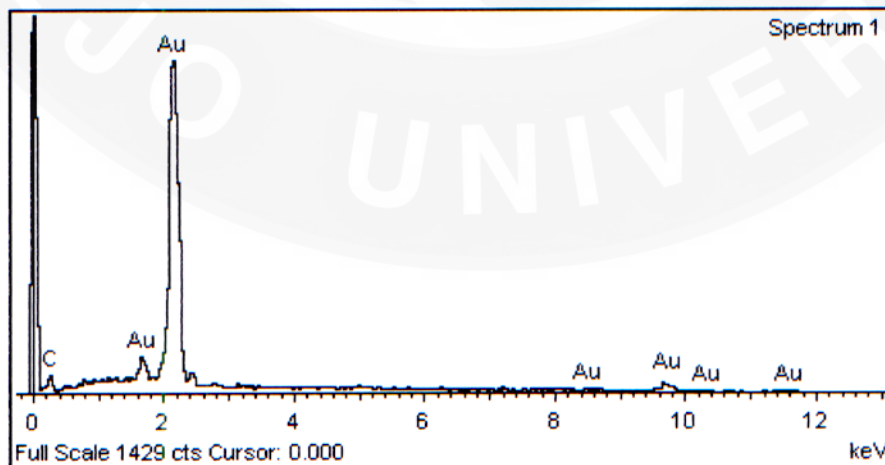
การประดิษฐ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์

ผลการตรวจสอบคุณลักษณะของนาโนไวร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

จากการสังเคราะห์ของนาโนไวร์โดยวิธีการทางเคมีไฟฟ้า เมื่อนำทองที่ทำการสังเคราะห์แผ่นเมมเบรนมาทำการย่อยแผ่นเมมเบรนออกเพื่อให้ได้เฉพาะอนุภาคที่ต้องการ จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าทองที่ทำการสังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นเส้น มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 นาโนเมตร และมีความยาว 10 ไมโครเมตร ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับการรายงานในงานวิจัยก่อนหน้านี้ [21] ดังรูปที่ 17 นอกจากนี้เพื่อเป็นการยืนยันผลว่าลักษณะที่พบนั้นเป็นของทองนาโนไวร์ จึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์ธาตุโดยเครื่องวัดการกระจายพลังงานรังสีเอกซ์ทางสเปกโตรมิเตอร์ ได้ผลดังรูปที่ 18 แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานที่ตรวจพบนั้นเป็นลักษณะทางสัณฐานของทองนาโนไวร์ เนื่องจากการเกิดฟลักของธาตุ Au ที่ 2.2 KeV การตรวจวิเคราะห์ธาตุพบเฉพาะทองเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลของการวิจัยก่อนหน้านี้ [22]



รูปที่ 17 รูป SEM ของทองนาโนไวร์ โดย (ก) กำลังขยาย 5,000 เท่า และ (ข) กำลังขยาย 25,000 เท่า



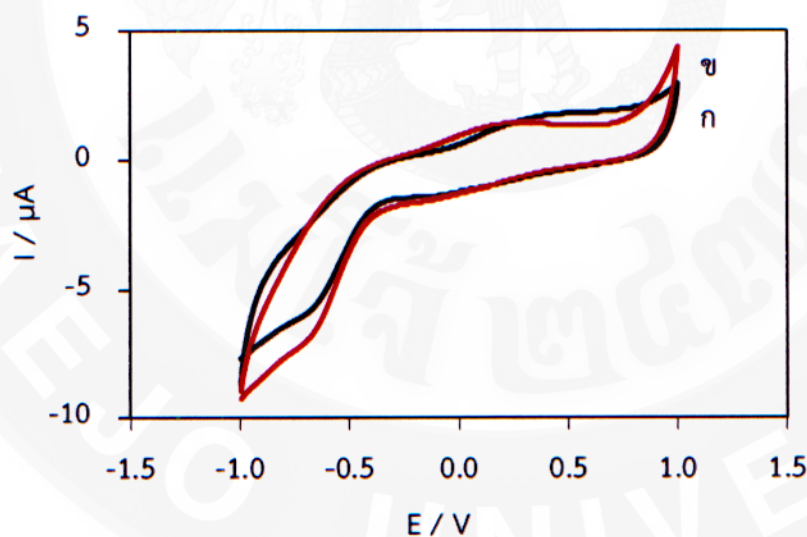
รูปที่ 18 สเปกตรัมจากเครื่อง EDX ของทองนาโนไวร์

ผลการทดสอบขั้วไฟฟ้าดัดแปรด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

นำขั้วไฟฟ้าดัดแปรทั้ง 4 ชนิดมาทำการทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยศึกษาในช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 และในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีผลการทดลองดังนี้

ผลการทดสอบขั้วไฟฟ้ากลาสส์คาร์บอนเปลือย (Bare GCE)

จากการทำการทดสอบขั้วไฟฟ้ากลาสส์คาร์บอนเปลือย (Bare GCE) พบว่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ก) และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) ได้ผลการตรวจวัดแสดงดังรูปที่ 19 ซึ่งจากกราฟ (ก) จะพบว่าไม่ปรากฏพิกที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันจาก H_2O_2 เนื่องจากไม่มีการเติม H_2O_2 จะมีการเกิดพิกของออกซิเจนที่มาจากน้ำเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อทำการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สังเกตได้จากกราฟมีการหักขึ้นที่ 0.90 โวลต์ เนื่องจากการเกิดออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนที่ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้า -0.7 โวลต์ จะเกิดพิกของรีดักชันซึ่งเกิดจากออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลาย

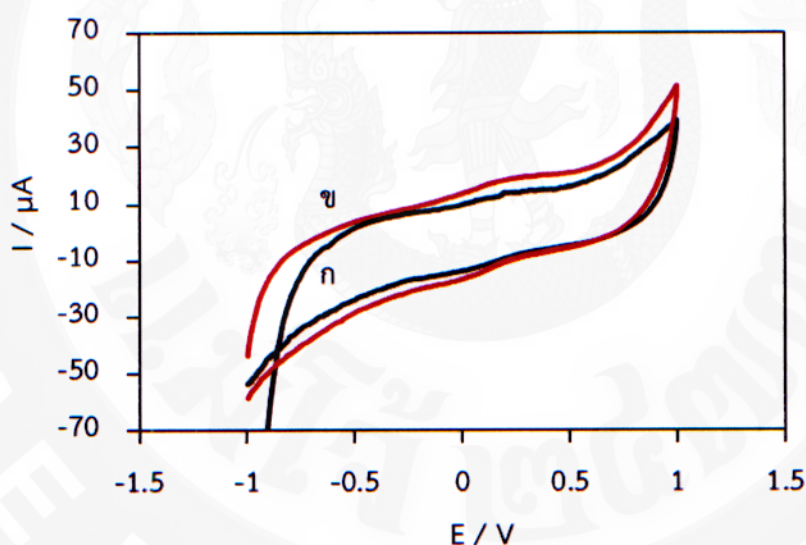


รูปที่ 19 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้ากลาสส์คาร์บอนเปลือย (Bare GCE)

ใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์

ผลการทดสอบชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT/GCE

จากการทำการทดสอบชีวไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT/GCE พบว่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ผลการตรวจวัดแสดงดังรูปที่ 20 (ก) และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) กระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดเพิ่มขึ้นตามลำดับ กระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าสังเกตได้จากตำแหน่งที่ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ 0.90 โวลต์ จะเกิดกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้กระแสที่เกิดขึ้นสูงกว่าสารละลายแบลนด์ และสูงขึ้นว่าชีวไฟฟ้ากลาสคาร์บอนเปลือย 18 เท่า ส่วนที่ตำแหน่งรีดักชันของออกซิเจนที่เคยในเกิดในชีวไฟฟ้ากลาสคาร์บอนเปลือยกลับไม่พบในชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT/GCE นี้ เนื่องจากชีวไฟฟ้าการดัดแปรโดยใช้ CNTs-CHIT ลงบนผิวหน้าชีวไฟฟ้า ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานในงานวิจัยก่อนหน้านี้ [23] ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีพื้นที่ผิวสูงและนำไฟฟ้าได้ดี ซึ่งคาร์บอนนาโนทิวบ์จะช่วยให้เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ดีขึ้น ทำให้สามารถตรวจวัดกระแสไฟฟ้าได้สูง และป้องกันการเกิดพิษของออกซิเจน



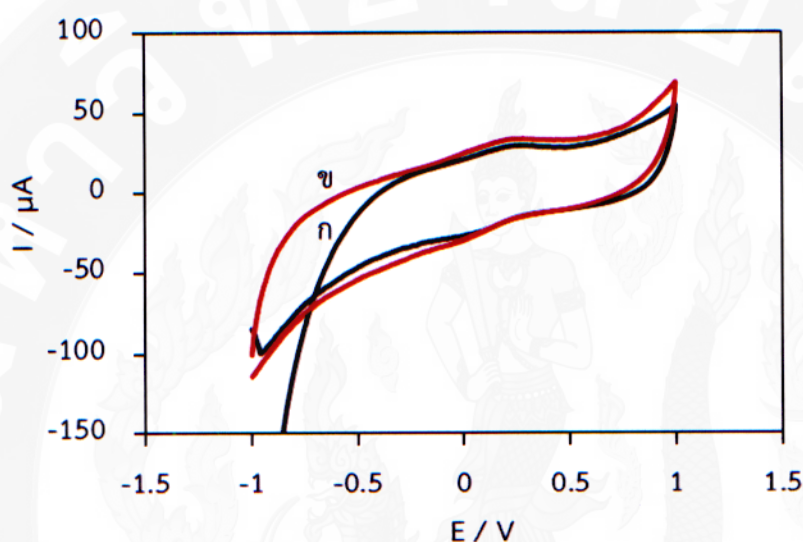
รูปที่ 20 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของชีวไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT/GCE

ใน (ก) สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 และใน (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์

ผลการทดสอบชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW/GCE

จากการทำการทดสอบชีวไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW/GCE พบว่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ผลการตรวจวัดแสดงดังรูปที่ 21 (ก) และทำการตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 โมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) กระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดเพิ่มขึ้นตามลำดับ สังเกตช่วงค่าศักย์ไฟฟ้าที่ 0.5 ถึง -0.9 โวลต์ จะเกิดกระแสไฟฟ้าที่สูงขึ้นของ

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้กระแสที่เกิดขึ้นสูงกว่าสารละลายแบลงค์ เนื่องจากชีวไฟฟ้ามีการตัดแปรโดยใช้ CNTs-CHIT-AuNW และทองคำนาโนไวร์มีสัดส่วนพื้นที่ผิวของอะตอมที่สูงมาก ทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากทองคำปกติที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ จึงทำให้เพิ่มคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยา ช่วยขยายสัญญาณ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสาร H_2O_2 นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการตัดแปรชีวไฟฟ้าโดยการเพิ่มทองคำนาโนไวร์นั้นยังมีความเข้ากันได้กับคาร์บอนนาโนทิวบ์และโคโคซาน ซึ่งก็มีการรายงานในงานวิจัยอื่น ๆ เช่นเดียวกัน [24]

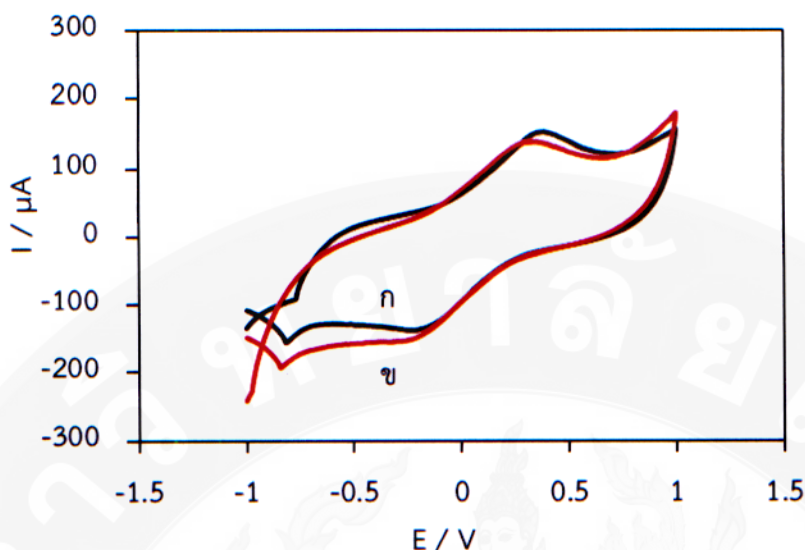


รูปที่ 21 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของชีวไฟฟ้าตัดแปร CNTs-CHIT-AuNW/GCE

ใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์

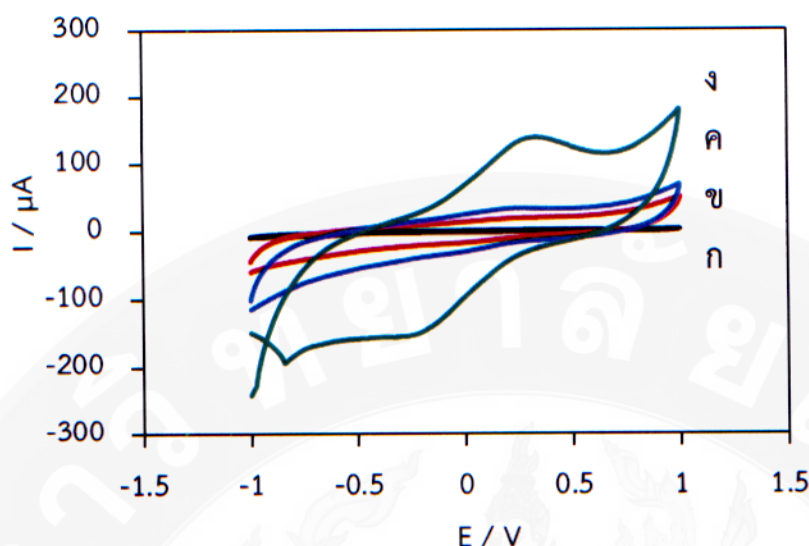
ผลการทดสอบชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE

จากการทำการทดสอบชีวไฟฟ้าตัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE พบว่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ก) และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ (ข) กระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดเพิ่มขึ้นตามลำดับ สามารถสังเกตได้จากตำแหน่งที่ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ -0.45 โวลต์ จะเกิดกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งพบว่าการตัดแปรชีวไฟฟ้าที่ใช้ไทโอนีนมีผลทำให้กระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดสูงขึ้นด้วย ไทโอนีนจะทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังผิวหน้าชีวไฟฟ้าจึงมีผลให้กระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดสูงขึ้นด้วย [25] จากรูปที่ 22 แสดงให้เห็นถึงกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดโดยใช้ชีวไฟฟ้าตัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th สูงกว่าชีวไฟฟ้าเปลือยประมาณ 150 เท่า แสดงว่าชีวไฟฟ้าตัดแปรมีความเข้ากันได้ดีของสารที่ใช้ตัดแปรชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th และมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มที่ดีที่จะทำให้เซนเซอร์ที่ตัดแปรขึ้นมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำลงด้วย



รูปที่ 22 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

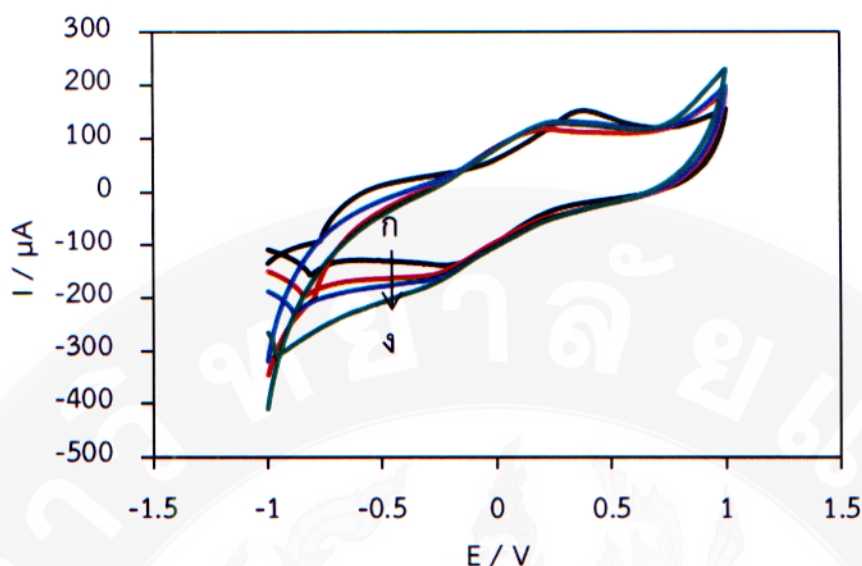
เมื่อนำขั้วไฟฟ้าดัดแปรทั้ง 4 แบบ ได้แก่ Bare GCE, CNTs-CHIT/GCE, CNTs-CHIT-AuNW/GCE, CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE มาทำการทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี โดยศึกษาในช่วง -1.0 ถึง 1.0 อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5.0 มิลลิโมลาร์ ได้ผลดังรูปที่ 23พบว่าเมื่อนำผลการทดสอบมาซ้อนทับกัน แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า ขั้วไฟฟ้า Bare GCE (ก) ให้กระแสไฟฟ้าต่ำที่สุด และเมื่อทำการใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT/GCE (ข) พบว่ามีกระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น เมื่อใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW/GCE (ค) พบว่ามีกระแสไฟฟ้าเพิ่มสูงกว่าขั้ว (ก) และ (ข) ทั้งนี้เนื่องจากมีช่องว่างระหว่างวัสดุในการอัดประจุ ส่วนขั้วไฟฟ้าดัดแปรที่ให้กระแสสูงสุดคือ CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE (ง) พบกระแสไฟฟ้าสูงขึ้นเป็นฟีกที่ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้า -0.30 โวลต์ ซึ่งเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของไทโอนินที่เพิ่มเข้าไปในขั้วไฟฟ้า ส่วนฟีกที่ตำแหน่ง 0.25 โวลต์ เป็นฟีกของปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโอนิน



รูปที่ 23 โวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าต่าง ๆ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์

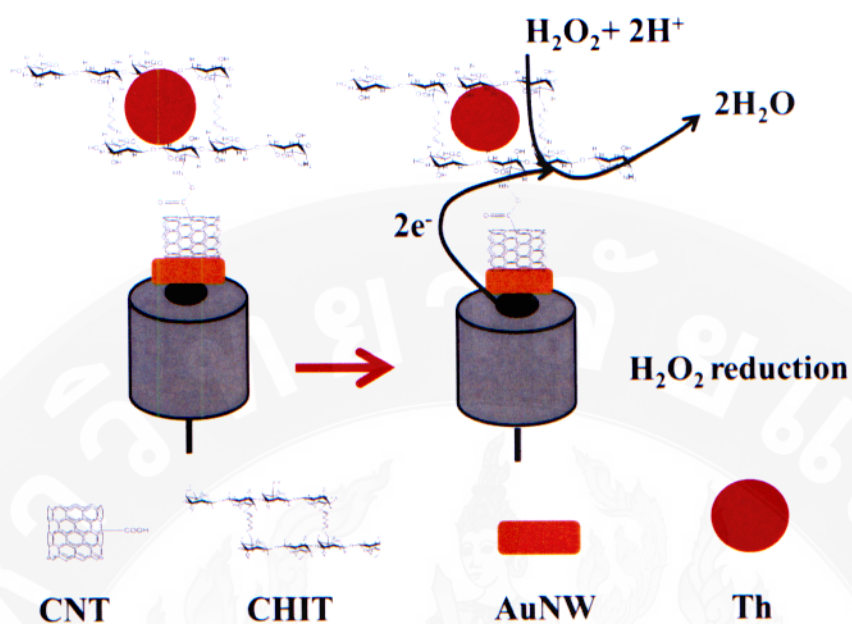
โดย (ก) Bare GCE (ข) CNTs-CHIT/GCE (ค) CNTs-CHIT-AuNW/GCE และ (ง) CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE

เมื่อนำขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ซึ่งเป็นขั้วไฟฟ้าที่ทดสอบแล้วว่าเป็นขั้วไฟฟ้าที่ดีที่สุด มาทำการทดสอบโดยใช้เทคนิคโวลแทมโมแกรม โดยศึกษาในช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 0, 1.0, 2.5, 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อนำผลการทดสอบมาซ้อนทับกัน แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่ามีกระแสไฟฟ้าสูงขึ้นที่ -0.30 โวลต์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 24 แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มที่จะทำการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเชิงปริมาณได้

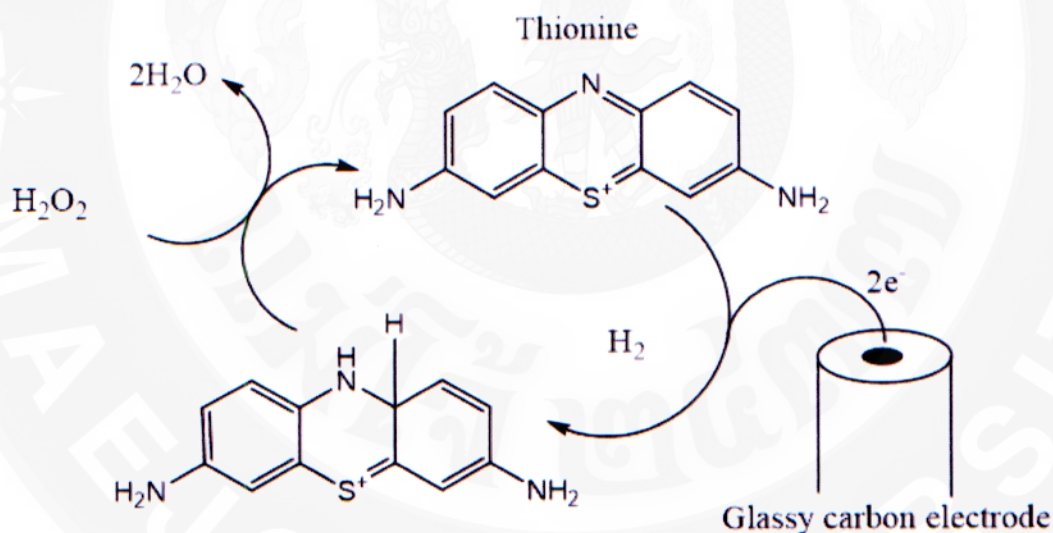


รูปที่ 24 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT- AuNW-Th/GCE ตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
(ก) 0 (ข) 1.0 (ค) 2.5 และ (ง) 5.0 มิลลิโมลาร์ ใช้อัตราการสแกนที่ 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

การนำคาร์บอนนาโนทิวบ์มาทำการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล โดยการแช่กรดไนตริกทำให้ได้คาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งหมู่คาร์บอกซิลจะเกิดการแตกตัวและเป็นตัวที่จะสร้างพันธะกับโคโดซานที่ทำการเชื่อมไขว้ด้วยกลูตาโรลดีไฮด์แล้ว โคโดซานที่ได้จะเกิดเป็นพอลิเมอร์แบบตาข่ายที่มีลักษณะเป็นโพรง ทำให้มีคุณสมบัติในการดูดซับได้ดี นอกจากนี้แล้ว ยังดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนโดยการเพิ่มทองคำนาโนไวร์ ซึ่งทองคำนาโนไวร์จะจับกับคาร์บอนนาโนทิวบ์ และแทรกอยู่ในโพรงของโคโดซาน จึงทำให้ขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรขึ้นมามีเสถียรภาพ และมีการนำไฟฟ้าที่ดี จึงทำให้กระแสไฟฟ้าสูงขึ้น ดังรูปที่ 25 นอกจากนี้ยังได้ทำการเพิ่มไทโอนีน ซึ่งจะมีกลไกเป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนช่วยในการทำงานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ จะอาศัยการแตกตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วเกิดเป็นแก๊สออกซิเจนกับโปรตอน และมีการให้อิเล็กตรอนกับขั้วไฟฟ้าทำงานหรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้านั่นเอง โดยมีไทโอนีนเป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนเพื่อให้กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่เร็วขึ้น ในขณะเดียวกันไทโอนีนก็มีการรับโปรตอนและอิเล็กตรอนจากขั้วไฟฟ้าหรือเกิดปฏิกิริยารีดักชันบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วย [26] ดังรูปที่ 26



รูปที่ 25 กลไกการทำงานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ที่เกิดผ่านตัวไฟฟ้าทำงานที่ตัดแปรโดยคาร์บอนนาโนทิวบ์ ไคโตซาน ทองนาโนไวร์ และไทโอนีน

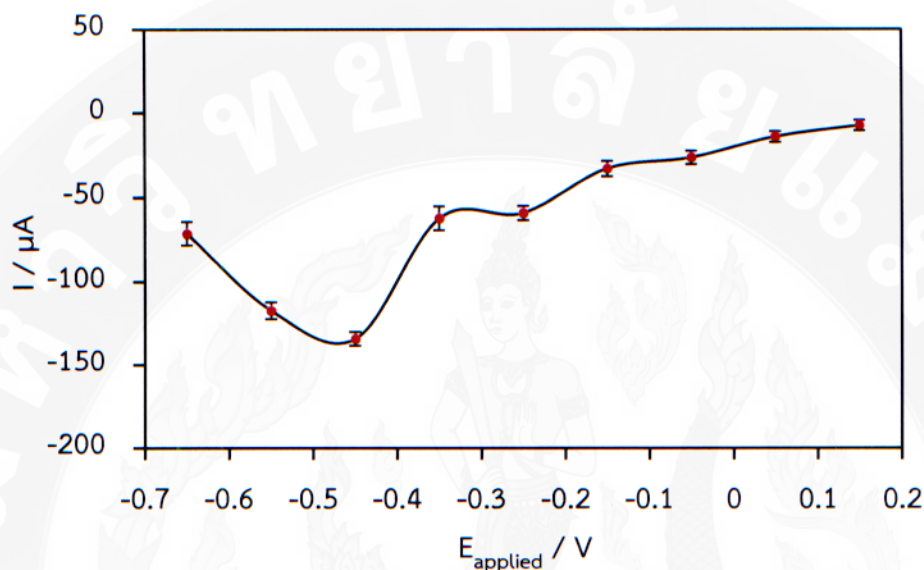


รูปที่ 26 กลไกการทำงานของไทโอนีนที่เกิดผ่านตัวไฟฟ้าทำงาน

ผลการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม

การศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ทำการศึกษาในช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ 0.2 ถึง -0.7 โวลต์ เนื่องจากทำการศึกษาเฉพาะช่วงของค่าศักย์ไฟฟ้าที่ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้พล็อตเทียบกับค่าศักย์ไฟฟ้าแล้วทำการพล็อตกราฟอนุพันธ์อันดับหนึ่ง ดังรูปที่ 27 จะพบว่าเมื่อให้ค่า

ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.15 ถึง -0.35 โวลต์ กระแสไฟฟ้าที่ได้จะสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่เมื่อให้ค่าศักย์ไฟฟ้า -0.45 โวลต์ กระแสไฟฟ้าที่ได้จะสูงขึ้นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามกระแสไฟฟ้าจะสูงสุดเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.45 โวลต์ หากมีการให้ศักย์ไฟฟ้าที่สูงขึ้นกระแสไฟฟ้าที่ได้ก็จะลดต่ำลง ดังนั้นจึงเลือกทำการทดลองที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ -0.45 โวลต์ เนื่องจากให้กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสูงที่สุด

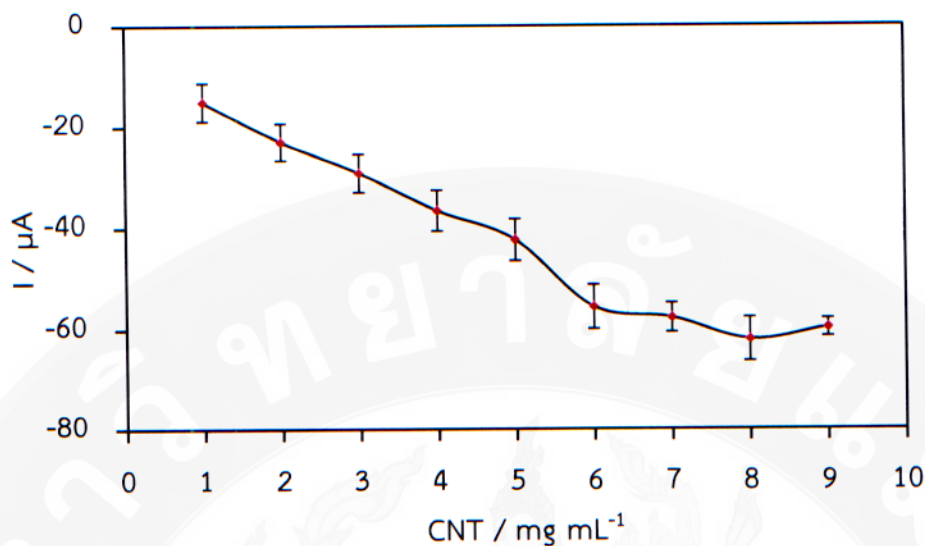


รูปที่ 27 ผลของศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารที่นำมาปรับปรุงขั้วไฟฟ้าทำงาน

ผลการศึกษาความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์ในการทำฟังก์ชันนอลไลซ์

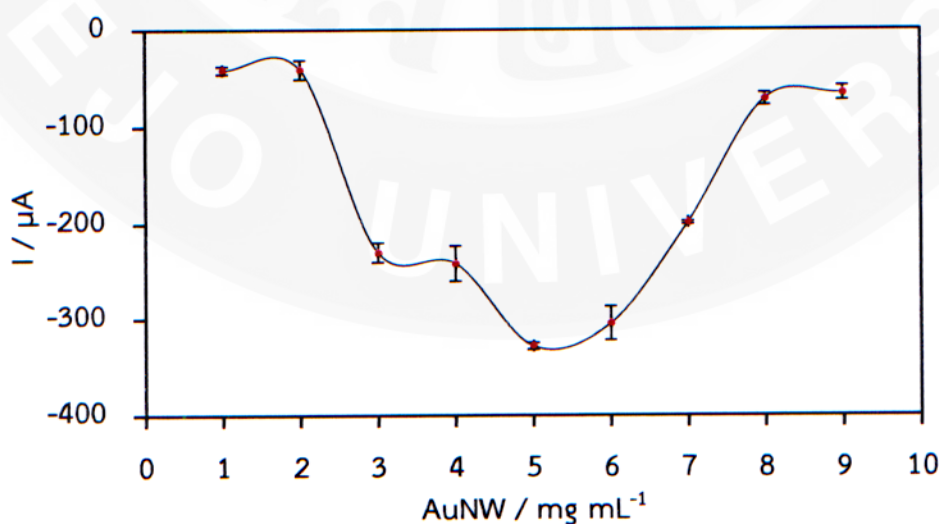
จากการศึกษาความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวบ์ ได้ทำการศึกษาโดยให้ความเข้มข้นโคโตะซาน ทองนาโนไวร์ และไทโอนีนคงที่ และทำการศึกษาที่ความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, และ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เทคนิคแอมเพโรเมทรี ที่อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที พบว่าที่ความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดจะสูงขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีพื้นที่ผิวสูงและนำไฟฟ้าได้ดี ซึ่งคาร์บอนนาโนทิวบ์จะช่วยให้เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ดีขึ้น แต่ที่ 7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้จะคงที่หรือต่ำลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังรูปที่ 28 เนื่องจากคาร์บอนนาโนทิวบ์มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะเกิดการเกาะตัวที่แน่นบริเวณผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนลดลงไปด้วย จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวบ์ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้กระแสที่สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 28 ผลของความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า

ผลของความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์ในการทำฟังก์ชันนอลไลซ์

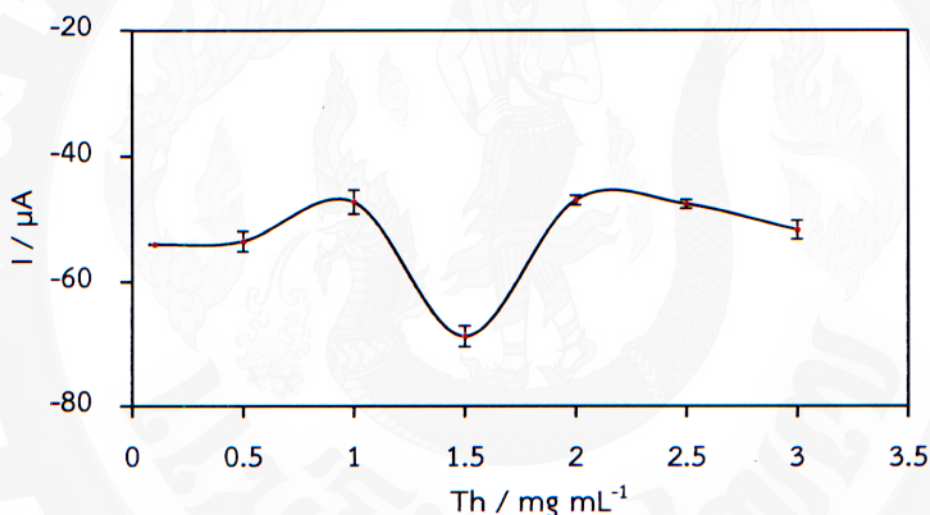
จากการศึกษาความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์ ได้ทำการศึกษาโดยให้ความเข้มข้นโคโตนคาร์บอนนาโนทิวบ์ และไทโอนีนคงที่ และทำการศึกษาที่ความเข้มข้นทองคำนาโนไวร์ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, และ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ 1 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดจะสูงขึ้นตามลำดับ แต่ที่ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้จะลดต่ำลง ดังรูปที่ 29 เนื่องจากที่ความเข้มข้นทองคำนาโนไวร์สูงทำให้ผิวหน้าขั้วไฟฟ้ามีความหนาแน่นมากเกินไป จะเกิดการกีดกันการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอน ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นทองคำนาโนไวร์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 29 ผลของความเข้มข้นของทองคำนาโนไวร์ที่ใช้ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า

ผลการศึกษาความเข้มข้นไทโอนีนในการทำฟังก์ชันนอลไลซ์

จากการศึกษาความเข้มข้นของไทโอนีน ได้ทำการศึกษาโดยให้ความเข้มข้นโคโตซานคาร์บอนนาโนทิวบ์ และทองนาโนไวร์คงที่ และทำการศึกษาที่ความเข้มข้นของไทโอนีนที่ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดค่อนข้างคงที่ แต่ที่ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้สูงที่สุด และลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของ ไทโอนีนสูงขึ้น ดังรูปที่ 30 แสดงว่าที่ความเข้มข้นที่ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไทโอนีนทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนได้เหมาะสมที่สุด ดังนั้นเราจึงเลือกความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 30 ผลของความเข้มข้นของไทโอนีนที่ใช้ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า

สรุปตัวแปรที่เหมาะสมสำหรับการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าปริมาณสารที่ใช้ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้าและสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสม ดังตารางที่ 4 ซึ่งสภาวะเหล่านี้จะถูกนำมาศึกษาต่อในการหาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะใช้วิเคราะห์ ชีตจำกัดการตรวจวัด และหาอายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้าดัดแปรนี้ด้วย

ตารางที่ 4 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์

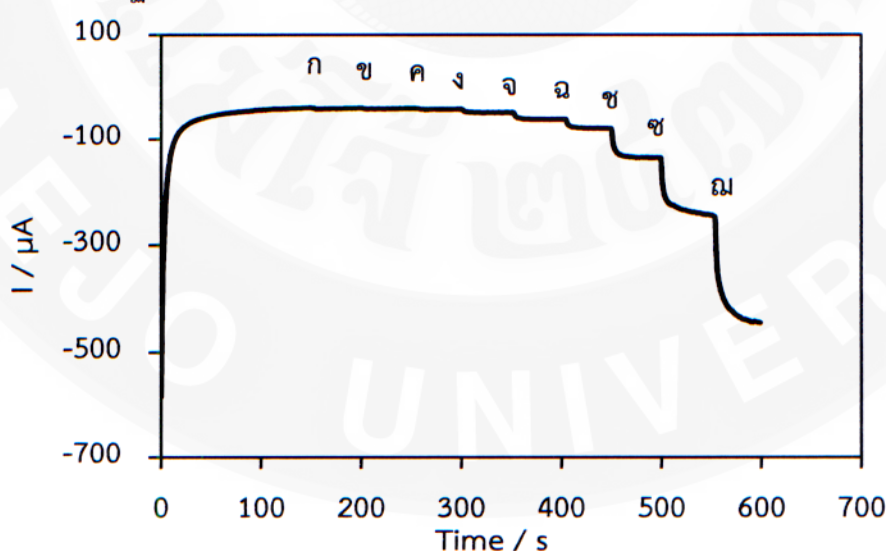
พารามิเตอร์	ช่วงการศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่วัสดุไฟฟ้า	0.2 โวลต์ ถึง -0.7 โวลต์	-0.45 โวลต์
ความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์	1 – 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ความเข้มข้นทองคำนาโนไวร์	1 – 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ความเข้มข้นไทโอนีน	0.1 – 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของชีวไฟฟ้าดัดแปรไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์

ผลการศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

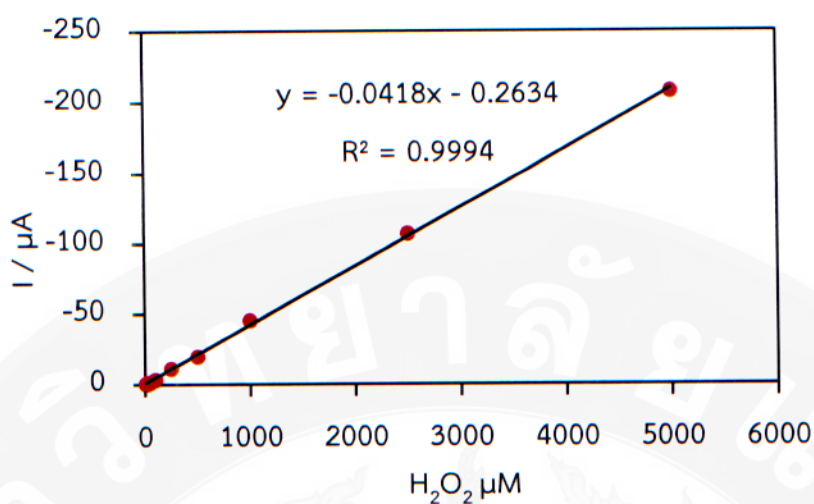
การหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยการนำชีวไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE เป็นชีวไฟฟ้าที่ดีที่สุด มาทำการทดสอบโดยใช้เทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้นต่าง ๆ ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 จะได้แอมเพโรแกรมตามรูปที่ 31 และเมื่อทำการพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (แกน X) กับกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น (แกน Y) กระแสไฟฟ้าที่ได้จะแปรผันตามความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เติมลงไป นั่นคือถ้าความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้น กระแสไฟฟ้าก็จะเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้ชีวไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 1 – 5,000 ไมโครโมลาร์ ($y = -0.0417x - 0.718$, $R^2 = 0.9994$) ดังรูปที่ 32 หากมีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้กระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากสารละลายเกิดการอิ่มตัว ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีการเกิดแบบย้อนกลับ



รูปที่ 31 แอมเพโรแกรมของชีวไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ที่มีการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ความเข้มข้นที่เติม (ก) 10 (ข) 25 (ค) 50 (ง) 100 (จ) 250 (ฉ) 500 (ช) 1,000 (ซ) 2,500 และ (ฌ) 5,000 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่ความเข้มข้น 10 – 5,000 ไมโครโมลาร์

ผลการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection : LOD)

จากการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ซึ่งหาได้จากสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจสอบสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาแทนค่า y ลงในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน แล้วทำการคำนวณตามวิธีของ Miller [27] พบว่าได้ขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 3.80 ไมโครโมลาร์ และเปรียบเทียบ Linearity และ LOD ของเซนเซอร์กับงานวิจัยอื่น ๆ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัดของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์กับงานวิจัยอื่น ๆ

การปรับปรุง	ช่วงความเป็นเส้นตรง / มิลลิโมลาร์	ขีดจำกัดการตรวจวัด / ไมโครโมลาร์	อ้างอิง
PQ11-AgNPs/GCE	0.1-180	33.9	[28]
AgNP/rGO-benzylamine	0.1-100	31.3	[29]
ERGO-Ag/GCE	0.1-100	1.6	[28]
PPy/Mn NWs	0.005-0.09	2.1	[30]
CuxO/Ppy/rGO	0.1-100	0.03	[31]
Graphene-AgNPLs	0.02-10	3	[32]
PDDA-rGO/AgNPs/GCE	0.1-41	35	[33]
AgNPs-MWCNT/Au	0.05-17	0.5	[34]
AgNP/GO/ssDNA/AuE	0.1-20	1.9	[35]
Go/MnO ₂	0.005-0.6	0.8	[36]
CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE	0.01-10	3.8	รายงานนี้

ผลการศึกษาการวัดซ้ำ (Repeatability)

นำขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ทำการตรวจวัดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ทำการทดลอง 7 ครั้ง พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.52 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การศึกษาการวัดซ้ำ (Repeatability)

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (μA)
1	-134.00
2	-133.00
3	-132.00
4	-128.00
5	-128.00
6	-129.00
7	-128.00
ค่าเฉลี่ย	-130.28
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	± 5.89
ค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	± 4.52

ผลการศึกษาค่าการประเมินซ้ำ (Reproducibility)

นำขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE จำนวน 7 ขั้วไฟฟ้า ทำการตรวจวัดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 จากนั้นนำสัญญาณที่วัดได้ไปหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ได้ผลดังตารางที่ 7 พบว่า % RSD ที่ได้มาไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาค่าการประเมินซ้ำ (Reproducibility)

ขั้วที่	กระแสไฟฟ้าที่วัดได้ (μA)				ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
1	-130.3	-129.9	-127.4	-129.2	± 1.57	± 1.21
2	-123.6	-122.5	-127.6	-124.5	± 2.68	± 2.15
3	-125.7	-127.7	-125.0	-126.1	± 1.40	± 1.11
4	-125.8	-126.2	-128.4	-126.8	± 1.40	± 1.10
5	-131.6	-131.5	-129.3	-130.8	± 1.30	± 0.99
6	-131.4	-131.7	-132.8	-131.9	± 0.73	± 0.55
7	-135.7	-135.7	-134.2	-135.2	± 0.86	± 0.64
			เฉลี่ย	-129.2	± 1.42	± 1.11

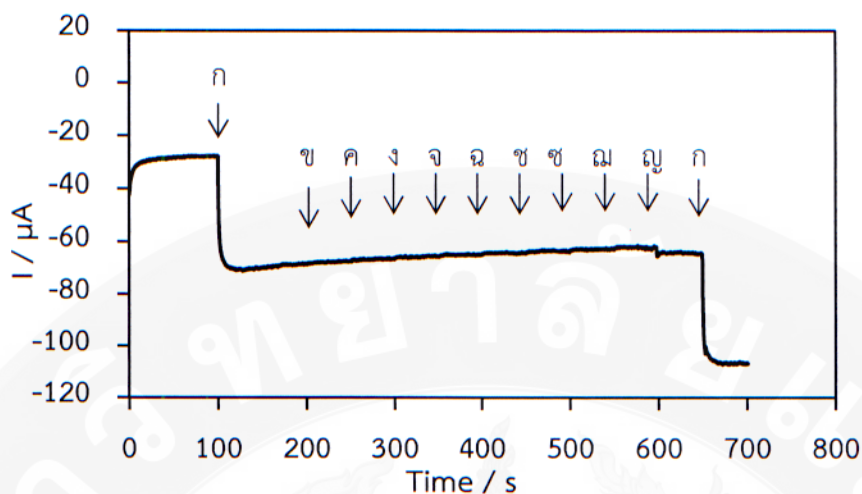
ผลการศึกษาตัวรบกวน (Interference)

การศึกษาคตัวรบกวนทำโดยการนำขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ที่ใช้ในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาทำการทดสอบกับสารรบกวน 9 ชนิดคือ กรดแอสคอร์บิก กลูโคส โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไนเตรต โซเดียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ กรดยูริก คาเฟอีน กรดออกซาลิก ทำการทดสอบโดยใช้เทคนิคแอมเปอร์โอเมทรี โดยเติมสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่รบกวน จากผลการทดลองหากกระแสไฟฟ้าที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสามเท่าของกระแสพื้นแสดงว่าสารนั้นรบกวนการทำงานของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาสารรบกวน

สารรบกวน	ความเข้มข้นน้อยสุดที่รบกวน (มิลลิโมลาร์)
กรดแอสคอร์บิก ($C_6H_8O_6$)	45.0
กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	150
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	100
โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	75.0
โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)	22.5
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	150
กรดยูริก ($C_5H_4N_4O_3$)	0.900
คาเฟอีน ($C_8H_{10}N_4O_2$)	2.40
กรดออกซาลิก ($C_2H_2O_4$)	4.50

เมื่อนำความเข้มข้นต่ำสุดที่รบกวนของสารนั้นมาทดลองฉีดลงไปในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เพื่อทดสอบการรบกวนซ้ำได้ผลดังรูปที่ 33 โดยฉีดสารตัวอย่าง H_2O_2 ที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ ก่อนแล้วจึงทำการฉีดสารรบกวนที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ได้จากตารางที่ 8 ซึ่งพบว่าเซนเซอร์ยังให้ประสิทธิภาพต่อ H_2O_2 ทั้งก่อนฉีดตัวรบกวน (รูปที่ 33 ก หัว) และหลังฉีดตัวรบกวน (รูปที่ 33 ก ท้าย) ให้ผลการทดลองที่ยังมีประสิทธิภาพดี สารรบกวนไม่ส่งผลกระทบบต่อเซนเซอร์นี้

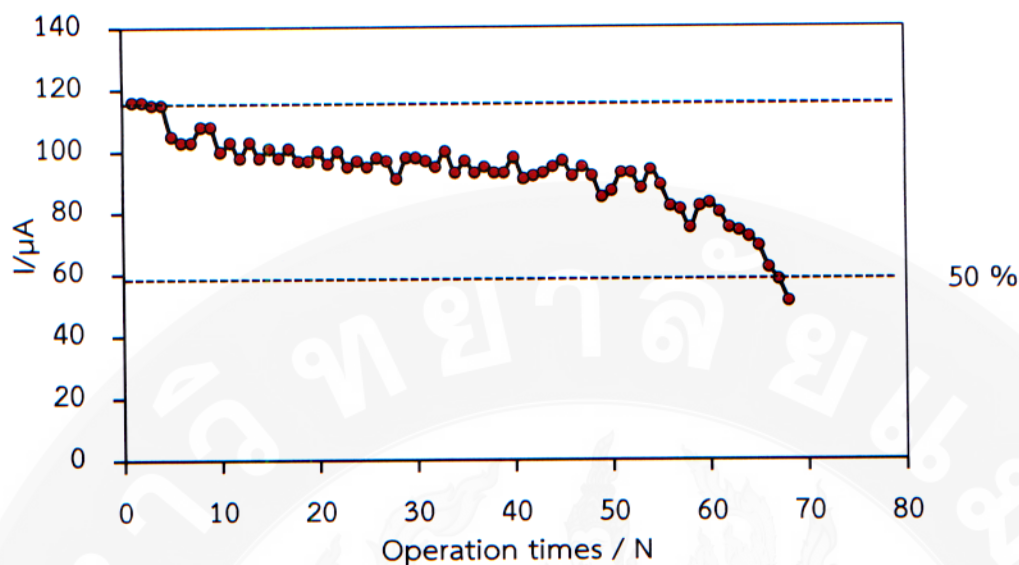


รูปที่ 33 แอมเพโรแกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE

โดยทดสอบกับ (ก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 0.5 แล้วเติมสารรบกวน (ข) กรดแอสคอร์บิก 45 (ค) กลูโคส 150 (ง) โพแทสเซียมคลอไรด์ 100 (จ) โพแทสเซียมไนเตรต 75.0 (ฉ) โซเดียมซัลเฟต 22.5 (ช) โซเดียมคลอไรด์ 150 (ซ) กรดยูริก 0.900 (ณ) คาเฟอีน 2.40 และ (ญ) กรดออกซาลิก 4.50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

การศึกษาอายุการใช้งาน (Life time)

การศึกษาอายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ทำการตรวจสอบการละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 จากนั้นทำการล้างขั้วไฟฟ้าแล้วทำการตรวจวัดเช่นเดิมจนค่ากระแสไฟฟ้าที่ทำการตรวจวัดได้จะลดลงครึ่งหนึ่ง (50 เปอร์เซ็นต์) ของกระแสที่ได้จากการตรวจวัดครั้งแรกดังรูปที่ 34 ซึ่งถือว่าเป็นการสิ้นสุดอายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้า จากการทดลองพบว่าขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE สามารถทำการตรวจวัดได้สูงสุด 68 ครั้ง ดังตารางที่ 9 การตรวจวัดแบบต่อเนื่องอาจมีผลทำให้อายุการใช้งานน้อยกว่าปกติเนื่องจากเวลาที่ทำการตรวจวัดแบบต่อเนื่องขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE จะอยู่ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ตลอดเวลาทำให้เกิดการดูดซับน้ำมากเกินไปจนทำให้เกิดฟิล์มโคโคซานที่สามารถดูดน้ำได้ดีและทำให้สารที่ใช้ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้าอาจหลุดออก



รูปที่ 34 ผลการศึกษาอายุการใช้งาน

ตารางที่ 9 อายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้า

ครั้งที่	I (μA)	% I	ครั้งที่	I (μA)	% I	ครั้งที่	I (μA)	% I
1	-116	100	24	-97.0	83.6	47	-95.2	81.9
2	-116	100	25	-95.0	81.9	48	-92.5	79.3
3	-115	99.1	26	-98.0	84.5	49	-85.3	73.3
4	-115	99.1	27	-97.0	83.6	50	-87.1	75.0
5	-105	90.5	28	-91.0	78.5	51	-93.8	80.2
6	-103	88.8	29	-98.1	84.5	52	-93.9	80.2
7	-103	88.8	30	-98.2	84.5	53	-88.2	75.9
8	-108	93.1	31	-97.3	83.6	54	-94.3	81.0
9	-108	93.1	32	-95.1	81.9	55	-89.1	76.7
10	-100	86.2	33	-100	86.2	56	-82.2	70.7
11	-103	88.8	34	-93.0	80.2	57	-81.1	69.8
12	-98	84.5	35	-97.2	83.6	58	-75.0	64.7
13	-103	88.8	36	-93.5	80.2	59	-82.0	70.7
14	-98	84.5	37	-95.1	81.9	60	-83.0	71.6
15	-101	87.1	38	-93.2	80.2	61	-80.0	69.0
16	98	84.5	39	-93.3	80.2	62	-75.1	64.7
17	101	87.1	40	-98.4	84.5	63	-74.2	63.8
18	97	83.6	41	91.6	78.5	64	-72.1	62.1
19	97	83.6	42	92.5	79.3	65	-69.1	59.5
20	100	86.2	43	93.1	80.2	66	-62.1	53.5
21	96	82.8	44	95.3	81.9	67	-58.1	50.0
22	100	86.2	45	97.6	83.6	68	-51.2	44.0
23	95	81.9	46	92.2	79.3			

หมายเหตุ % I = เปอร์เซนต์ของค่ากระแสไฟฟ้าเทียบกับการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ครั้งแรก

การศึกษาหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง

นำขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ทำการตรวจสอบสารละลายตัวอย่างโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการนำตัวอย่างทั้งหมด 14 ตัวอย่าง มาทำการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1000 ไมโครโมลาร์ โดยใช้เทคนิคแอมเพโรเมทรีในการตรวจวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายที่เตรียมได้ลงไปในการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 นำกระแสไฟฟ้าที่ได้มาพล็อตกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาตรฐานที่ทำการเติมลงไป ด้วยวิธีถดถอย (Regression method) ซึ่งความเข้มข้นของสารตัวอย่างหาได้จากการลากขยายกราฟ (Extrapolating) ไปตัดแกนความเข้มข้น ได้ผลดังตารางที่ 10

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างทั้ง 14 ชนิด โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Visible spectrophotometry) โดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน 0, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่ทำให้เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีโดยการเติมผสมระหว่างโพแทสเซียมไอโอไดด์กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมโมลิบเดตพาทาเลต 3 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต 3 มิลลิลิตร จะเกิดสารประกอบที่ให้สีเหลือง และสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 351 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพล็อตกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาตรฐานที่ทำการเติมลงไป ด้วย least-square fit ซึ่งความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่หาได้การ extrapolating ไปตัดแกนความเข้มข้น ได้ผลดังตารางที่ 9

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้จากการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเซนเซอร์ดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE เทียบกับวิธีมาตรฐานโดยใช้ UV-Visible spectrophotometry เพื่อการศึกษาความแม่นยำ (t -test) และความเที่ยง (F -test) พบว่าค่า t ที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 0.026 เมื่อเทียบกับตาราง t ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในระดับชั้นความเสรีเท่ากับ 12 ได้ค่า t เท่ากับ 2.055 ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จากการทดลองมีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้จากตาราง t แสดงว่าค่าที่ได้จากทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดสอบความเที่ยง (F -test) พบว่าค่า F ที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 1.051 เมื่อเทียบกับตาราง t ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ $V_1=12$, $V_2=12$ มีค่าเท่ากับ 2.58 จะพบว่าค่าที่ได้จากการทดลองน้อยกว่าค่าที่ได้จากตาราง F แสดงว่าผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานที่ใช้ UV-Visible spectrophotometry ในการตรวจวิเคราะห์และการตรวจวิเคราะห์ด้วยเซนเซอร์ดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ที่พัฒนาขึ้นมานั้นให้ผลการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าเซนเซอร์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมานั้นมีประสิทธิภาพเทียบเท่าเครื่องมือมาตรฐาน

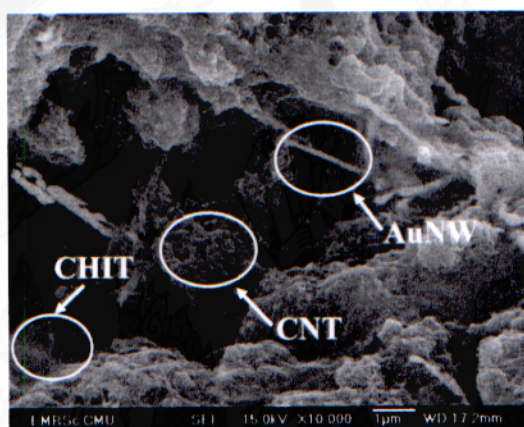
ตารางที่ 10 ผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2 ในตัวอย่าง โดยวิธีไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE เทียบกับเครื่อง Spectrophotometer

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่ตรวจพบ		t-test 95 เปอร์เซ็นต์		F-test 95 เปอร์เซ็นต์	
	เซนเซอร์ (โมลาร์)	สเปกโตร โฟโตเมทรี (โม ลาร์)	ค่าจาก ตาราง	ค่าจากการ คำนวณ	ค่าจาก ตาราง	ค่าจากการ คำนวณ
ยาย้อมผมดีแคช มาสเตอร์แมส	1.29	1.44	2.055	0.026	2.580	1.051
ยาย้อมผมเบอร์รี่	1.30	1.28				
ยาย้อมผมโลแลน คูลแอนไอซี	0.899	0.900				
ยาย้อมผมจัสท์โมเดิร์น	3.70	3.48				
น้ำทับทิม Tipco	ND	0.009				
น้ำแอปเปิ้ล Tipco	0.013	0.011				
น้ำส้มสายน้ำผึ้ง Tipco	0.016	0.092				
น้ำยاب้วนปากกลิสเตอร์ คูลมินท์	0.007	0.008				
น้ำยاب้วนปากฟลูออราไรล	0.005	0.005				
น้ำยاب้วนปากคอลเกตพลักซ์	0.009	0.009				
ยาล้างแผลศิริบุญชา	0.344	0.358				
ยาล้างแผลเบตาดีน	0.067	0.065				
ยาล้างแผลเซฟทิล	0.088	0.088				
ยาล้างแผลไฟตั้น	0.053	0.057				

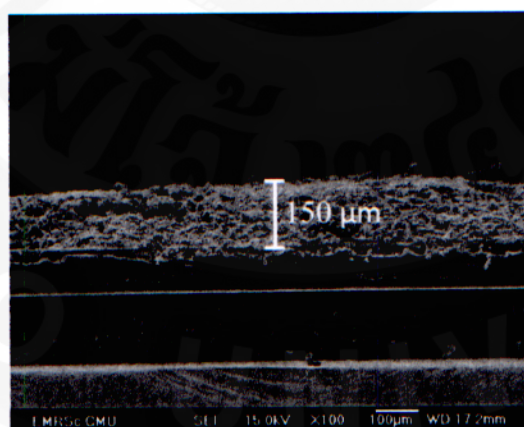
อัลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์

การตรวจสอบคุณลักษณะของนาโนไวร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเซนเซอร์ที่สังเคราะห์จากตอนต้น (CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE) มาปรับปรุงด้วยแอนติอัลฟาฟิโตโปรตีน (anti AFP) เพื่อทดสอบกับสารอัลฟาฟิโตโปรตีน อิมมูโนเซนเซอร์ที่ได้ (CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE) นำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดได้ผลดังรูปที่ 35 พบว่าทองนาโนไวร์ที่ตรงมีลักษณะเป็นเส้นสีขาว คาร์บอนนาโนทิวบ์มีลักษณะกระจุกลง ส่วนโคโคซานมีลักษณะเป็นก้อนสีขาว ส่วนไทโอรินและแอนติอัลฟาฟิโตโปรตีนไม่สามารถมองเห็นได้ เมื่อนำอิมมูโนเซนเซอร์ไปถ่ายภาพด้านข้างเพื่อวัดความหนา ได้ผลดังรูปที่ 36 พบว่าความหนาของอิมมูโนเซนเซอร์หนา 150 ไมโครเมตร



รูปที่ 35 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของสารบนขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

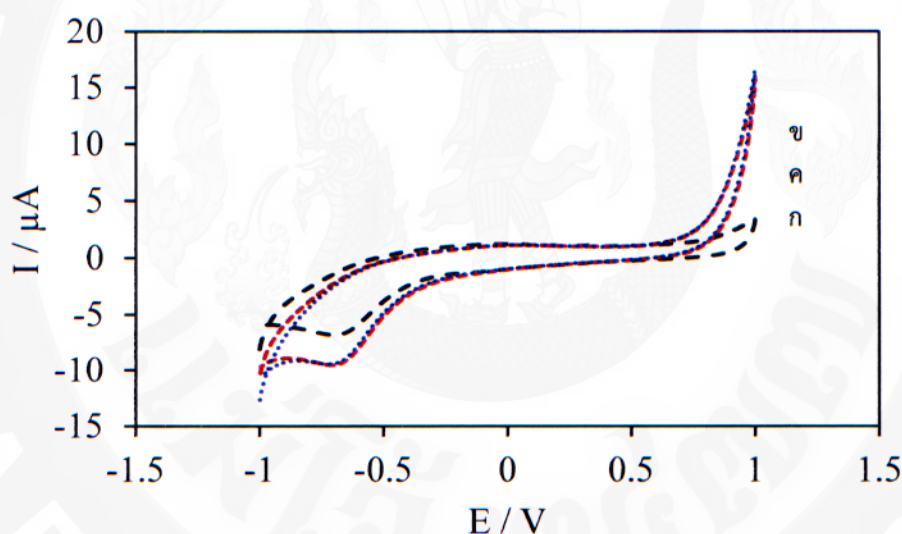


รูปที่ 36 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อวัดความหนาของสารที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าชนิดต่าง ๆ

ขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอนเปลือย (Bare GCE)

นำขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอนเปลือย มาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ได้ผลรูปที่ 37 โดยทดสอบใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอนทดสอบในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ไม่มีพิกัดขึ้นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่สามารถวัดกระแสสูงขึ้นจากการออกซิเดชันสูง $3 \mu\text{A}$ (วัดที่ 0.8 โวลต์) เมื่อทดสอบในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ เกิดกระแสจากการออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นเป็น $7.5 \mu\text{A}$ (วัดที่ 0.8 โวลต์) ซึ่งกระแสสูงขึ้นเท่ากับการทดสอบสารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ส่วนพิกัดที่เกิดขึ้นของทุกพิกัดที่ -0.69 โวลต์ คือพิกัดกักกันของออกซิเจนที่อยู่ในสารละลาย



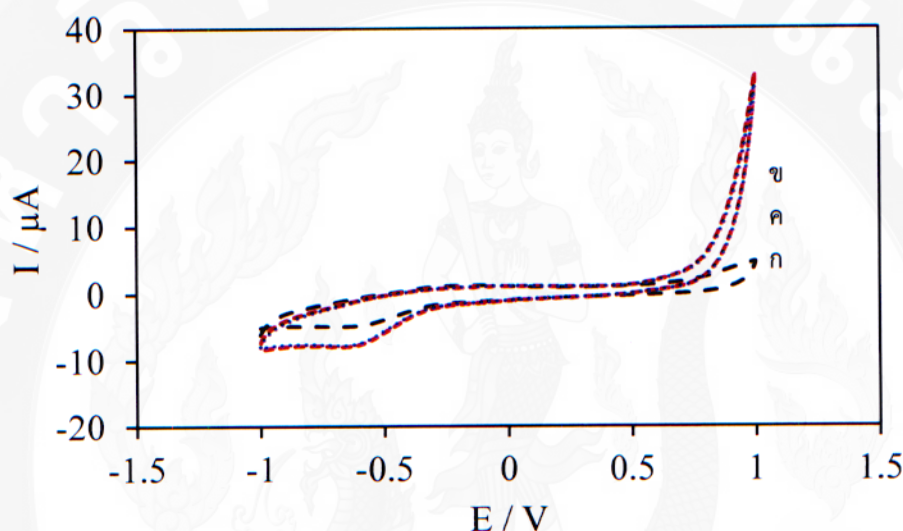
รูปที่ 37 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้ากลาสสิคาร์บอนเปลือย (Bare GCE)

ใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (เส้นปะดำ) (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (เส้นปะแดง) (ค) สารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ (เส้นปะฟ้า)

ขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE

นำขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE มาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ได้ผลดังรูปที่ 38 โดยทดสอบใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE ทดสอบในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ไม่มีพิกัดขึ้นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่สามารถวัดกระแสสูงขึ้นจากการออกซิเดชันสูง 2 μA (วัดที่ 0.8 โวลต์) เมื่อทดสอบในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ เกิดกระแสจากการออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นเป็น 10.8 μA (วัดที่ 0.8 โวลต์) ซึ่งกระแสสูงขึ้นเท่ากับการทดสอบสารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ส่วนพิกัดที่เกิดขึ้นของทุกพิกัดที่ -0.63 โวลต์ คือพิกัดกักกันของออกซิเจนที่อยู่ในสารละลาย



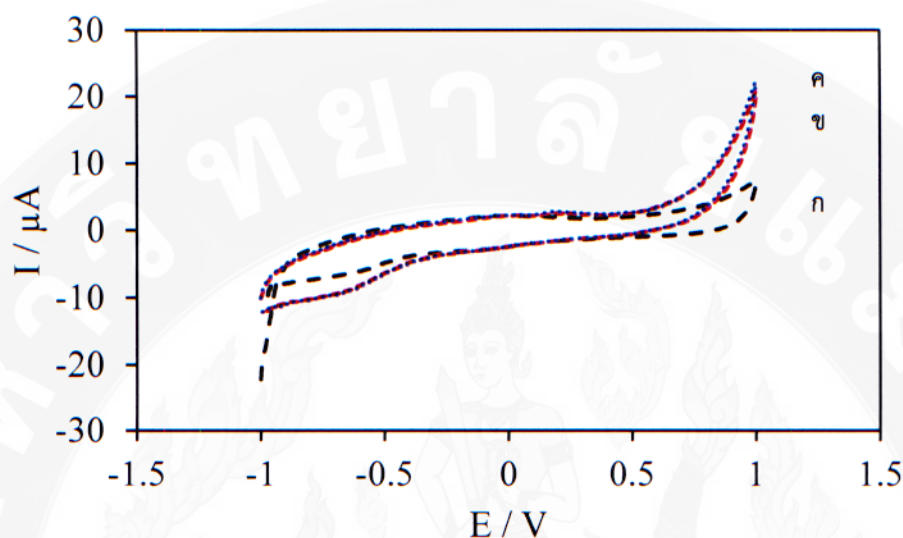
รูปที่ 38 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE

ใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์

ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-anti AFP/GCE

นำขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE มาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ได้ผลดังรูปที่ 39 โดยทดสอบใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าขั้วไฟฟ้า CHIT-anti AFP/GCE ทดสอบในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ไม่มีพิกัดขึ้นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่สามารถวัดกระแสสูงขึ้นจากการออกซิเดชันสูง 2 μA (วัดที่ 0.8 โวลต์) เมื่อทดสอบในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ เกิดกระแสจากการออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นเป็น 10.8 μA (วัดที่ 0.8 โวลต์) ซึ่งกระแสสูงขึ้นเท่ากับการทดสอบสารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัม

ต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ส่วนพิกที่เกิดขึ้นของทุกพิกที่ -0.63 โวลต์ คือพิกรีดักชันของออกซิเจนที่อยู่ในสารละลาย

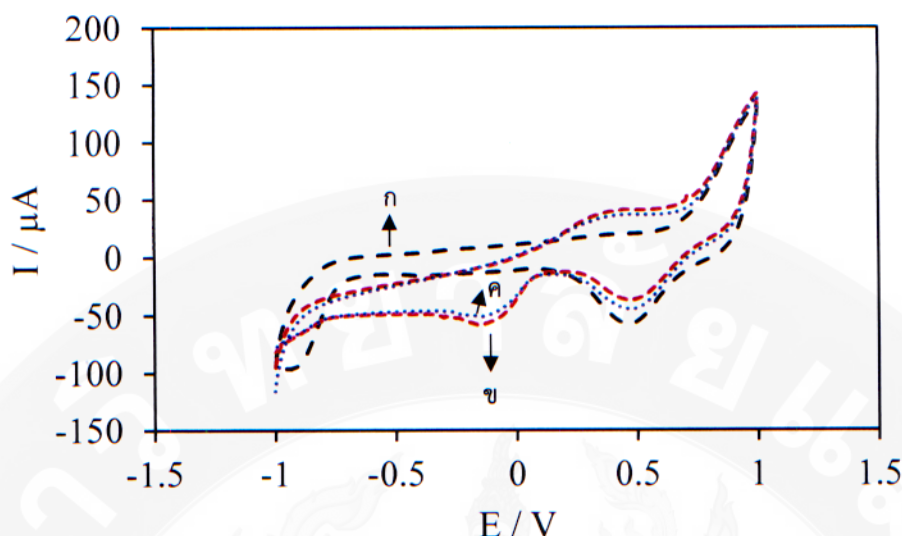


รูปที่ 39 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-anti AFP/GCE

ใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาไพโดโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4

ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-anti AFP/GCE

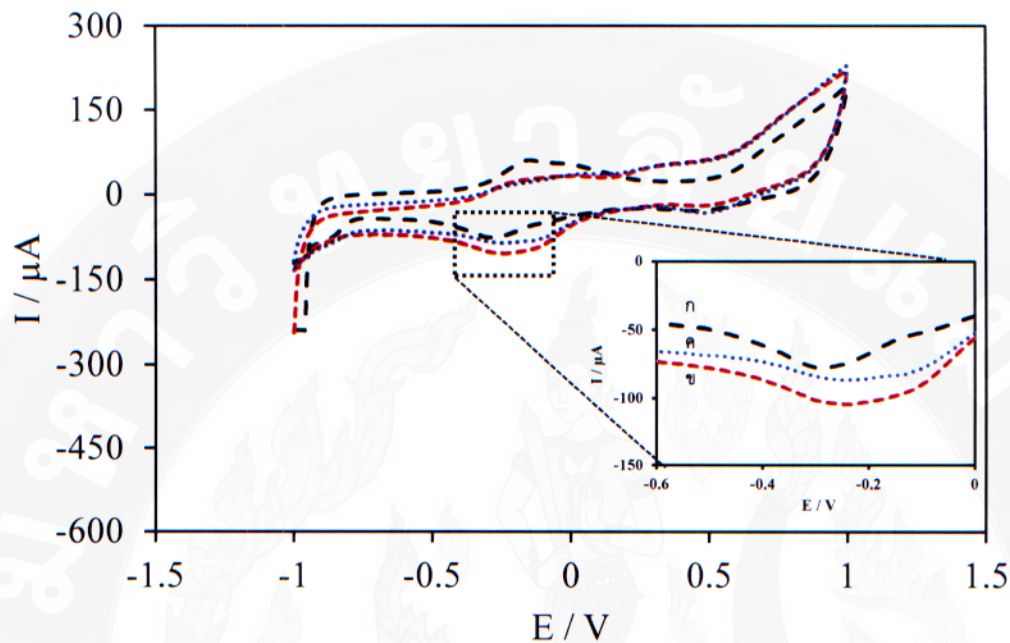
นำขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-anti AFP/GCE มาทดสอบด้วยเทคนิคไชคลิกโวลแทมเมทรี ได้ผลดังรูปที่ 40 โดยทดสอบใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาไพโดโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-anti AFP/GCE ทดสอบในสารละลายฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ไม่มีพิกเกิดขึ้นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่สามารถวัดกระแสสูงขึ้นจากการออกซิเดชันสูง 64.2 μA (วัดที่ 0.85 โวลต์) เมื่อทดสอบในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ เกิดกระแสจากการออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นเป็น 89.7 μA (วัดที่ 0.85 โวลต์) ซึ่งกระแสสูงขึ้นเท่ากับการทดสอบสารละลายแอลฟาไพโดโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ส่วนพิกที่เกิดขึ้นของทุกพิกที่ -0.14 โวลต์ คือพิกรีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และที่ +0.45 โวลต์ คือพิกของปฏิกิริยารีดักชันของนาโนไวร์



รูปที่ 40 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-anti AFP/GCE ใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์

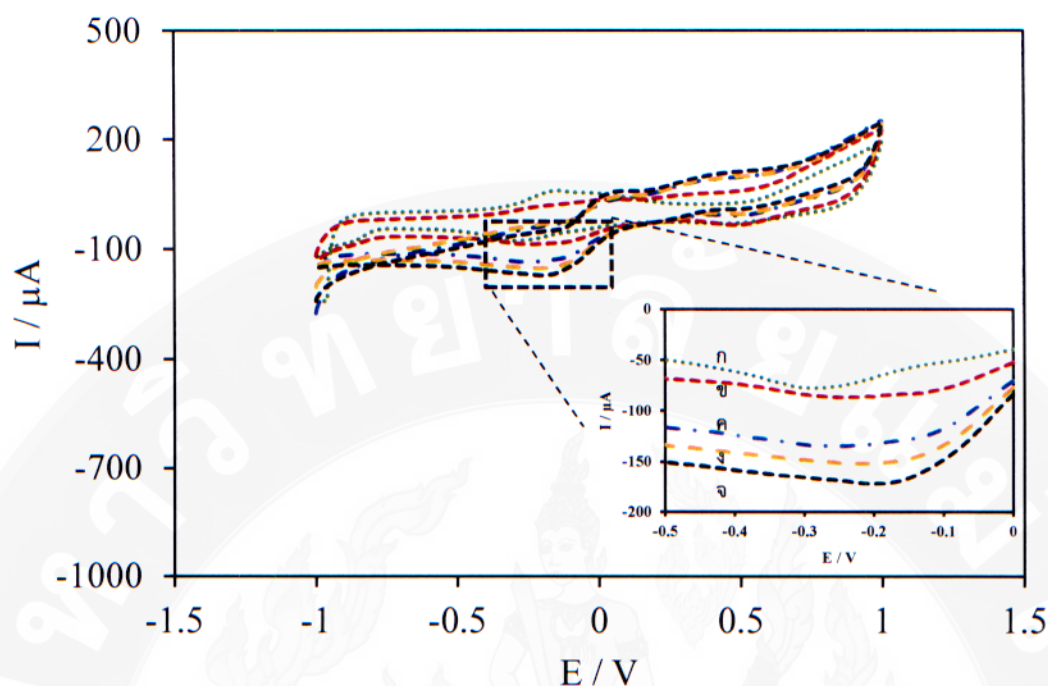
ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE มาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ได้ผลดังรูปที่ 41 โดยทดสอบใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ทดสอบในสารละลายฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ไม่มีพิกัดขึ้นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่สามารถวัดกระแสสูงขึ้นจากการออกซิเดชันสูง 125.2 μA (วัดที่ 0.85 โวลต์) เมื่อทดสอบในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ เกิดกระแสจากการออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นเป็น 151.2 μA (วัดที่ 0.85 โวลต์) ซึ่งกระแสสูงขึ้นเท่ากับการทดสอบสารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ส่วนพิกัดที่เกิดขึ้นของทุกพิกัดที่ -0.25 โวลต์ คือพิกัดการเร่งปฏิกิริยาของไทโอนีนโดยเร่งปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พิกัดของไทโอนีน พบในเส้น ก. ได้กระแสสูง -86.3 μA ซึ่งทดสอบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่วนเส้น ข. มีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีกระแสสูง -104.2 μA แสดงว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยไทโอนีนทำให้ได้กระแสไฟฟ้าสูงขึ้น ส่วนเส้น ค. ทำการเติมสารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรลงในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พบกระแสไฟฟ้าสูง -88 μA ซึ่งกระแสที่ลดลงนี้เป็นผลเนื่องมาจากแอลฟาพิโตโปรตีนจับกับแอนติอัลฟาพิโตโปรตีน ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าทำปฏิกิริยาได้น้อยลง



รูปที่ 41 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ใน (ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ข) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (ค) สารละลายแอลฟาพิโตโปรตีน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ภาพเล็กคือภาพขยายให้เห็นความแตกต่างของปฏิกิริยารีดักชัน

เมื่อนำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE มาทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากขึ้นจาก 0 มิลลิโมลาร์ จนถึง 20 มิลลิโมลาร์ เพื่อแสดงว่าขั้วไฟฟ้านี้ยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 42 พบว่ากระแสไฟฟ้าสูงขึ้นจากความเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ (เส้น ก) และสูงขึ้นตามลำดับจนถึงความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (เส้น จ)



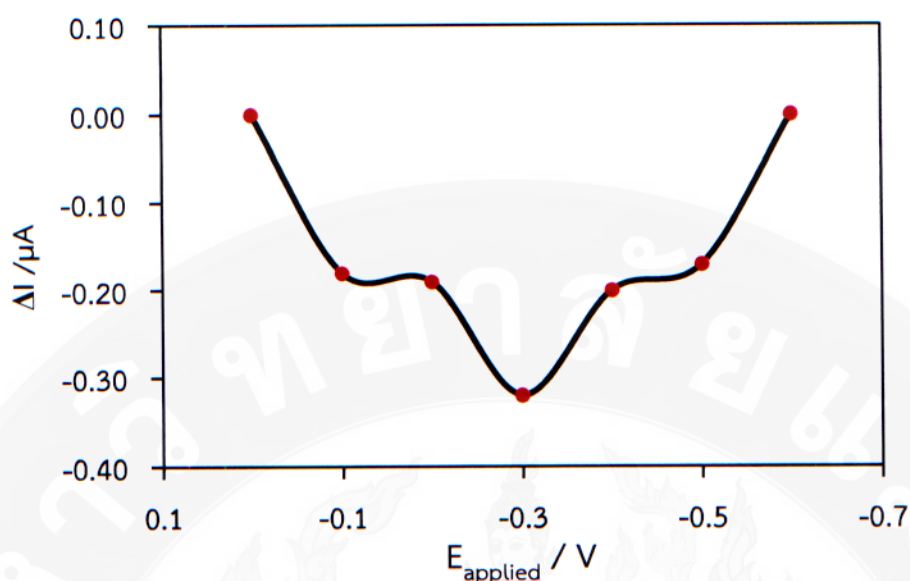
รูปที่ 42 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ตรวจวัดในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่าง ๆ

โดย (ก) 0 (ข) 5 (ค) 10 (ง) 15 และ (จ) 20 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

ทดสอบตัวแปรต่าง ๆ

ผลการทดสอบค่าศักย์ไฟฟ้า

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE มาทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาไพโดโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยโครโนแอมเปโรเมทรี โดยทำการเปลี่ยนค่าศักย์ไฟฟ้าจาก 0.0 โวลต์ จนถึง -0.80 โวลต์ แล้วทำการวาดกราฟเทียบกับผลต่างของกระแสกับกระแสพื้น (ΔI) ได้ผลดังรูปที่ 43 พบว่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ค่อย ๆ สูงขึ้นจากศักย์ไฟฟ้า 0.0 โวลต์ และสูงสุดที่ -0.30 โวลต์ มีกระแสไฟฟ้าสูง -0.32 μA หลังจากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ แม้ว่าจะให้ศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นก็ตาม ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.30 โวลต์ ถูกเลือกใช้ในการทดลองต่อไป

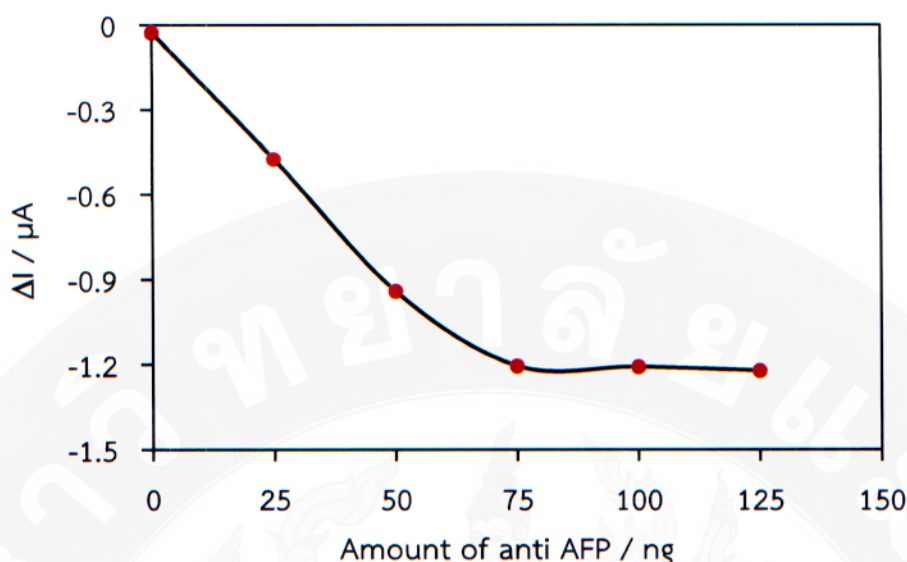


รูปที่ 43 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัด AFP ของขั้ว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

ทดสอบโดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟีโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาปริมาณแอนติแอลฟาฟีโตโปรตีนที่เหมาะสมในการปรับปรุงขั้วไฟฟ้า

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE มาทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟีโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ โดยทำการตรึงโดยใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟีโตโปรตีนจาก 0 – 125 นาโนกรัม แล้วทำการวาดกราฟเทียบกับผลต่างของกระแสกับกระแสพื้น (ΔI) ได้ผลดังรูปที่ 44 พบว่ากระแสไฟฟ้าสูงขึ้นเรื่อย ๆ จากการไม่ใช้แอนติแอลฟาฟีโตโปรตีนจาก 0 นาโนกรัม จนถึงสูงสุด 75 นาโนกรัม ได้กระแสสูง -1.20 ไมโครแอมแปร์ เมื่อเพิ่มปริมาณของแอนติแอลฟาฟีโตโปรตีนสูงขึ้นเป็น 100 และ 125 นาโนกรัม กระแสไฟฟ้าที่ได้ก็ไม่สูงขึ้นอีกดังนั้นจึงเลือกใช้แอนติแอลฟาฟีโตโปรตีนที่ 75 นาโนกรัม ในการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

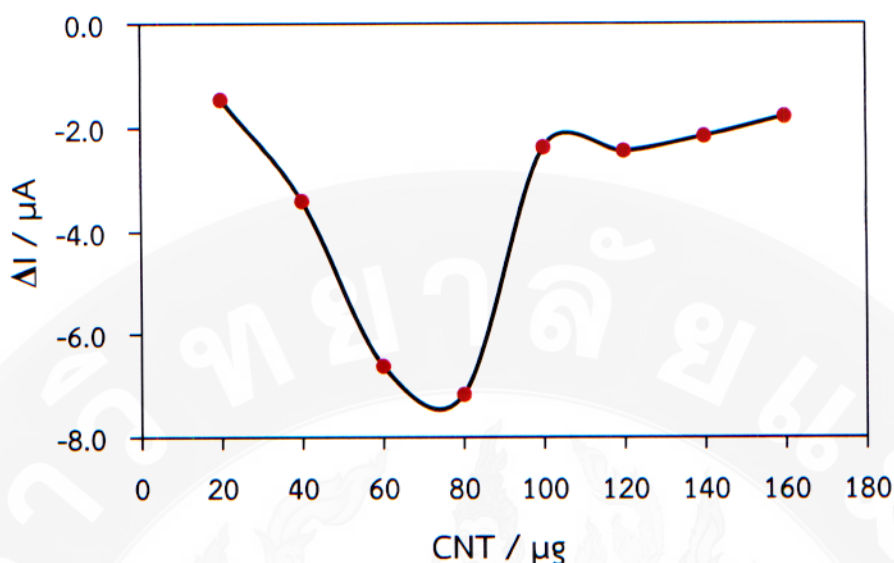


รูปที่ 44 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนที่ใช้ในการตรึงบนขั้ว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

ทดสอบโดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสมในการปรับปรุงขั้วไฟฟ้า

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE มาทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ทำการปรับเปลี่ยนปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์จาก 20 – 160 ไมโครกรัม แล้วทำการวาดกราฟเทียบกับผลต่างของกระแสกับกระแสพื้น (ΔI) ได้ผลดังรูปที่ 45 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 20 ไมโครกรัม ได้กระแส -1.82 ไมโครแอมแปร์ เมื่อเพิ่มปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์สูงขึ้นพบว่าได้กระแสสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดที่ -7.25 ไมโครแอมแปร์ โดยใช้ปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 100 – 160 ไมโครกรัม พบว่ากระแสไฟฟ้าลดลงจากการใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ในระดับเดียวกันคือ -2.1 – 2.0 ไมโครแอมแปร์ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่สูงขึ้นทำให้ความต้านทานสูงขึ้นเป็นผลให้ได้กระแสไฟฟ้าลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ในการตรึงต่อไป

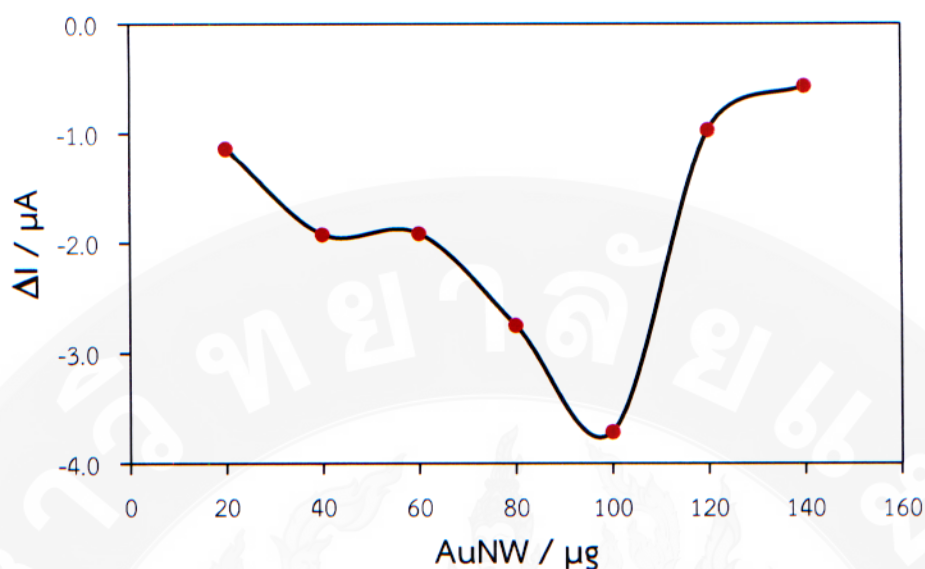


รูปที่ 45 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในการตรึงบนขั้ว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

ทดสอบโดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี ให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.30 โวลต์ ใช้แอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาปริมาณทองคำนาโนไวร์ที่เหมาะสมในการปรับปรุงขั้วไฟฟ้า

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE มาทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม โดยเปลี่ยนปริมาณของทองคำนาโนไวร์ในช่วง 20 – 140 ไมโครกรัม แล้วทำการวาดกราฟเทียบกับผลต่างของกระแสกับกระแสพื้น (ΔI) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 46 พบว่าเมื่อใช้ทองคำนาโนไวร์ที่ 20 ไมโครกรัม ได้กระแสไฟฟ้าสูง -1.15 ไมโครแอมแปร์ เมื่อเพิ่มปริมาณของทองคำนาโนไวร์มากขึ้นพบว่าได้กระแสที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดที่ -3.7 ไมโครแอมแปร์ โดยใช้ทองคำนาโนไวร์ที่ 100 ไมโครกรัม หลังจากนั้นพบว่าเมื่อใช้ทองคำนาโนไวร์สูงขึ้นเป็น 120 และ 140 ไมโครกรัม ได้กระแสลดลงเป็น -0.96 และ -0.54 ไมโครแอมแปร์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้ทองคำนาโนไวร์ที่ 100 ไมโครกรัม ในการตรึงสำหรับการทดลองต่อไป

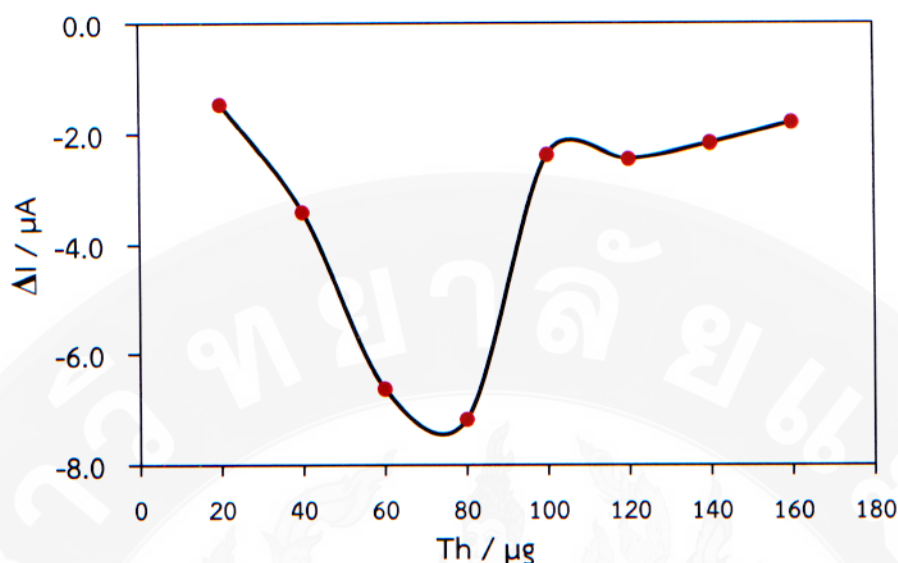


รูปที่ 46 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับปริมาณของทองคำนาโนไวร์ในการตรึงบนขั้ว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

ทดสอบโดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี ให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.30 โวลต์ ใช้แอนติแอลฟาฟิโตโปรตีน ตรึงที่ 75 นาโนกรัม และปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาปริมาณไทโอนีนที่เหมาะสมในการปรับปรุงขั้วไฟฟ้า

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE มาทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ 100 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณไทโอนีนในช่วง $20 - 160$ ไมโครกรัม แล้วทำการวาดกราฟเทียบกับผลต่างของกระแสกับกระแสพื้น (ΔI) ได้ผลดังรูปที่ 47 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณของไทโอนีนที่ 20 ไมโครกรัม ได้กระแส -1.46 ไมโครแอมแปร์ เมื่อเพิ่มปริมาณของไทโอนีนสูงขึ้น ได้กระแสไฟฟ้าสูงขึ้นจนสูงสุดที่ -7.18 ไมโครแอมแปร์ (ใช้ปริมาณของไทโอนีน ที่ 80 ไมโครกรัม) หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณของไทโอนีนสูงขึ้นในช่วง $100 - 160$ ไมโครกรัม พบกระแสอยู่ในช่วง $-2.1 - -1.81$ ไมโครแอมแปร์ ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณของไทโอนีนที่ 80 ไมโครกรัม ที่ให้กระแสสูงที่สุดในการตรึงขั้วไฟฟ้าเพื่อทดลองต่อไป



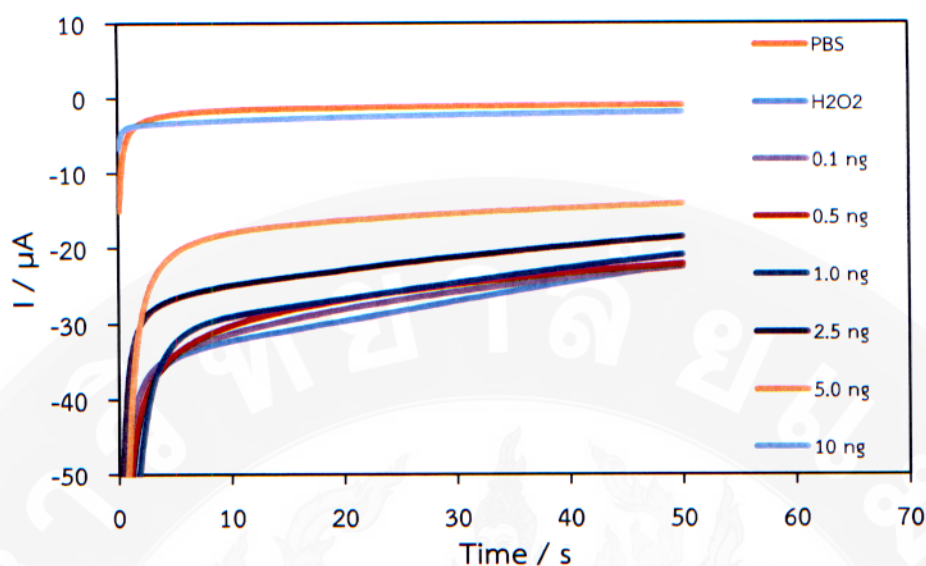
รูปที่ 47 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับปริมาณของไทโอนีนที่ใช้ในการตรึงบนขั้ว CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

ทดสอบโดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี ให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.30 โวลต์ ใช้แอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม และปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ที่ 100 ไมโครกรัม ทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การหาคุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์

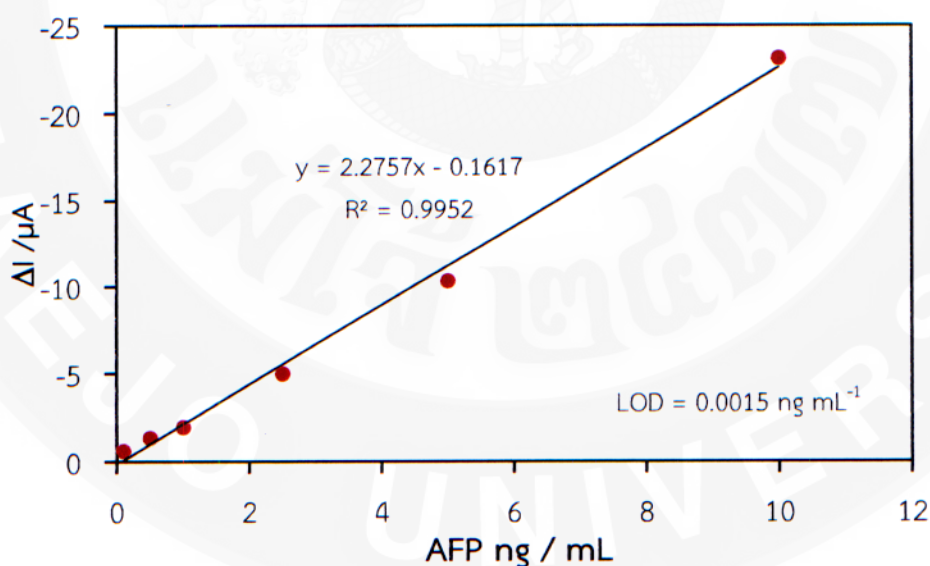
ผลการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ 100 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณไทโอนีน 80 ไมโครกรัม มาทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน ในช่วง $0.1 - 10$ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังรูปที่ 48 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นที่สูงขึ้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนทำให้กระแสไฟฟ้าสูงขึ้น เมื่อนำความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนไปวาดกราฟกับผลต่างของกระแสไฟฟ้า (ΔI) ได้ผลดังรูปที่ 49 ซึ่งพบว่าได้ความสัมพันธ์ตามสมการ $y = 2.2757 (\text{ng mL}^{-1})x + 0.1617$ ($R^2 = 0.9952$) เมื่อนำค่าไปคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) โดยใช้ $S/N = 3$ พบว่าได้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.015 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 15 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 48 โครโนแอมเปอร์แกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ทดสอบกับ AFP ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

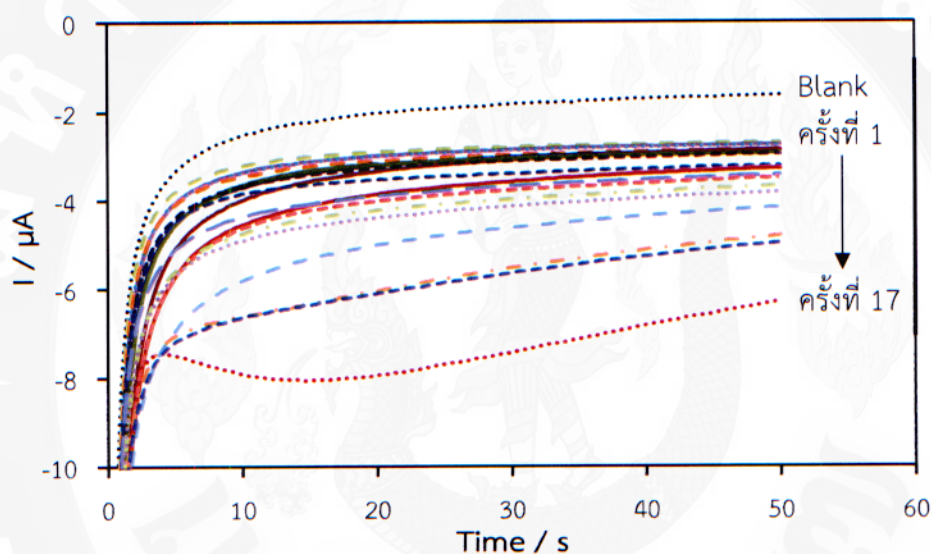
ให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.30 โวลต์ ใช้แอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม และปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ที่ 100 ไมโครกรัม และปริมาณของไทโอนีนที่ 80 ไมโครกรัม



รูปที่ 49 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนกับกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

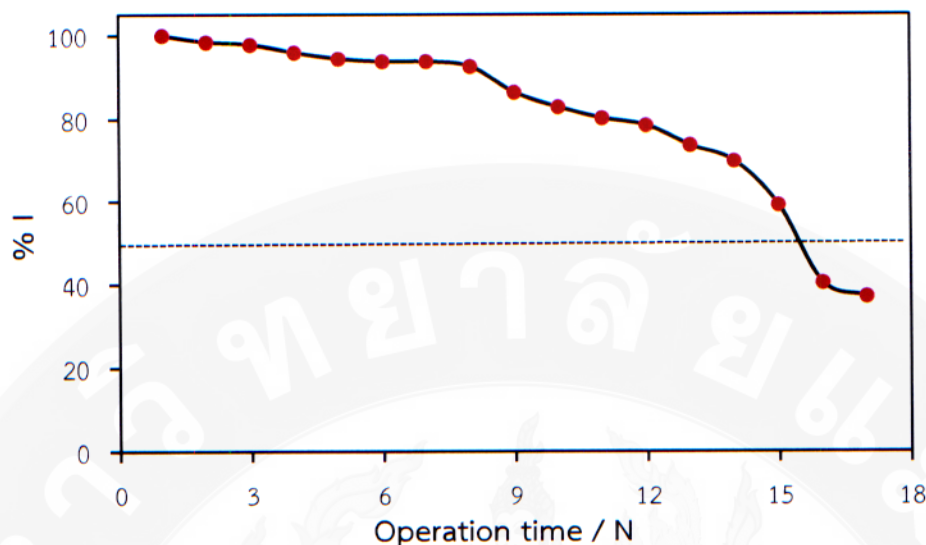
ผลการทดสอบอายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุง

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ 100 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณไทโอนีน 80 ไมโครกรัม มาทดสอบในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบทั้งหมด 17 ครั้งโดยทำการรบกวนกันไปเรื่อย ๆ ได้ผลดังรูปที่ 50 เมื่อนำกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ครั้งแรกโดยคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ไปวาดกราฟเทียบกับครั้งที่ทดลองได้ผลดังรูปที่ 51 ขั้วไฟฟ้านี้มีเปอร์เซ็นต์ลดลงเป็น 50 เปอร์เซ็นต์จากครั้งแรก พบว่าขั้วไฟฟ้านี้มีอายุการใช้งาน 15 ครั้ง



รูปที่ 50 โครโนแอมเพโรแกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ทดสอบกับ AFP ที่ความเข้มข้น 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

ให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.30 โวลต์ ใช้แอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม และปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ที่ 100 ไมโครกรัม และปริมาณของไทโอนีนที่ 80 ไมโครกรัม

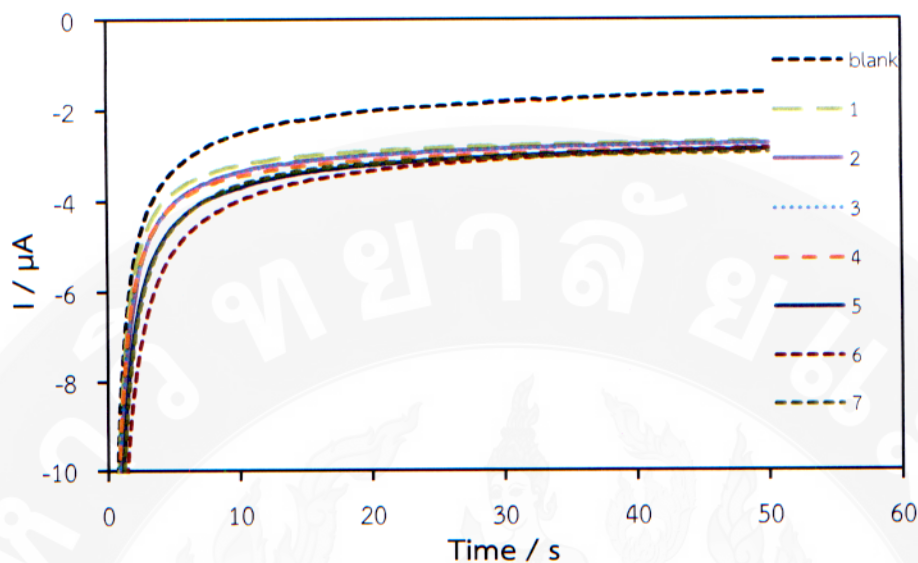


รูปที่ 51 กราฟระหว่างจำนวนครั้งที่วิเคราะห์เทียบกับเปอร์เซ็นต์การลดลงของกระแสเมื่อเทียบกับครั้งแรกของชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

ทดสอบกับ AFP เข้มข้น 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

ผลการทดสอบการทำให้เข้าของการวัดของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุง

นำชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ 100 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณไทโอนีน 80 ไมโครกรัม มาทดสอบในสารละลายแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ โดยทำการทดสอบทั้งหมด 7 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 52 เมื่อนำกระแสไฟฟ้าที่ได้ของครั้งที่ 1 – 7 โดยวัด ณ เวลาที่ทดลอง 30 วินาทีของโครโนแอมเพโรแกรม ไปคำนวณเพื่อหาค่าการทำซ้ำ ได้ผลการคำนวณดังตารางที่ 11 ซึ่งมีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 2.56 % RSD



รูปที่ 52 โครโนแอมเพโรแกรมของขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ทำการวัดซ้ำทั้งหมด 7 ซ้ำ

ทดลองในสารละลายที่มีอัลฟาฟิโตโปรตีนความเข้มข้น 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2.5 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 11 การศึกษาการวัดซ้ำ (Repeatability)

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (μA)
1	-4.224
2	-4.160
3	-4.134
4	-4.0545
5	-3.992
6	-3.963
7	-3.962
ค่าเฉลี่ย	-4.070
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	± 0.104
ค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	2.56

ผลการทดสอบการผลิตซ้ำของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงขึ้น (Reproducibility)

นำชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ทดสอบด้วยโครโนแอมเปอร์เมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรงที่ 75 นาโนกรัม ใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ 100 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณไทโอนีน 80 ไมโครกรัม มาทดสอบในสารละลายแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ โดยทุกครั้งที่จะทดลองจะทำการประดิษฐ์ชีวใหม่ทุกครั้ง เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าการประเมินซ้ำได้ผลดังตารางที่ 12 ซึ่งพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 8.51 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าการผลิตซ้ำของชีวไฟฟ้าปรับปรุงนี้เป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 12 ผลการศึกษาค่าการประเมินซ้ำ (Reproducibility)

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (μA)
1	-0.864
2	-0.863
3	-0.772
4	-0.704
5	-0.829
ค่าเฉลี่ย	-0.806
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	± 0.069
ค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	8.51

การเทียบคุณลักษณะกับชีวไฟฟ้าอื่น ๆ

นำคุณลักษณะของชีวไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE สำหรับตรวจวัดแอลฟาฟิโตโปรตีน เทียบกับคุณลักษณะของชีวไฟฟ้าอื่น ๆ ที่สืบค้นจากงานวิจัยอ้างอิงอื่น พบว่าอิมมูโนเซนเซอร์นี้มี LOD เท่ากับ 0.015 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Zhao และคณะ [37] มีช่วงความเป็นเส้นตรง $0.1 - 10$ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Qi และคณะ [38] คุณลักษณะอื่น ๆ เทียบกับงานวิจัยอื่นได้ดังตารางที่ 13

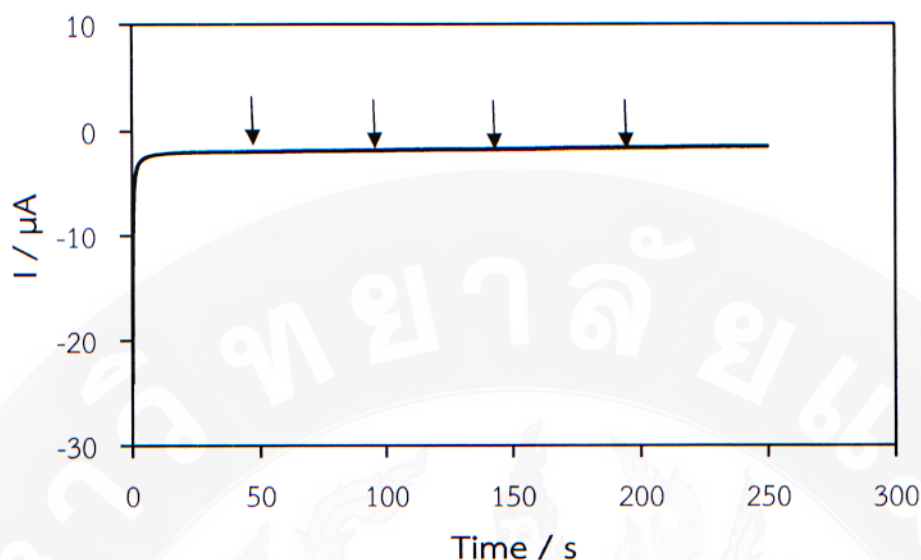
ตารางที่ 13 เปรียบเทียบคุณลักษณะของอิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาได้กับงานวิจัยอื่น

ไบโอเซนเซอร์	เทคนิค	ศักย์ไฟฟ้าที่ ให้ / โวลต์	ช่วงความเป็น เส้นตรง / นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร	ขีดจำกัด การ ตรวจวัด / นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร	ค่าการผลิต ซ้ำ / เปอร์เซ็นต์	อ้างอิง
MGCE/Fe ₃ O ₄ @Au NPs- Ab1/AFP/Ab2-Au NPs-HRP	Amp	-0.2	20 to 100	0.64	5.22 (N=4)	[39]
BSA/anti-AFP/SnO ₂ /Au/RGO/GCE	DPV	-0.6 to 0.0	0.02 to 50	0.01	4.49 (N=3)	[40]
IrOx/CS/GCE	CVs	-0.4 to 0.8	1.0 to 250	0.3	< 5.(N=4)	[41]
MGCE/Fe ₃ O ₄ -E-PL-Hep/anti-AFP	DPV	-0.1 to 0.6	0.1 to 100	0.072	1.00 (N=5)	[42]
GCE/graphene- Ab1/BSA/antigen/Au-Pd-Ab2	Amp	-0.4	0.05 to 30	0.005	4.70 (N=5)	[37]
PdNi/N-GNRs- Ab2/AFP/BSA/Ab1/CD-GS/GCE	Amp	-	0.0001 to 16	0.00003	< 5.(N=5)	[43]
Fe ₃ O ₄ -MSN-HRP-Ab2.	CV	-0.6 to 0.6	0.01 to 25	0.004	< 5.(N=5)	[44]
GCE/Pd-rGO/anti-AFP/BSA/AFP	DPV	-1.0 to 0.6	0.01 to 12	0.005	4.70 (N=5)	[38]
Ab/DAC-IL	DPV	-0.1 to 0.6	0.1 to 60	0.07	5.50 (N=5)	[45]
Anti AFP-CHIT-Th-CNT- AuNW/GCE	Amp	-0.3	0.1 to 10	0.015	8.51	TW

ตัวย่อ Ab1 = primary antibody, Ab2 = secondary antibody, AFP = alpha fetoprotein, anti-AFP = α -fetoprotein antibody, Au = gold, Au NPs = gold nanoparticles, AuNW = gold nanowire, BSA = bovine serum albumin, CD-GS = β -cyclodextrins functionalized graphene sheets, CHIT = chitosan, CNT = carbon nanotubes, CS = chitosan, DAC-IL = dialdehyde cellulose/ionic liquid composite film, Fe₃O₄ = iron oxide magnetic nanoparticles, GCE = glassy carbon electrode, GNRs = N-doped graphene nanoribbons, Hep = heparin, HRP = horseradish peroxidase, IrOx = iridium oxides, MGCE = magnetic glassy carbon electrode, MSN = mesoporous silica nanoparticles, Ni = nickel, Pd = palladium, Pd-rGO = palladium-reduced graphene oxide, RGO = reduced graphene oxide, SnO₂ = tin dioxide, Th = thionine and TW = this work

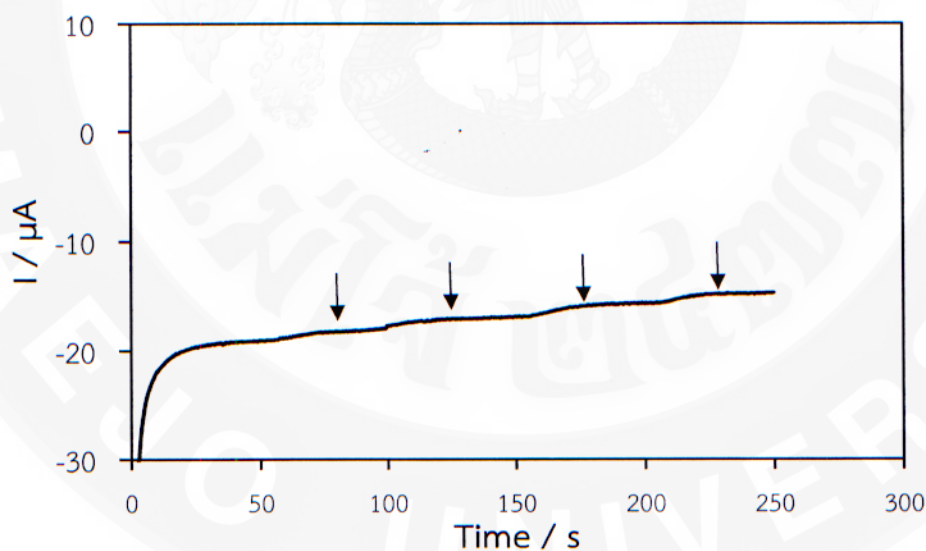
ผลการทดสอบสารละลายไอออนรบกวน (Interference)

นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวที่ 80 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณของทองนาโนไวร์ 100 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณไทโอนีน 80 ไมโครกรัม มาทดสอบในสารละลายแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ โดยทดสอบในสารละลาย กลูโคส (C₆H₁₂O₆) ได้ผลดังรูปที่ 53 คาเฟอีน (C₈H₁₀N₄O₂) ได้ผลดังรูปที่ 54 โดปามีน (C₈H₁₁NO₂) ได้ผลดังรูปที่ 55 กรดยูริก (C₅H₄N₄O₃) ได้ผลดังรูปที่ 56 แอสคอร์บิก (C₆H₈O₆) ได้ผลดังรูปที่ 57 หลังจากนั้นจึงทดสอบซ้ำอีกครั้งกับสารแอลฟาฟิโตโปรตีนได้ผลดังรูปที่ 58 โดยทดสอบกับสารรบกวนด้วยเพื่อพิสูจน์ว่าอิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นยังสามารถให้ผลการสอบที่ดีแม้ทดสอบในเมทริกซ์ของสารรบกวน



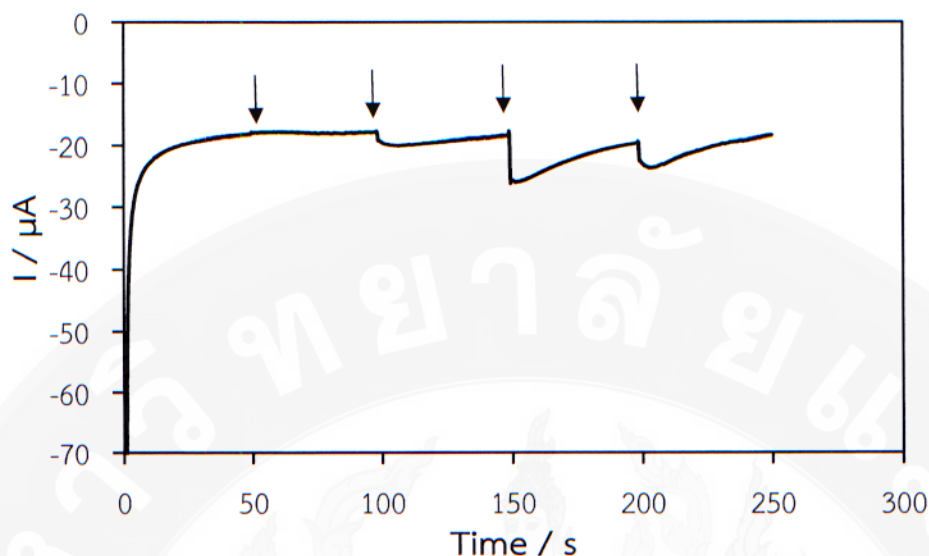
รูปที่ 53 โครโนแอมเปอร์แกรมของการศึกษาสารบวกรับกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE

ฉีดสารบวกรับที่เวลาทุก ๆ 50 วินาที โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสสุดท้ายเป็น 0.0045, 0.009, 0.023, และ 0.045 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรชี้) ในสารละลายที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

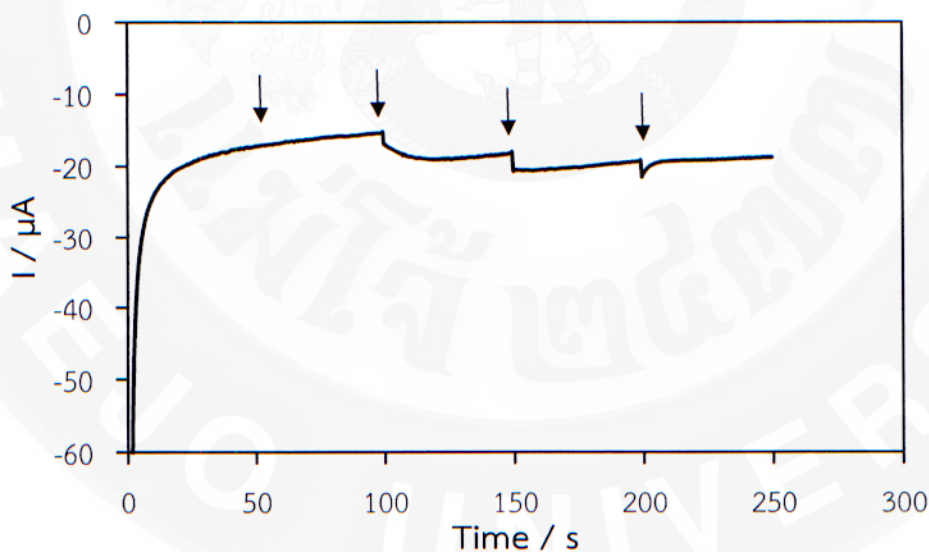


รูปที่ 54 โครโนแอมเปอร์แกรมของการศึกษาสารบวกรับคาเฟอีน ($C_8H_{10}N_4O_2$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE

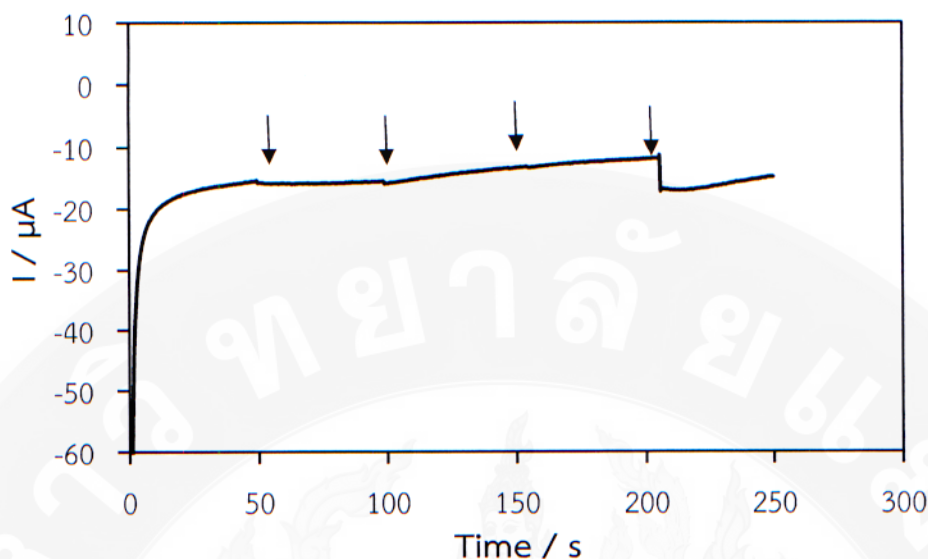
ฉีดสารบวกรับที่เวลาทุก ๆ 50 วินาที โดยใช้ความเข้มข้นคาเฟอีนสุดท้ายเป็น 0.08, 0.16, 0.40 และ 0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรชี้) ในสารละลายที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 55 โครโนแอมเปอร์แกรมของการศึกษาสารบวกรับกวนโดปามีน ($C_8H_{11}NO_2$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE ฉีดสารบวกรับกวนที่เวลาทุก ๆ 50 วินาที โดยใช้ความเข้มข้นโดปามีนสุดท้ายเป็น 3.0, 6.0, 15.0, และ 30.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรชี้) ในสารละลายที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

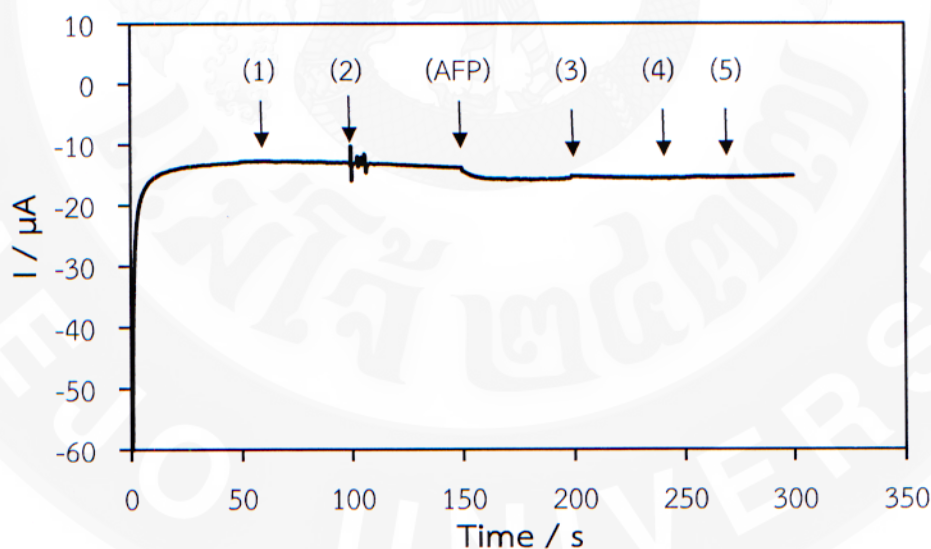


รูปที่ 56 โครโนแอมเปอร์แกรมของการศึกษาสารบวกรับกวนกรดยูริก ($C_5H_4N_4O_3$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE ฉีดสารบวกรับกวนที่เวลาทุก ๆ 50 วินาที โดยใช้ความเข้มข้นกรดยูริกสุดท้ายเป็น 3.0, 6.0, 15.0, และ 30.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรชี้) ในสารละลายที่มีแอลฟาฟิโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 57 โครโนแอมเปอร์แกรมของการศึกษาสารบวบนแอสคอร์บิก ($C_6H_8O_6$) โดยใช้ขั้วไฟฟ้า AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE

ฉีดสารบวบนที่เวลาทุก ๆ 50 วินาที โดยใช้ความเข้มข้นแอสคอร์บิกสุดท้ายเป็น 0.50, 1.00, 2.50, และ 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรชี้) ในสารละลายที่มีแอลฟาพีโตโปรตีน 1.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

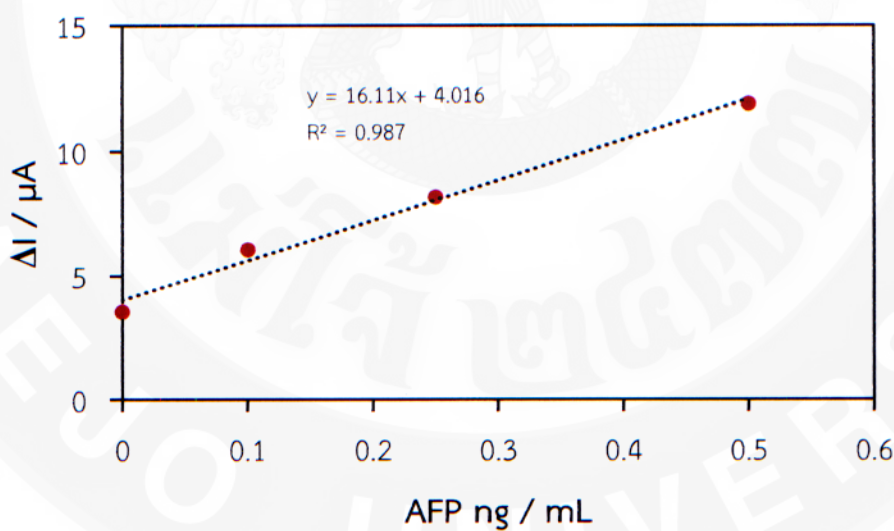


รูปที่ 58 โครโนแอมเปอร์แกรมของขั้วไฟฟ้าดัดแปร AuNW-CNTs-CHIT-Th-anti AFP/GCE ที่ทดสอบกับฉีดสารบวบน

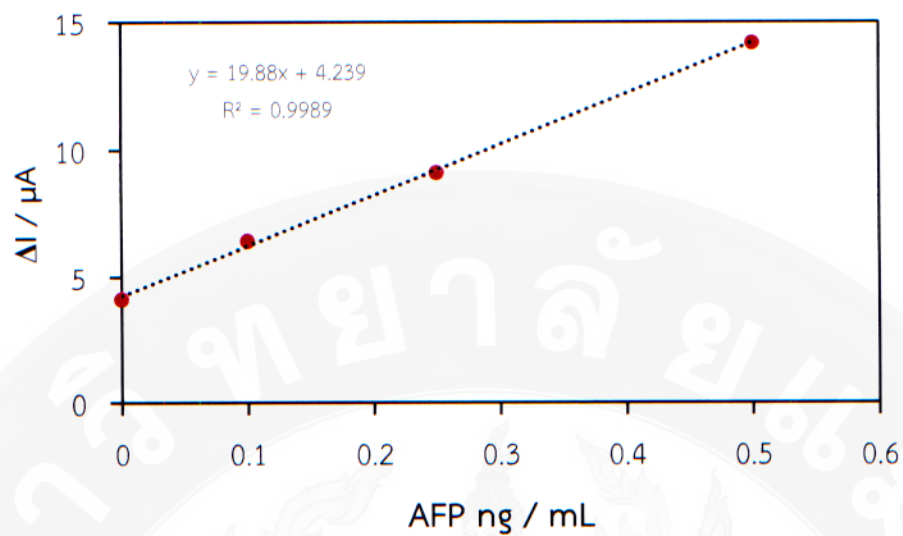
(1) กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) 0.909 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2) โดปามีน ($C_8H_{11}NO_2$) 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แอลฟาพีโตโปรตีน (AFP) เข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (3) กรดยูริก ($C_5H_4N_4O_3$) 0.006 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (4) คาเฟอีน ($C_8H_{10}N_4O_2$) 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (5) แอสคอร์บิก ($C_6H_8O_6$) 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบตัวอย่าง

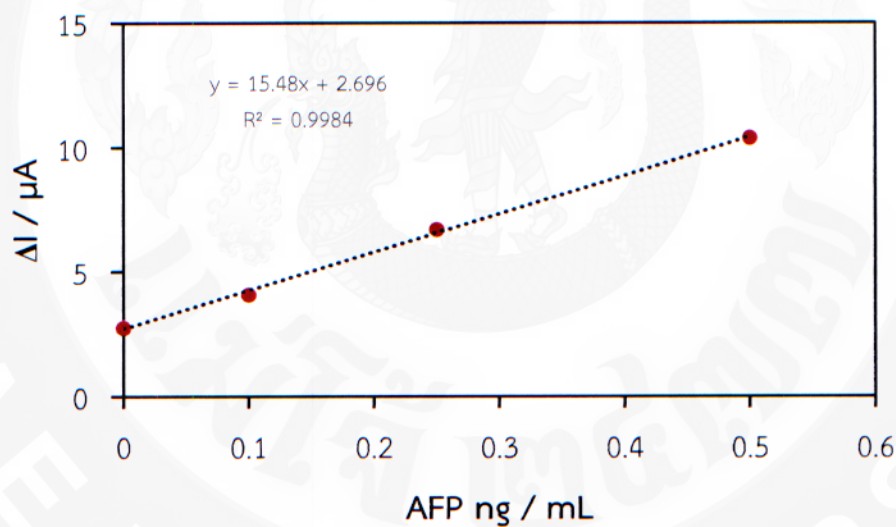
นำขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ทดสอบด้วยโครโนแอมเพโรเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในการทดสอบที่ -0.30 โวลต์ ใช้ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีนตรึงที่ 75 นาโนกรัม ใช้ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 80 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณของทองคำนาโนไวร์ 100 ไมโครกรัม ใช้ปริมาณไทโอนีน 80 ไมโครกรัม ทำการทดสอบในตัวอย่างเลือดที่มีการเติมสารมาตรฐานแอลฟาฟิโตโปรตีน แล้วฉีดลงไปในการละลายที่ทดสอบที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นจึงนำผลต่างของกระแสที่วัดได้มาหักลบกับกระแสพื้น (ΔI) มาวาดกราฟเทียบกับความเข้มข้นที่ฉีดลงไปในการละลาย โดยทำการทดสอบเทียบกับตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 (รูปที่ 59) ตัวอย่างที่ 2 (รูปที่ 60) ตัวอย่างที่ 3 (รูปที่ 61) ตัวอย่างที่ 4 (รูปที่ 62) ตัวอย่างที่ 5 (รูปที่ 63) และตัวอย่างที่ 6 (รูปที่ 64) พบว่าตัวอย่างเลือดมีความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนเท่ากับ 2.49 2.13 1.74 1.72 4.43 และ 0.77 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างเลือดทั้ง 6 ไปสอบเทียบกับวิธีมาตรฐานโดยวัดด้วยวิธี ELISA-Fluorescence ได้ผลดังตารางที่ 14 เมื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงด้วยวิธี t-Test และ F-Test ตามลำดับ ได้ผลการทดสอบความแม่นยำดังตารางที่ 15 และผลการทดสอบความแม่นยำดังตารางที่ 16 จากผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติทางสถิติพบว่าทั้งความแม่นยำและความเที่ยงของอิมมูโนเซนเซอร์เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานมีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอิมมูโนเซนเซอร์จึงสามารถใช้ในการตรวจวัดตรวจหาแอลฟาฟิโตโปรตีนทดแทนวิธีมาตรฐานที่มีราคาแพงได้อย่างถูกต้อง



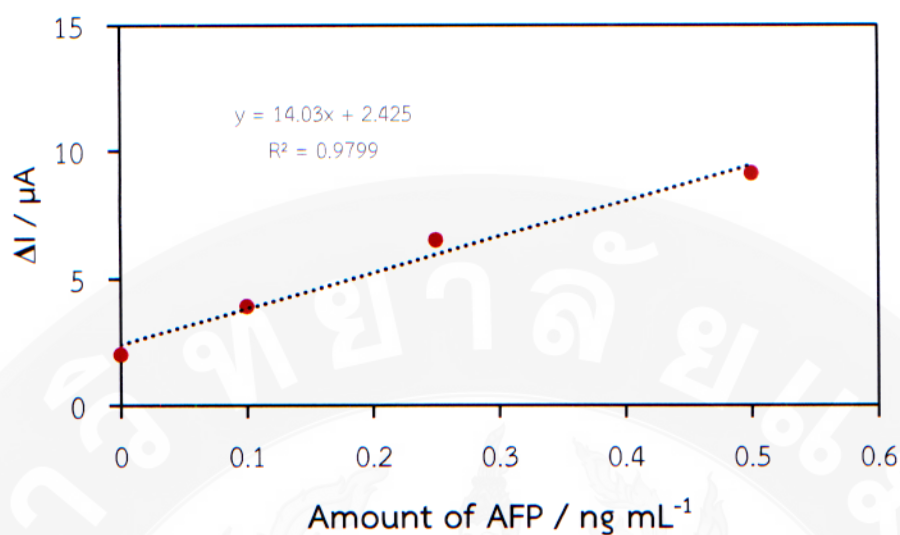
รูปที่ 59 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่างเป็นตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE



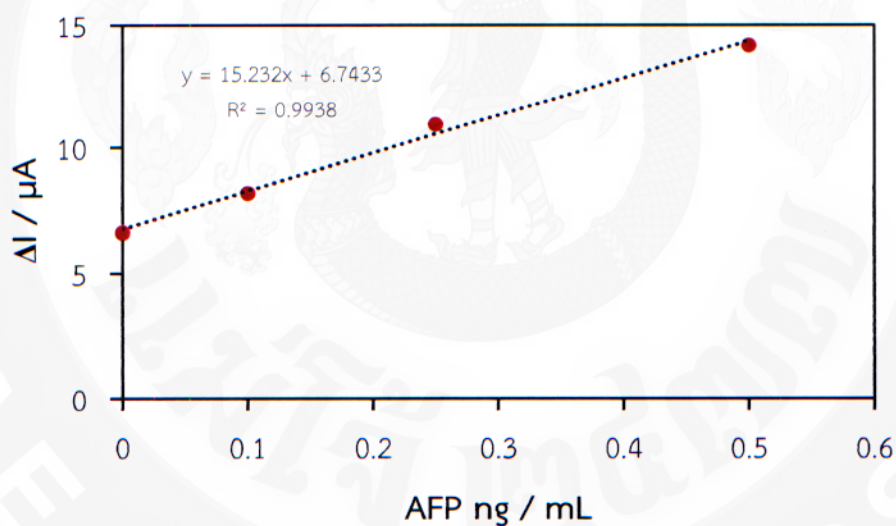
รูปที่ 60 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 2 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE



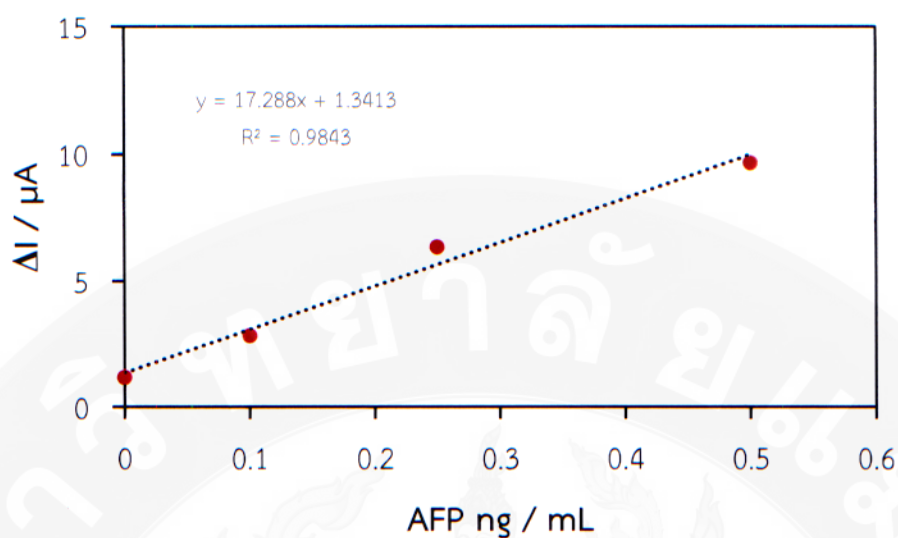
รูปที่ 61 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 3 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE



รูปที่ 62 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 4 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE



รูปที่ 63 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 5 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE



รูปที่ 64 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลฟาฟิโตโปรตีนที่เติมลงไปในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 6 กับกระแสที่วัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE

ตารางที่ 14 ผลการตรวจวัด AFP ในตัวอย่างเลือดโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่ปรับปรุง เทียบกับผลจากเครื่องมือมาตรฐาน

Sample	This work / นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	ELISA / นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
1	2.49	2.32
2	2.13	1.98
3	1.74	1.64
4	1.72	1.64
5	4.43	4.61
6	0.77	0.72

ตารางที่ 15 ค่าทางสถิติ t-test ระหว่างผลการตรวจวัด AFP ในตัวอย่างเลือดโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่ปรับปรุง เทียบกับผลจากเครื่องมือมาตรฐาน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	This work / นาโน กรัมต่อมิลลิลิตร	Clinic / นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร
Mean	2.21	2.15
Variance	1.51	1.74
Observations	6	6
Pearson Correlation Hypothesized Mean	0.9975	
Difference	0	
df	5	
T Stat	1.20	
P (T<=t) one - tail	0.14	
T Critical one - tail	2.02	
P (T<=t) two - tail	0.29	
T Critical two - tail	2.57	

ตารางที่ 16 ค่าทางสถิติ F-test ระหว่างผลการตรวจวัด AFP ในตัวอย่างเลือดโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่ปรับปรุง เทียบกับผลจากเครื่องมือมาตรฐาน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	This work / นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร	Clinic / นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร
Mean	2.21	2.15
Variance	1.51	1.74
Observations	6	6
df	5	5
F	0.87	
P (F<=f) one - tail	0.44	
F Critical one - tail	0.20	
P (F<=f) two - tail	0.05	

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการแบ่งงานวิจัยออกเป็น 2 ช่วงคือการประดิษฐ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ หลังจากนั้นจึงนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ที่ได้ไปปรับปรุงต่อยอดด้วยแอนติอัลฟาฟิโตโปรตีน เพื่อสร้างเป็นอัลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์ สรุปผลการวิจัยแบ่งออกได้ 2 งานวิจัย ดังนี้

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์

งานวิจัยนี้ได้ทำการดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสสคาร์บอน โดยใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ ทองนาโนไวร์ ไคโตซาน และไทโอนีนในการดัดแปรขั้วไฟฟ้าเพื่อใช้เป็นเซนเซอร์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยไทโอนีนทำหน้าที่ให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังขั้วไฟฟ้าทำให้การตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีสัญญาณที่สูงขึ้น

จากการสังเคราะห์ทองนาโนไวร์โดยวิธีการทางเคมีไฟฟ้า และนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าทองที่ทำการสังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นเส้น มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 นาโนเมตร และมีความยาว 10 ไมโครเมตร เมื่อนำมาใช้ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสสคาร์บอน โดยใช้ทองนาโนไวร์ ร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวบ์ ไคโตซาน และไทโอนีนในการดัดแปรเพื่อใช้เป็นเซนเซอร์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เซนเซอร์ที่ทำการดัดแปรขึ้นมากนี้มีเสถียรภาพในการตรวจวัดระดับดีมากเมื่อเทียบกับขั้วไฟฟ้าที่ไม่ได้ทำการปรับปรุง สามารถใช้งานได้สูงสุด 68 ครั้ง ต่อ 1 ขั้วไฟฟ้าดัดแปร มีความจำเพาะสูง เมื่อทดสอบกับสารรบกวน เช่น กรดแอสคอร์บิก กลูโคส โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไนเตรด โซเดียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ กรดยูริก คาเฟอีน กรดออกซาลิก พบว่าสารเหล่านี้จะรบกวนเซนเซอร์ที่ความเข้มข้นสูง ๆ เท่านั้น จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 10 – 5,000 ไมโครโมลาร์ และมีขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 3.79 ไมโครโมลาร์

นอกจากนี้เมื่อนำเซนเซอร์ดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th/GCE ไปตรวจวิเคราะห์กับตัวอย่างจริงทั้งหมด 14 ชนิด พบว่าผลที่ได้เมื่อเทียบกับวิธี UV-Visible spectrophotometry ได้ผลไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเซนเซอร์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมานั้นมีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำ และความเที่ยงสูง ซึ่งสภาวะและคุณลักษณะของเซนเซอร์ดัดแปรแสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 สภาวะและคุณลักษณะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์

ลำดับที่	สภาวะและคุณลักษณะ	ผลการทดลอง
1	ความเข้มข้นคาร์บอนนาโนทิวบ์	6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2	ความเข้มข้นทองคำนาโนไวร์	5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3	ความเข้มข้นไทโอนีน	1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4	ความเข้มข้นโคโตซาน	0.50 เปอร์เซ็นต์
5	ศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับขั้วไฟฟ้าทำงาน	-0.45 โวลต์
6	ช่วงความเป็นเส้นตรง	10 – 5,000 ไมโครโมลาร์
7	ขีดจำกัดการตรวจวัด	3.79 ไมโครโมลาร์
8	ค่า Repeatability (n=7)	4.52 % RSD
9	ค่า Reproducibility (n=7)	1.10 % RSD
10	อายุการใช้งาน	68 ครั้ง
11	ความแม่นยำเมื่อเทียบกับ UV-Visible spectrophotometry	ไม่แตกต่าง
12	ความเที่ยงเมื่อเทียบกับ UV-Visible spectrophotometry	ไม่แตกต่าง

แอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์

การนำขั้วไฟฟ้าดัดแปร CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE สำหรับทำเป็นอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอลฟาฟิโตโปรตีนซึ่งเป็นสารบ่งชี้มะเร็ง ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าขั้วไฟฟ้ามีความหนา 150 นาโนเมตร พบว่าตัวแปรต่าง ๆ ในการปรับปรุงขั้วไฟฟ้า CNTs-CHIT-AuNW-Th-anti AFP/GCE ที่ทดสอบด้วยโครโนแอมเพอโรเมทรี มีสถานะที่เหมาะสมดังนี้คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ให้ เท่ากับ -0.30 โวลต์ ปริมาณของแอนติแอลฟาฟิโตโปรตีน เท่ากับ 75 นาโนกรัม ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์เท่ากับ 80 ไมโครกรัม ปริมาณของทองคำนาโนไวร์เท่ากับ 100 ไมโครกรัม และปริมาณของไทโอนีนเท่ากับ 80 ไมโครกรัม การหาคุณสมบัติของแอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์พบว่ามีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 15 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร มีช่วงความเป็นเส้นตรง $0.1 - 10$ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีอายุการใช้งาน 15 ครั้ง

เมื่อทำการทดสอบในตัวอย่างเลือดเพื่อหาแอลฟาฟิโตโปรตีนโดยวิธีเติมสารมาตรฐานพบว่าสามารถทดสอบกับตัวอย่างได้ และเมื่อนำไปสอบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (ELISA-fluorescence) พบว่าอิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการวิเคราะห์ทั้งความแม่นยำและความเที่ยงไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นั่นหมายความว่าอิมมูโนเซนเซอร์สามารถใช้ทดแทนวิธีมาตรฐานที่มีราคาแพงได้ ส่วนคุณลักษณะอื่น ๆ สรุปได้ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 สถานะและคุณลักษณะของแอลฟาฟิโตโปรตีนอิมมูโนเซนเซอร์

ลำดับที่	สถานะและคุณลักษณะ	ผลการทดลอง
1	ศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับขั้วไฟฟ้าทำงาน	-0.30 โวลต์
2	ปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์	80 ไมโครกรัม
3	ปริมาณของทองคำนาโนไวร์	100 ไมโครกรัม
4	ปริมาณของไทโอนีน	80 ไมโครกรัม
5	ช่วงความเป็นเส้นตรง	$0.1 - 10$ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
6	ขีดจำกัดการตรวจวัด	15 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร
7	ค่าการทำซ้ำ (Repeatability (n=7))	2.56 % RSD
8	ค่าการผลิซ้ำ (Reproducibility (n=5))	8.51 % RSD
9	อายุการใช้งาน	15 ครั้ง
10	สารรบกวนเช่นกลูโคส โดปามีน กรดยูริก กรดแอสคอร์บิก คาเฟอีน	ไม่ส่งผลการรบกวน
11	ความแม่นยำเมื่อเทียบกับ ELISA-fluorescence (95% CL)	ไม่แตกต่าง
12	ความเที่ยงเมื่อเทียบกับ ELISA-fluorescence (95% CL)	ไม่แตกต่าง

เอกสารอ้างอิง

- [1] ปัทมา ว่าพัฒน์วงศ์, และ ปราโมทย์ ประสาทกุล. ประชากรไทยในอนาคต. Available from: <http://www.ipsr.mahidol.ac.th/IPSR/AnnualConference/Conferencell/Article/Article02.htm>, Accessed date: 26 ก.ย. 2557.
- [2] Kissinger, P.T. *Biosensors--a perspective*. Biosensors and Bioelectronics, **2005**. 20 (12): 2512-2516.
- [3] Luong, J.H.T., Male, K.B. and Glennon, J.D. *Biosensor technology: Technology push versus market pull*. Biotechnology Advances, **2008**. 26 (5): 492-500.
- [4] Su, B.L., Tang, D.P., Li, Q.F., Tang, J. and Chen, G.N. *Gold-silver-graphene hybrid nanosheets-based sensors for sensitive amperometric immunoassay of alpha-fetoprotein using nanogold-enclosed titania nanoparticles as labels*. Analytica Chimica Acta, **2011**. 692: 116-124.
- [5] Tyan, Y.C., Jong, S.B., Yang, M.H., Wu, T.L., Chung, T.W., Liao, P.C., Lin, C.Y. and Huang, Y.F. *Utilizing isotope dilution-matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a reference procedure for the radioimmunoassay of serum thyroxine*. Clinica Chimica Acta, **2013**. 420: 99-103.
- [6] Tian, J.N., Liu, R.J., Zhao, Y.C., Peng, Y., Hong, X., Xu, Q. and Zhao, S.L. *Synthesis of CdTe/CdS/ZnS quantum dots and their application in imaging of hepatocellular carcinoma cells and immunoassay for alpha fetoprotein*. Nanotechnology, **2010**. 21: 305101.
- [7] Yang, X.Y., Guo, Y.S. and Wang, A.G. *Luminol/antibody labeled gold nanoparticles for chemiluminescence immunoassay of carcinoembryonic antigen*. Analytica Chimica Acta, **2010**. 666: 91-96.
- [8] Darwish, I.A., Wani, T.A., Alanazi, A.M., Hamidaddin, M.A. and Zargar, S. *Kinetic-exclusion analysis-based immunosensors versus enzyme-linked immunosorbent assays for measurement of cancer markers in biological specimens*. Talanta, **2013**. 111: 13-19.
- [9] Chalupova, L., Zakovska, A. and Adamcova, K. *Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of serum CTRP1: A pilot study: Measurement of serum CTRP1 in healthy donors and patients with metabolic syndrome*. Clinical biochemistry, **2013**. 46: 73-78.
- [10] Dong, J.X., Li, Z.F., Lei, H.T., Sun, Y.M., Ducancel, F., Xu, Z.L., Boulain, J.C., Yang, J.Y., Shen, Y.D. and Wang, H. *Development of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of ractopamine in pork*. Analytica Chimica Acta, **2012**. 736: 85-91.

- [11] Xiao, Q., Li, H.F., Hu, G.M., Wang, H.R., Li, Z.J. and Lin, J.M. *Development of a rapid and sensitive magnetic chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of luteinizing hormone in human serum*. Clinical Biochemistry, **2009**. 42: 1461-1467.
- [12] Hou, J.Y., Liu, T.C., Lin, G.F., Li, Z.X., Zou, L.P., Li, M. and Wu, Y.S. *Development of an immunomagnetic bead-based time-resolved fluorescence immunoassay for rapid determination of levels of carcinoembryonic antigen in human serum*. Analytica Chimica Acta, **2012**. 734: 93-98.
- [13] Niu, C.G., Liu, J., Qin, P.Z., Zeng, G.M., Ruan, M. and He, H. *A novel bifunctional europium chelate applied in quantitative determination of human immunoglobulin G using time-resolved fluoroimmunoassay*. Analytical biochemistry, **2011**. 409: 244-248.
- [14] Lu, J., Zou, L., Xiong, C., Wang, Z., Ma, H., Yang, W., Cui, T., Zhang, L., Huang, S., Sun, Q., Gao, J.M. and Meng, Q.H. *Development of a time-resolved fluoroimmunoassay of CFP-10 for rapid diagnosis of tuberculous pleural effusion*. Clinical Biochemistry, **2012**. 45: 1113.
- [15] Krajewska, B. *Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review*. Enzyme and Microbial Technology, **2004**. 35: 126-139.
- [16] Tsai, Y.-C., Chen, S.-Y. and Lee, C.-A. *Amperometric cholesterol biosensors based on carbon nanotube–chitosan–platinum–cholesterol oxidase nanobiocomposite*. Sensors and Actuators, B: Chemical Sensors and Materials, **2008**. 135 (1): 96-101.
- [17] Safavi, A. and Farjami, F. *Electrodeposition of gold–platinum alloy nanoparticles on ionic liquid–chitosan composite film and its application in fabricating an amperometric cholesterol biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, **2011**. 26 (5): 2547-2552.
- [18] Guibal, E. *Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review*. Progress in Polymer Science, **2005**. 30 (1): 71-109.
- [19] Kumar, M.N.V.R. *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and functional polymer, **2000**. 46: 1-27.
- [20] Tangkuaram, T., Ponchio, C., Kangkasomboon, T., Katikawong, P. and Veerasai, W. *Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan*. Biosensors and Bioelectronics, **2007**. 22 (9-10): 2071-2078.
- [21] Muratova, I.S., Mikhelson, K.N., Ermolenko, Y.E., Offenhäusser, A. and Mourzina, Y. *Chemiresistors based on ultrathin gold nanowires for sensing halides, pyridine and dopamine*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2016**. 232: 420-427.

- [22] Ogabiela, E., Adeloju, S.B., Cui, J., Wu, Y. and Chen, W. *A novel ultrasensitive phosphate amperometric nanobiosensor based on the integration of pyruvate oxidase with highly ordered gold nanowires array*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**. 71: 278-285.
- [23] Zhai, C., Sun, X., Zhao, W., Gong, Z. and Wang, X. *Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electrodeposition*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2013**. 42: 124-130.
- [24] Spain, E., McCooey, A., Joyce, K., Keyes, T.E. and Forster, R.J. *Gold nanowires and nanotubes for high sensitivity detection of pathogen DNA*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**. 215: 159-165.
- [25] Qin, X., Yin, Y., Yu, H., Guo, W. and Pei, M. *A novel signal amplification strategy of an electrochemical aptasensor for kanamycin, based on thionine functionalized graphene and hierarchical nanoporous PtCu*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2016**. 77: 752-758.
- [26] Ma, M., Miao, Z., Zhang, D., Du, X., Zhang, Y., Zhang, C., Lin, J. and Chen, Q. *Highly-ordered perpendicularly immobilized FWCNTs on the thionine monolayer-modified electrode for hydrogen peroxide and glucose sensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**. 64: 477-484.
- [27] Miller, J.N. and Mill, J.C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 2000, Great Britain: Henry Ling Ltd. p.
- [28] Moradi Golsheikh, A., Huang, N.M., Lim, H.N., Zakaria, R. and Yin, C.-Y. *One-step electrodeposition synthesis of silver-nanoparticle-decorated graphene on indium-tin-oxide for enzymeless hydrogen peroxide detection*. *Carbon*, **2013**. 62: 405-412.
- [29] Liu, S., Tian, J., Wang, L. and Sun, X. *A method for the production of reduced graphene oxide using benzylamine as a reducing and stabilizing agent and its subsequent decoration with Ag nanoparticles for enzymeless hydrogen peroxide detection*. *Carbon*, **2011**. 49 (10): 3158-3164.
- [30] Mahmoudian, M.R., Alias, Y., Basirun, W.J., Moradi Golsheikh, A. and Jamali-Sheini, F. *Synthesis of polypyrrole coated manganese nanowires and their application in hydrogen peroxide detection*. *Materials Chemistry and Physics*, **2013**. 141 (1): 298-303.
- [31] Moozarm Nia, P., Meng, W.P., Lorestani, F., Mahmoudian, M.R. and Alias, Y. *Electrodeposition of copper oxide/polypyrrole/reduced graphene oxide as a nonenzymatic glucose biosensor*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**. 209: 100-108.

- [32] Zhong, L., Gan, S., Fu, X., Li, F., Han, D., Guo, L. and Niu, L. *Electrochemically controlled growth of silver nanocrystals on graphene thin film and applications for efficient nonenzymatic H₂O₂ biosensor*. *Electrochimica Acta*, **2013**. 89: 222-228.
- [33] Liu, X., Xu, X., Zhu, H. and Yang, X. *Synthesis of graphene nanosheets with incorporated silver nanoparticles for enzymeless hydrogen peroxide detection*. *Analytical Methods*, **2013**. 5 (9): 2298-2304.
- [34] Zhao, W., Wang, H., Qin, X., Wang, X., Zhao, Z., Miao, Z., Chen, L., Shan, M., Fang, Y. and Chen, Q. *A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on multi-wall carbon nanotube/silver nanoparticle nanohybrids modified gold electrode*. *Talanta*, **2009**. 80 (2): 1029-1033.
- [35] Lu, W., Chang, G., Luo, Y., Liao, F. and Sun, X. *Method for effective immobilization of Ag nanoparticles/graphene oxide composites on single-stranded DNA modified gold electrode for enzymeless H₂O₂ detection*. *Journal of Materials Science*, **2011**. 46 (15): 5260-5266.
- [36] Li, L., Du, Z., Liu, S., Hao, Q., Wang, Y., Li, Q. and Wang, T. *A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on MnO₂/graphene oxide nanocomposite*. *Talanta*, **2010**. 82 (5): 1637-1641.
- [37] Zhao, L., Li, S., He, J., Tian, G., Wei, Q. and Li, H. *Enzyme-free electrochemical immunosensor configured with Au-Pd nanocrystals and N-doped graphene sheets for sensitive detection of AFP*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2013**. 49: 222-225.
- [38] Qi, T., Liao, J., Li, Y., Peng, J., Li, W., Chu, B., Li, H., Wei, Y. and Qian, Z. *Label-free alpha fetoprotein immunosensor established by the facile synthesis of a palladium-graphene nanocomposite*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2014**. 61: 245-250.
- [39] Yuan, Y., Li, S., Xue, Y., Liang, J., Cui, L., Li, Q., Zhou, S., Huang, Y., Li, G. and Zhao, Y. *A Fe₃O₄@Au-based pseudo-homogeneous electrochemical immunosensor for AFP measurement using AFP antibody-GNPs-HRP as detection probe*. *Analytical Biochemistry*, **2017**. 534: 56-63.
- [40] Liu, J., Lin, G., Xiao, C., Xue, Y., Yang, A., Ren, H., Lu, W., Zhao, H., Li, X. and Yuan, Z. *Sensitive electrochemical immunosensor for α -fetoprotein based on graphene/SnO₂/Au nanocomposite*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**. 71: 82-87.

- [41] Sheng, K., Liu, W., Xu, L., Jiang, Y., Zhang, X., Dong, B., Lu, G. and Song, H. *An ultra-sensitive label-free immunosensor toward alpha-fetoprotein detection based on three-dimensional ordered IrO_x inverse opals*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**. 254: 660-668.
- [42] Xu, T., Chi, B., Wu, F., Ma, S., Zhan, S., Yi, M., Xu, H. and Mao, C. *A sensitive label-free immunosensor for detection alpha-Fetoprotein in whole blood based on anticoagulating magnetic nanoparticles*. *Biosensors & bioelectronics*, **2017**. 95: 87-93.
- [43] Li, N., Ma, H., Cao, W., Wu, D., Yan, T., Du, B. and Wei, Q. *Highly sensitive electrochemical immunosensor for the detection of alpha fetoprotein based on PdNi nanoparticles and N-doped graphene nanoribbons*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**. 74: 786-791.
- [44] Wang, H., Li, X., Mao, K., Li, Y., Du, B., Zhang, Y. and Wei, Q. *Electrochemical immunosensor for α -fetoprotein detection using ferroferric oxide and horseradish peroxidase as signal amplification labels*. *Analytical Biochemistry*, **2014**. 465: 121-126.
- [45] Shen, G., Zhang, X., Shen, Y., Zhang, S. and Fang, L. *One-step immobilization of antibodies for α -1-fetoprotein immunosensor based on dialdehyde cellulose/ionic liquid composite*. *Analytical Biochemistry*, **2015**. 471: 38-43.

ผลลัพธ์ที่ได้

1. ผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา 1 คน : นายตึก อัยรัมย์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตร
วท.ม. สาขาวิชาเคมีประยุกต์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เมื่อ กรกฎาคม 2559

2.2 นำเสนอผลงาน 2 ครั้ง

2.1.1 Tik Ouiram, Anchana Preechaworapun and Tanin Tangkuaram. Development
of chemical sensor for hydrogen peroxide detection by gold nanowire and
chitosan crosslinking carbon nanotube modified glassy carbon electrode.
Proceeding in PACCON2015. King Mongkut's University of Technology
Thonburi. P. 51-54. Year 2015.

ชื่องาน PACCON2015 ปี 2015 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ประเภท
โปสเตอร์

2.1.2 Tik Ouiram, Anchana Preechaworapun and Tanin Tangkuaram. An application
of H_2O_2 biosensor with anti-AFP for tumor marker immunosensor.
Conference of PACCON2017. King Mongkut's University North Bangkok. Year
2017.

ชื่องาน PACCON2017 ปี 2017 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ประเภท โปสเตอร์

2.3 International Proceedings 1 ชิ้นงาน

2.3.1 Tik Ouiram, Anchana Preechaworapun and Tanin Tangkuaram. Development
of chemical sensor for hydrogen peroxide detection by gold nanowire and
chitosan crosslinking carbon nanotube modified glassy carbon electrode.
Proceeding in PACCON2015. King Mongkut's University of Technology
Thonburi. P. 51-54. Year 2015.

International proceedings

Tik Ouiram, Anchana Preechaworapun and Tanin Tangkuaram. Development of chemical sensor for hydrogen peroxide detection by gold nanowire and chitosan crosslinking carbon nanotube modified glassy carbon electrode. Proceeding in PACCON2015. King Mongkut's University of Technology Thonburi. P. 51-54. Year 2015.



DEVELOPMENT OF CHEMICAL SENSOR FOR HYDROGEN PEROXIDE DETECTION BY GOLD NANOWIRE AND CHITOSAN CROSSLINKING CARBON NANOTUBE MODIFIED GLASSY CARBON ELECTRODE

Tik Ouiram¹, Anchana Preechaworapun², Tanin Tangkuaram^{1*}

¹Chemistry Program, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 65000

²Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand 65000

* E-mail: tanin@mju.ac.th

Abstract: A simple preparation chemical sensor for hydrogen peroxide has been constructed based on cross-linking chitosan with carbon nanotube (CHIT-CNT), gold nanowire (AuNW) and thionine (Th) by coating on a glassy carbon electrode (Th/CHIT-CNT/AuNW/GC). The Th was employed in the matrix of CHIT-CNT to establish the highly effective chemical sensor for low-level hydrogen peroxide determination since it acted as an electron transfer mediator. The electrochemical and electrocatalytic activity of the modified electrode were studied using cyclic voltammetry and amperometry methods. The linear calibration was obtained from 50 μ M to 15 mM with a detection limit of 0.58 μ M. The modified sensor exhibited excellent electrocatalytic activity, fast amperometric response, high sensitivity and good selectivity to hydrogen peroxide.

1. Introduction

Nanotechnology has recently become one of the most exciting forefront fields in analytical chemistry [1]. A wide variety of nanomaterials, especially nanoparticles (NPs) with different properties, have found broad application in many kinds of analytical methods. Accordingly, electrode development has concentrated more on surface modification of electrodes with nanotubes or nanoparticles [2]. Nanoelectrochemistry plays a significant role in the fabrication of various nanomaterials and devices for detecting molecules at very low concentrations.

Electrochemical deposition approaches are often reported as the methods of choice for simple and low cost nanostructuring and nanopatterning of electrode surfaces [3]. The fabrication of metal NPs modified electrodes by electrochemical techniques is advantageous because it is a single-step process involving reduction of the metal salt at an applied potential, which is a convenient, fast and low-cost method [4].

Hydrogen peroxide has wide applications in environmental, pharmaceutical, clinical, and industrial research. It is also a by-product of reactions catalyzed

by a large number of oxidase enzymes. Therefore, the detection of hydrogen peroxide is important in biomedical and environmental applications [5].

Glassy carbon electrode (GC) is a useful electrode material because of its high electrical conductivity, impermeability to gases, high chemical resistance, reasonable mechanical and dimensional stability and widest potential range of all carbonaceous electrodes [6]. Many attempts have been made to improve the electrochemical properties of glassy carbon electrodes by chemical modifications, such as the addition of a variety of molecular catalysts and mediators to the electrode surface by adsorption, covalent bonding of electroactive catalysts, and entrapment of metals within an affixed polymer film and vapor or electrodeposition of metals directly onto the electrode.

Chitosan (CHIT) is a derivative of chitin by the *N*-deacetylation. It has been used extremely widely in many applications for quite some time. It is being a support for enzymes, with a reasonable number relating to where it functions as a support for metal particles in sensors applications. The easily crosslink property of chitosan with the carbon nanotubes (CNT) constructed a scaffolds (CHIT-CNT). Due to their specific structures and unique properties of CNT could promote the electron-transfer reaction and improve the conductive property when they were used in the construction of biosensors [7].

This research, by combining the advantages features of CHIT-CNT, thionine (Th) and AuNW, the H_2O_2 sensor has been constructed by integrating the CHIT-CNT with Th incorporate the AuNW. The sensor had good performances in the determination of H_2O_2 at a moderate applied potential with high sensitivity, fast response time, wide linear range and good selectivity.

2. Materials and Methods

2.1 Chemical and reagent

Chitosan (CHIT, from crab shells, low molecular), multi-walled carbon nanotube (CNT), glutaraldehyde (GA), $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$, diethyl ether and NaH_2PO_4 were purchased from Sigma Aldrich. An anodic alumina membrane with the pore diameter of 200 nm was supplied by Whatman. A 0.10 M phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4 was prepared and employed as

a supporting electrolyte. Hydrogen peroxide stock solution was prepared by dissolving in phosphate buffer solution. The ultrapure water which was obtained from Milli-Q gradient system (Millipore, $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) was used thoroughly experiments.

2.2 Preparation of carbon nanotubes.

Weighing 0.05 g of carbon nanotubes and purify with nitric acid, after that the solution was sonicated for 10 hour. The ultrapure water was used to rinse nitric acid until the pH is approximately 7. The CNT suspension was dried at 80°C to obtain the CNT purified powder.

2.3 Synthesized the AuNW

An alumina membrane was used as a template to synthesize the AuNW. It was gold sputtered at the current of 15 mA for 150 seconds prior used as a working electrode. A graphite rod (5 mm of diameter) was used as counter electrode while the Ag/AgCl (3 M KCl) was used as a reference electrode. The gold chloride solution was poured into the Teflon-made electrochemical cell. The deposition potential was operated at -0.9 V for 20,000 seconds. After that, the membrane was washed with 35% nitric acid to remove the sputtered-gold. The AuNW suspension was centrifuged at 5,000 rpm for 15 minutes and poured the solution to obtain AuNW.

2.4 CHIT-CNT scaffold preparation

CHIT solution was prepared by adoption from Tangkuaram [7]. Briefly, 0.5 g CHIT flakes, as received, were added to water with stirring. The concentrated CH_3COOH was gradually added into the solution to maintain the pH near to 4-5 until its completed dissolution. The undissolved material was filtered, while the clear and colourless filtrate's volume was adjusted to make up the volume to 100 mL of a 0.5% CHIT solution. The mole ratio of GA to CHIT was 200:1. The mix solution was extracted with diethyl ether for separation the unreacted GA. The CHIT stock solution was stored in a refrigerator (4°C) when not in use. 5 mg of CNT was dispersed in 1 ml of 0.5% CHIT solution and sonicated for 30 minutes, the cross linked solution of CHIT-CNT will be obtained.

2.5 CHIT-CNT/AuNW solution preparation

4 mg of AuNW was dispersed in the CHIT-CNT scaffold solution and followed by sonication for 30 minutes to receive a homogeneous dispersion.

2.6 Preparation of modified electrodes

Prior to modification, GCE (3 mm diameter, CHI, USA) was polished before each experiment with 0.05 μm alumina powders, rinsed thoroughly with ultrapure water and dried at room temperature.

The AuNW/CHIT-CNT/Th/GC modified electrode was prepared. Briefly, 15 μL of mixing solution of CHIT-CNT/AuNW was drop cast on the surface of cleaned GCE. After being dried in air, the electrode was drop with 5 μL of Th solution, after it dried, rinsed thoroughly with the ultrapure water to obtain the AuNW/CHIT-CNT/Th/GC.

2.7 Experimental measurement

All electrochemical measurement were performed with a 128N Autolab electrochemical workstation controlled by Nova software (Autolab 128N, Netherland). Electrochemical experiments were proceeded in an associated electrochemical cell comprising of a three electrode, which is a modified electrode served as a working, Pt wire (0.2 mm diameter, CHI, USA) as a counter and Ag/AgCl (3 M KCl, CHI, USA) as a reference electrodes. The H_2O_2 sensor was characterized by cyclic voltammetry. The amperometric measurements were performed in a 5 ml of PBS at room temperature with an applied potential of 0.85 V.

3. Results and Discussion

3.1 Electrochemical characterization of modified electrode

Cyclic voltammograms for two types of electrodes; bare GC (Figure 1A) and AuNW/CHIT-CNT/Th/GC electrodes (Figure 1B) recorded using cyclic voltammetry by scanning in voltage range of -1.0 to 1.0 V at 50 mVs^{-1} in 0, 1, 5 and 10 mM H_2O_2 with 0.1 M PBS pH 7.4 as supporting electrolyte. From figure 1A, it was found that almost no current response was found at bare electrode for both anodic (1.0 V) and cathodic currents (-1.0 V) [8], however, current increasing as additions of H_2O_2 . For figure 1B, it was noticed that the electrocatalytic current seems obvious at 0.8 V and -0.8 V . From the result, it was understood that H_2O_2 was electrocatalytic oxidized by Th. From our result, the reaction mechanism when using the AuNW/CHIT-CNT/Th/GC, the Th will catalyze H_2O_2 and it can be proposed as figure 2.

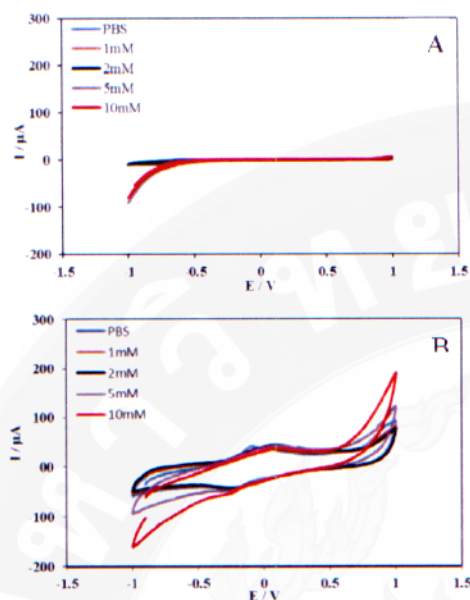


Figure 1. Cyclic voltammograms of A) bare GC and B) AuNW/CHIT-CNT/Th/GC examined in 0.1 M PBS (pH 7.4) at different concentrations of H_2O_2 at scan rate of 50 mV s^{-1} .

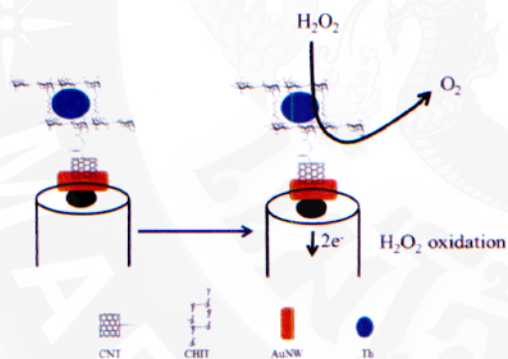


Figure 2. The electrocatalytic mechanism of AuNW/CHIT-CNT/Th/GC to H_2O_2 oxidation.

3.2 Studies of the applied potential on amperometric response

The amperometric response of H_2O_2 at the different applied potentials from 0.50 to 0.90 V on the AuNW/CHIT-CNT/Th/GC shows in figure 3. The current steeply increase from 0.50 -0.80 V, it immediately increase at 0.85 V. This indicates that at the applied potential of 0.85 V can be used as optimum potential for both sensitivity and linearity reason.

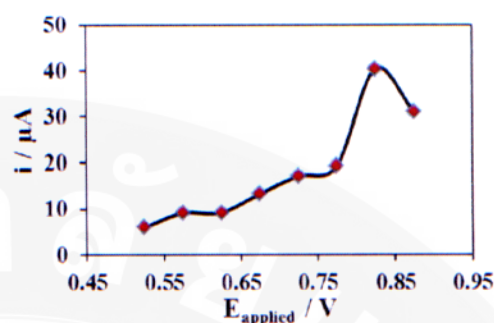


Figure 3. Effect of applied potential on the AuNW/CHIT-CNT/Th/GC response in the presence of 5 mM H_2O_2 .

3.3 Amperometric determination of H_2O_2

The calibration plot using the AuNW/CHIT-CNT/Th/GC electrode under the optimized experimental condition was showed in figure 4. The biosensor exhibited the sensitive response corresponding to the hydrogen peroxide concentration. The linear calibration range of this biosensor was from $50 \mu\text{M}$ to 15 mM ($R^2 = 0.9904$). The limit of quantitation was $1.95 \mu\text{M}$ and a detection limit was $0.58 \mu\text{M}$ at the signal to noise ratio was 3. The linearity and detection limit of our sensor agree well with Tseng et al. [9] that they reported using of the Prussian blue modified on FTO electrode for H_2O_2 determination.

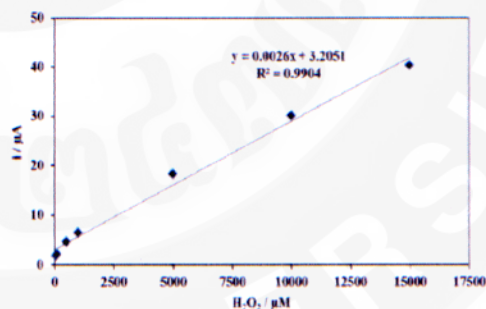


Figure 4. Calibration graphs for the H_2O_2 detection at the AuNW/CHIT-CNT/Th/GC. The applied potential was 0.85 V in the 0.10 M PBS pH 7.4 as supporting electrolyte.

3.4 Influence of interferences

Due to a positive false signal from electroactive species, the effect of some possible interferences including caffeine (CAF) and Aspirin (AF) were estimated. In figure 5, the modified electrode provides the response current when spikes 2 mM hydrogen

peroxide with immediately response time in 0.1 M PBS pH 7.4 compared to 0.1 mM caffeine and Aspirin with no response current. This sensor show good selectivity that it can be attributed to the working potential of 0.85 V without interfere from selected interferences.

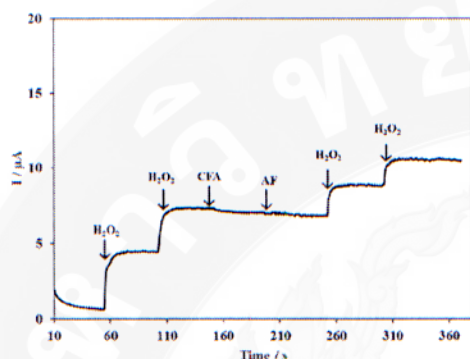


Figure 5. The influence of electroactive interferences of 0.1 mM CFA and AF in 2 mM H₂O₂.

4. Conclusions

Combining the good feature of cross-linking chitosan with carbon nanotube (CHIT-CNT), gold nanowire (AuNW) and thionine (TH), a new sensor (TH/CHIT-CNT/AuNW/GC) was developed. The appropriate voltage oxidation reaction to determine H₂O₂ was 0.85 V with a wide linearity, high selectivity and sensitivity, and low detection limit. It can also be applied this sensor as a based sensor in the detection of alpha fetoprotein (AFP) in the near future.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the National Research Council of Thailand (NRCT). Tik Ouriam would like to express appreciation to thanks to the Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) for Scholarships.

References

- [1] Penn, S.G., He, L. and Natan, M.J., 2003, *Curr Opin Chem Bio*, 7, 609-615.
- [2] Banks, C.E., Davies, T.J., Wildgoose, G.G. and Compton, R.G., 2005, *Chem Commun*, 829-841.
- [3] Budevski, E., Staikov, G. and Lorenz, W.J., 2000, *Electrochim Acta*, 45, 2559-2574.
- [4] Ribeiro, M.C., Silva, L.G.d. and Sumodjo, P.T.A., 2006, *J Brazil Chem Soc*, 17, 667-673.
- [5] Bo, X., Bai, J., Ju, J. and Guo, L., 2010, *Anal Chim Acta*, 675, 29-35.

- [6] Pocard, N.L., Alsmeyer, D.C., McCreery, R.L., Neenan, T.X. and Callstrom, M.R., 1992, *J Mater Chem*, 2, 771-784.
- [7] Cai, X., Gao, X., Wang, L., Wu, Q. and Lin, X., 2013, *Sensor Actuat B-Chem*, 181, 575-583.
- [8] Lin, K.C., Yin, C.Y. and Chen, S.M., 2011, *Sens. Actuat. B-Chem*, 157, 202-210.
- [9] Tsenga, K.S., Chena, L.C. and Hoa, K.C., 2005, *Sens. Actuat. B-Chem*, 108, 738-745.