



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาไปโอแคทและไปโอแอนด์ชานด์ใหม่โดยใช้เอ็นไซม์เพื่อการ  
ประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ

โดย

ดร. มนต์ธารณ อมตรังไชย และคณะ

17 มิถุนายน 2555



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาไบโอแคโทดและไบโօแอนodenicใหม่โดยใช้เอนไซม์เพื่อการ  
ประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ

Development of New Enzyme-based Biocathode and  
Bioanodes for Fuel Cell Application

### คณะผู้วิจัย

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| 1. ดร. มะลิวรรณ ออมตรังไชย   | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี       |
| 2. ดร. เสนอ ชัยรัมย์         | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี       |
| 3. นางสาวเสาวนีย์ เหล่าสิงห์ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี       |
| 4. ผศ.ดร. ดวงใจ นาคะเบรีชา   | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ที่ปรึกษา) |

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ  
ประจำปีงบประมาณ 2553-2554  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อ.บ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงบประมาณแผ่นดินที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2554 ทำให้สามารถทำงานวิจัยขึ้นได้สำเร็จ ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ พศ. ดร. ดวงใจ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัย และขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย และนักศึกษาในโครงการทุกท่านที่ได้ช่วยเสนอความคิด และได้ทำงานวิจัยอย่างเต็มที่ ทำให้งานวิจัยและการนำเสนอผลงานในระดับต่าง ๆ ประสบความสำเร็จด้วยดี

## สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)	i
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความสำคัญที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
<b>บทที่ 2 การตรวจสอบการทดลอง</b>	
2.1 Enzyme-based biofuel cell	8
2.2 Laccase-based biocathodes	9
2.3 Glucose oxidase-based bioanodes	13
<b>บทที่ 3 การทดลอง</b>	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	16
Cyclic voltammetry and amperometry	
3.2 การพัฒนาข้าวใบโอแครโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ ที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase	19
3.3 การพัฒนาข้าวใบโอแครโนดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ ที่มีประสิทธิภาพในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส	21
3.3.1 การพัฒนาข้าวใบโอแครโนดโดยใช้ polymerized aniline (co-m-ferrocenyl aniline) ในการตรึง เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	21
3.3.2 การพัฒนาข้าวใบโอแครโนดโดยใช้เข็วนาโนคอมโพสิตของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	23
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง</b>	
4.1 การพัฒนาข้าวใบโอแครโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มี ประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase	26
4.1.1 การศึกษาทางค์ประกอบที่เหมาะสมของใบโอแครโทด	26
4.1.2 การศึกษาทางค์ประกอบสารละลายที่ใช้ไม่พ่ายตัวข้าวไฟฟ้า กลาสซีคาร์บอนและสภาวะที่เหมาะสมของการวัดค่ากระแส รีดักชันของออกซิเจน	28

## สารบัญ (ต่อ)

4.13 การศึกษาสัญญาณการตอบสนองของชั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ต่อปริมาณแก๊สออกซิเจน	32
4.14 ศึกษาความเสถียรของไบโอดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ	33
4.2 การพัฒนาชั้วไบโอดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ ที่มีประสิทธิภาพในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส	34
4.2.1 การพัฒนาชั้วไบโอดโดยใช้โพลิเมอร์ชนิด polyaniline (co-m-ferroceneylaniline) ในการตรึง เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	34
4.2.1.1 ศึกษาห้องค์ประกอบที่เหมาะสมของไบโอดชนิด	34
4.2.1.2 ศึกษาผลของปริมาณอนุภาคทองนาโน (AuNPs) ในการโมดิฟายชั้วไฟฟ้า	36
4.2.1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย PFcANI ในการโมดิฟายชั้วไฟฟ้า	36
4.2.1.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้ในการโมดิฟายชั้วไฟฟ้า	37
4.2.1.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOx)	38
4.2.1.6 ศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบหนุน	39
4.2.1.7 การศึกษาคุณลักษณะของกลูโคสไบโอดชนิด	40
4.2.1.8 การสังเคราะห์ poly(aniline-co-m-ferroceneylaniline) ด้วยวิธีการทางไฟฟ้า	43
4.2.2 การพัฒนาชั้วไบโอดโดยใช้นาโนคอมโพสิตของคาร์บอนนาโน ในทิวบ์ และไคโตซานในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	45
4.2.2.1 การศึกษาห้องค์ประกอบที่เหมาะสมของไบโอดชนิด	45
4.2.2.2 ศึกษาหามนดิโอเตอร์ที่เหมาะสม	47
4.2.2.3 การศึกษาหานิดของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสม	49
4.2.2.4 การเพิ่มประสิทธิภาพของชั้วไบโอดโดยการตรึง FcCHO ใน คาร์บอนนาโนทิวบ์ด้วยการดูดซับทางกายภาพร่วมกับวิธีการทางเคมี	50
4.2.2.5 การศึกษาคุณลักษณะกลูโคสไบโอดชนิด	52
4.2.2.6 การศึกษาความเสถียรของไบโอดชนิด	53
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง</b>	54
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	55



## บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาใบโอแคโทดและใบโอแอนodenic ใหม่โดยใช้เอนไซม์เพื่อการประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ

Development of new enzyme-based biocathode and bioanodes for fuel cell application.

ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงิน 445,000 บาท  
ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงิน 528,000 บาท

ระยะเวลาการดำเนินงาน 2 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2552 ถึง กันยายน 2554

รายงานทั่วหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมดำเนินการวิจัย

1) ดร. มะลิวรรณ ออมตองไซ 2) ดร. เสนอ ชัยรัมย์ 3) น.ส. เสาวนีย์ เหล่าสิงห์  
ที่ปรึกษาโครงการวิจัย พศ.ดร. ดวงใจ นาคะบะรีชา

โครงการวิจัยนี้ศึกษาและพัฒนาข้าวไฟฟ้าชนิดใหม่ๆ โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน ส่วนแรกพัฒนาข้าวใบโอแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase และงานวิจัยส่วนที่สองศึกษาและพัฒนาข้าวแอนodenic โดยการพัฒนากระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นโพลิเมอร์นำไฟฟ้า หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่งหกานาโนทิวบ์ที่ใช้กัน biocatalyst ที่จะใช้ในข้าวใบโอแอนodenic คือ glucose oxidase และใช้การโมดิฟายด์ด้วยโพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ช่วยให้การนำส่งอิเล็กตรอนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยในการ catalyze ให้ glucose เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ดีขึ้น ข้าวไฟฟ้าใบโอแคโทดและใบโอแอนodenic ใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้เนื่องมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือการพัฒนาข้าวไฟฟ้าใบโอแคโทดชนิดใหม่ และการพัฒนาข้าวไฟฟ้าใบโอแอนodenic ใหม่ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

การพัฒนาข้าวไฟฟ้าใบโอแคโทดชนิดใหม่

1 ) ศึกษาและพัฒนาข้าวใบโอแคโทดเพื่อหาองค์ประกอบของ nano composites และเอนไซม์ที่เหมาะสมของ biocatalyst ในการการ catalyze ปฏิกิริยาตัดชันของ dioxygen ( $O_2$ ) ไปเป็นเป็นน้ำ ( $H_2O$ )

2) พัฒนาเทคนิคในการตรึง (immobilize) เอนไซม์ลงบน nano composites เพื่อใช้เป็น biocatalyst ใน การเกิดปฏิกิริยาเรดักชันของ dioxygen ( $O_2$ ) ไปเป็นเป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ข้าไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นข้าไฟฟ้าในโอดิแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

3) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ biocatalyst ที่พัฒนาขึ้น เช่น ผลของปริมาณ carbon nanotube (CNT) ที่ใช้, ความจุของเอนไซม์ (enzyme loading) และความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability)

4) ประเมินคุณลักษณะของข้าไฟฟ้าในโอดิแคโทดที่พัฒนาขึ้น โดยการเปรียบเทียบการนำไปใช้ในการ catalyze ปฏิกิริยาเรดักชันของ dioxygen

#### **การพัฒนาข้าไฟฟ้าใบโอดิโนดชนิดใหม่**

1) ศึกษาและพัฒนาข้าไฟฟ้าใบโอดิโนดเพื่อห้องค์ประกอบของข้าไฟฟ้าที่เหมาะสม โดยศึกษาถึงปริมาณ เอนไซม์ที่เหมาะสมในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส เพื่อให้ได้สารตัวกลางทางไฟฟ้าซึ่งก็คือ  $H_2O_2$

2) ศึกษาการทำงานของข้าไฟฟ้าใบโอดิโนดที่พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry และ hydrodynamic amperometry

3) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของใบโอดิโนดที่พัฒนาขึ้น เช่น ชนิดของสารนำส่งอิเล็กตรอน จำพวกโพลิเมอร์หรือสารบอนนโนทิวบ์, ปริมาณของ substrate, ระบบบัพเพอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์, ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม, ความแม่นยำของข้าไฟฟ้าและอายุการใช้งานของข้าไฟฟ้า

4) ประเมินคุณลักษณะของข้าไฟฟ้าใบโอดิโนดที่พัฒนาขึ้น ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ glucose ไปเป็น gluconolactone และสารตัวกลางไฟฟ้า ( $H_2O_2$ )

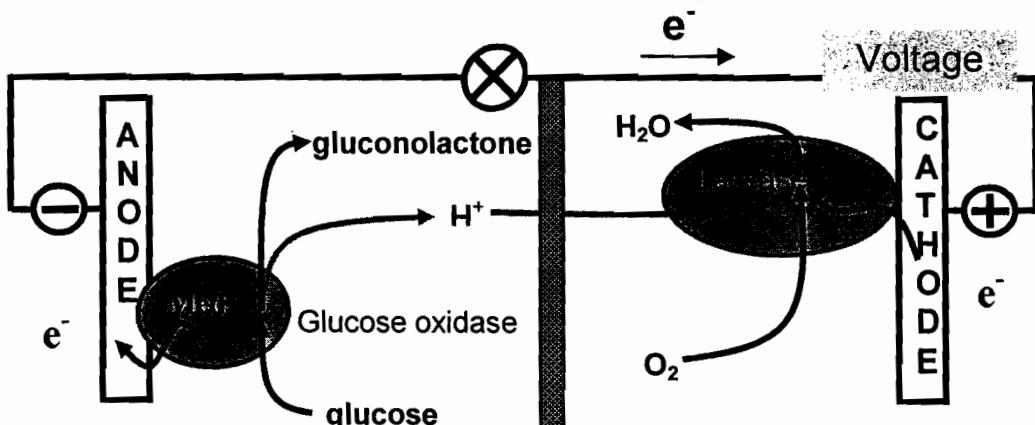
5) ประยุกต์ข้าไฟฟ้าทั้งสองชนิดที่ได้พัฒนาขึ้นนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของ เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้พัฒนาขึ้น รวมทั้งศึกษาเบื้องต้นถึงระยะเวลาการใช้งานและเสื่อมสภาพของ Biofuel cell ที่ได้พัฒนาขึ้น

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาและพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อเป็นพลังงานทดแทนอีกทางเลือก หนึ่ง โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาและพัฒนาข้าวไฟฟ้าชนิดใหม่ๆ โดยใช้ออนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ (ดังรูปที่ 1) โดยจะแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน ส่วนแรก จะพัฒนาข้าวใบโอลูค็อก ชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของออนไซม์ laccase และงานวิจัยในส่วนที่สอง จะศึกษาและพัฒนาข้าวแอโนнд โดยการพัฒนาระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นสารจำพวกโพลิเมอร์ หรือการรับอนนาโนทิวบ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่งหล่ายชนิดที่ใช้กัน biocatalyst ที่จะใช้ในข้าวใบโอลูค็อกคือ glucose oxidase และใช้การโมดิฟายด์ด้วยโพลิเมอร์หรือการรับอนนาโนทิวบ์ ช่วยให้การนำส่งอิเล็กตรอนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยในการ catalyze ให้ glucose เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ดีขึ้น โดยคาดว่าข้าวไฟฟ้าใบโอลูค็อกและใบโอลูค็อกชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นการใช้ประโยชน์จากข้าวเชื้อเพลิงชีวภาพอย่างสูงสุด และเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย เช่น ข้าวโพด มันสัมปะหลัง อ้อย ฯลฯ



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่โครงการวิจัยนี้จะพัฒนาขึ้น โดยส่วนที่ 1 จะพัฒนาใบโอลูค็อกโดยตึงด้วย nano composite ของออนไซม์ laccase และส่วนที่ 2 จะพัฒนาใบโอลูค็อกโดยตึงด้วยออนไซม์ glucose oxidase ที่ข้าวแอโนนด์ที่มี mediator เป็นพวกโพลิเมอร์หรือการรับอนนาโนทิวบ์ ทำหน้าที่นำส่งอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นแก่ข้าวไฟฟ้า

## 1.2 วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือการพัฒนาข้าวไฟฟ้าใบโอแครโทชนิดใหม่ และการพัฒนาข้าวไฟฟ้าใบโอเอนไซม์ชนิดใหม่ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

### การพัฒนาข้าวไฟฟ้าใบโอแครโทชนิดใหม่

1) ศึกษาและพัฒนาข้าวใบโอแครโทเพื่อทางค์ประกอบของ nano composites และเอนไซม์ที่เหมาะสมสมของ biocatalyst ในการการ catalyze ปฏิกิริยาเรดักชันของ dioxygen ( $O_2$ ) ไปเป็นเป็นน้ำ ( $H_2O$ )

2) พัฒนาเทคนิคในการตรึง (immobilize) เอนไซม์ลงบน nano composites เพื่อใช้เป็น biocatalyst ใน การเกิดปฏิกิริยาเรดักชันของ dioxygen ( $O_2$ ) ไปเป็นเป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และ ความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ข้าวไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็น ข้าวใบโอแครโทในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

3) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ biocatalyst ที่พัฒนาขึ้น เช่น ผลของปริมาณ carbon nanotube (CNT) ที่ใช้, ความจุของเอนไซม์ (enzyme loading) และความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability)

4) ประเมินคุณลักษณะของข้าวใบโอแครโทที่พัฒนาขึ้น โดยการเปรียบเทียบการนำໄปใช้ในการ catalyze ปฏิกิริยาเรดักชันของ dioxygen

### การพัฒนาข้าวไฟฟ้าใบโอเอนไซม์ชนิดใหม่

1) ศึกษาและพัฒนาข้าวใบโอเอนไซม์เพื่อทางค์ประกอบของข้าวไฟฟ้าที่เหมาะสม โดยศึกษาถึงปริมาณเอนไซม์ ที่เหมาะสมในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส เพื่อให้ได้สารตัวกลางทางไฟฟ้าซึ่งก็คือ  $H_2O_2$

2) ศึกษาการทำงานของข้าวไฟฟ้าใบโอเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry และ hydrodynamic amperometry

3) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของใบโอเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้น เช่น ชนิดของสารนำส่งอิเล็กตรอน จำพวก โพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์, ปริมาณของ substrate, ระบบบัพเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, ศึกษาศักยภาพไฟฟ้าที่เหมาะสม, ความแม่นยำของข้าวไฟฟ้าและอายุการใช้งานของข้าวไฟฟ้า

4) ประเมินคุณลักษณะของข้าวใบโอเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้น ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ glucose ไปเป็น gluconolactone และสารตัวกลางไฟฟ้า ( $H_2O_2$ )

5) ประยุกต์ข้าวไฟฟ้าทั้งสองชนิดที่ได้พัฒนาขึ้นนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของ เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้พัฒนาขึ้น รวมทั้งศึกษาเบื้องต้นถึงระยะเวลาการใช้งานและเสื่อมสภาพของ Biofuel cell ที่ได้พัฒนาขึ้น

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เมื่อทำงานวิจัยเสร็จแล้วผลที่คาดว่าจะได้รับคือ

1. ได้ข้าไฟฟ้าใบโอแคโทดและใบโօแอนดอนิดใหม่ ที่สามารถนำไปในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

1.1 ข้าไฟฟ้าใบโอแคโทดชนิดใหม่ ที่พัฒนาขึ้นจากการตึงเอนไซม์ลงบน nano composites ให้เป็น biocatalyst ใน การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen ( $O_2$ ) ไปเป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมขึ้นมาเนี้ยจะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้อิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นข้าไฟฟ้าใบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

1.2 ข้าไฟฟ้าใบโօแอนดอนิดใหม่ ที่พัฒนาจากวิธีการตึงเอนไซม์ กลูโคสอกซิเดสบันโพลิเมอร์ หรือ carbon nanotube ซึ่งสารเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน โดยคาดว่าเอนไซม์กลูโคสอกซิเดสที่ตึงบนโพลิเมอร์จะ catalyze สารละลายกลูโคสทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้า ( $H_2O_2$ ) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้มีการให้ศักย์ที่เหมาะสม เกิดการไหลของอิเล็กตรอน โพลิเมอร์ที่ใช้จะทำหน้าที่เป็นตัวตึงเอนไซม์ และในขณะเดียวกันก็เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน ข้าไฟฟ้าใบโօแอนด์ที่พัฒนาจะเป็นข้าไฟฟ้าที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งอิเล็กตรอนสูง

2. ผลงานที่ได้พัฒนาขึ้นจะถูกถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการนำผลการทดลองที่ได้ไปแสดงหรือบรรยายในที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ หรือนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

3. ได้องค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาศักยภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อเพิ่มนูลค่าทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย เช่น ข้าวโพด มันส้มปะหลัง อ้อย ฯลฯ รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้กับภาครัฐและหน่วยงานที่ต้องการนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นไปผลิตเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีประสิทธิภาพในการให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้น และ/หรือสามารถนำไปใช้ในการย่อยขนาดให้เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีขนาดเล็กลงได้

4. เพื่อจัดทำฐานข้อมูลและเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อใช้เป็นพัฒนาทางเลือก หน่วยงานที่คาดว่าจะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

-คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

-คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

-อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ และ อุตสาหกรรมผลิตเชื้อเพลิง (Fuel) ที่ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น กลูโคส, เอทานอล ฯลฯ ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย เช่น ข้าวโพด มันส้มปะหลัง อ้อย ฯลฯ เป็นวัตถุดิบ

### 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

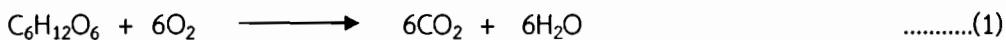
งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาข้าไฟฟ้าชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยจะแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือส่วนแรกจะพัฒนาคือการพัฒนาข้าไฟฟ้าใบโอแคโทด ชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase และงานวิจัยในส่วนที่สองจะศึกษาและพัฒนาข้าไฟฟ้าใบโօ

แอโนดที่ใช้ในเซลล์เชือเพลิงชีวภาพโดยจะพัฒนาระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นสารจำพวกโพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิเบอร์ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่งหลาภยชนิดที่ใช้กัน biocatalyst และตึงเอนไซม์ ถูกลูโคไซด์ออกซิเดจ (glucose oxidase) บนโพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิเบอร์ ทำหน้าที่เป็น mediator ดังนั้นจึงคาดว่าข้าวไฟฟ้าใบโอลิโคทิดและใบโอลอโนดชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชือเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชือเพลิงชีวภาพเป็นการใช้ประโยชน์จากเชือเพลิงชีวภาพอย่างสูงสุด และเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการนำเชือเพลิงชีวภาพมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนพลังงานจากฟอสซิล อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพอย่างยิ่งในการพัฒนาให้เป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เนื่องจากใช้พลังงานจากออกซิเจนซึ่งมีอยู่แล้วในอากาศทั่วไปและกําลูโคสที่สามารถหาได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีอยู่ในท้องถิ่น เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย ฯลฯ

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร (Literature Reviews)

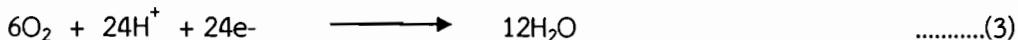
เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพคือเครื่องมือที่เปลี่ยนสารทางเคมีอินทรีย์เป็นไฟฟ้าโดยใช้ microorganism เช่น เอนไซม์หรือแบคทีเรีย เป็นสารเร่งปฏิกิริยาให้เป็นงานทางไฟฟ้า<sup>1</sup> ผลิตภัณฑ์ที่ได้ของกระบวนการคือ โปรตرون อิเล็กตรอน เป็นต้น โดยโปรดอนและอิเล็กตรอนที่ได้ถูกนำไปใช้ในการแปลงเป็นพลังงาน เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ จึงเป็นแหล่งกำเนิดไฟฟ้ารูปแบบใหม่เพื่อทดแทนพลังงานที่มาจากการผลิตฟอสซิลหรือเชื้อเพลิงชนิดอื่น งานวิจัยที่เกี่ยวกับ เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเริ่มจากปี ค.ศ.1911 โดย Potter<sup>2</sup> และในปี ค.ศ. 1991 Benetto และคณะ<sup>3</sup> ได้สร้าง แบบจำลองที่พิสูจน์ว่าจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการผลิตพลังงานได้โดยใช้ E.Coli เป็นจุลินทรีย์และใช้กลูโคส เป็นเชื้อเพลิง ซึ่งกระบวนการเผาผลาญกลูโคสดังแสดงในสมการ (1)



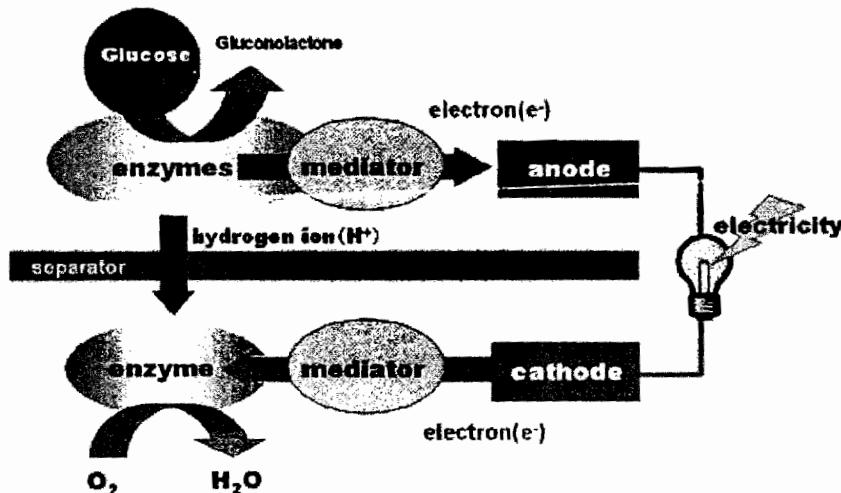
กระบวนการเผาผลาญอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ของวัฏจักรเครบส์จะได้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โปรดอน และอิเล็กตรอน ดังสมการ (2)



จากนั้นโปรดอนและอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังระบบถ่ายทอดอิเล็กตรอน เพื่อร่วมตัวกับออกซิเจน ทำให้ กระบวนการเผาผลาญสารอาหารเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และให้ผลผลิตเป็นน้ำ ดังสมการที่ (3)



จากสมการที่ (2) และ (3) สามารถนำมาปรับปรุงใช้เป็นเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ประกอบด้วยข้าไฟฟ้าแอนโอดและ แค็ตodeที่กันกลางด้วยเมมเบรน โดยโปรดอนที่เกิดขึ้นจากข้าแอนโอดจะแพร่ผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยน ส่วน อิเล็กตรอนไหลผ่านวงจรออก glycineออกเซลล์ เมื่อเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนก็จะเกิดกระแสไฟฟ้าทำให้เกิด งานขึ้น เมื่อนำเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพไปต่อ กับหลอดไฟฟ้าก็จะทำให้หลอดสว่างได้ หลักการทำงานและ ส่วนประกอบของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพแสดงได้ดังรูปที่ 2.1



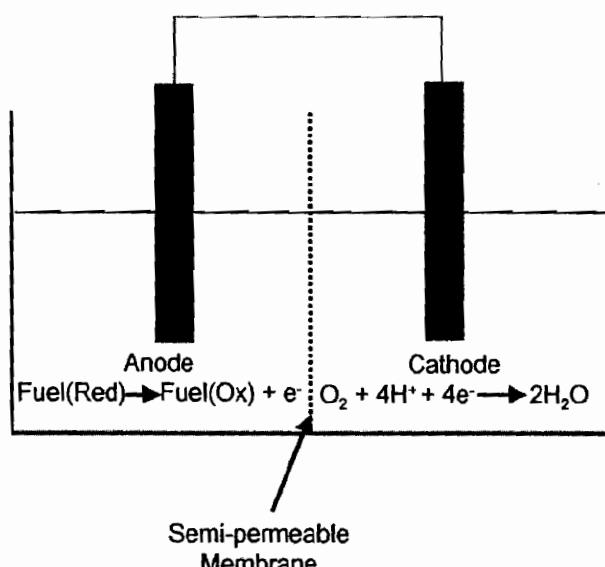
รูปที่ 2.1 รูปแสดงส่วนประกอบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ<sup>4</sup>

จากหลักการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพพบว่ามีตัวแปรหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ ได้แก่ โครงสร้างของเซลล์ ชนิดของเมมเบรน ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ ตัวนำส่งอิเล็กตรอนหรือ mediator ชนิดและขนาดของอิเล็กโทรด และยังมีปัจจัยภายนอกเซลล์ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็น鹼ของสารละลายในส่วนของแอนโโนดและแคโทด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งเป็นเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานไฟฟ้าทางเลือก รูปแบบใหม่ โดยจะศึกษาและพัฒนาความเป็นไปได้ที่จะนำเซลล์เชื้อเพลิงจากชีวภาพมาผลิตเป็นพลังงานไฟฟ้าในอัตราที่สูง และศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำมาระบุกต์ให้ใช้เพื่อพัฒนาให้เป็นเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพขนาดเล็ก จากเอนไซม์ที่สามารถให้กำเนิดพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ได้สำหรับอุปกรณ์ไฟฟ้าขนาดเล็ก งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาขั้วไฟฟ้าชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยจะแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วน ด้วยกัน คือส่วนแรกจะพัฒนาขั้วไฟฟ้าโดยแคโทด งานวิจัยในส่วนนี้จะศึกษาและพัฒนาขั้วแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase การตรึงเอนไซม์ลงบนพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube; CNT) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีลักษณะที่เด่นเป็นพิเศษคือ มีพื้นที่ผิวมาก สามารถบรรจุอะตอม หรือโมเลกุลชนิดอื่นไว้ภายในห้องใต้ดินได้และมีสภาพนำไปไฟฟ้าที่สูง<sup>5</sup> จึงคาดว่า biocatalyst ที่เตรียมขึ้นได้จะสมบูรณ์ที่พิเศษ คือมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading) และความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) สูง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ biocatalyst ที่เป็นต้องการอย่างยิ่งในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ และในส่วนที่สองจะพัฒนาขั้วไฟฟ้าโดยโอนิคที่ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ข้าไฟฟ้าโอนิค ปรับปรุงโดยตรึงเอนไซม์ glucose oxidase โดยมี glucose เป็น substrate การส่งผ่านอิเล็กตรอนจะใช้ตัวนำส่ง อิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นสารจำพวกโพลิเมอร์หรือสารบอนนาโนทิวบ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่ง หลายชนิดที่ใช้กันอยู่ทั่วไป biocatalyst ที่พัฒนาขึ้นคาดว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งผ่าน อิเล็กตรอนในการ catalyze ให้ glucose เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นจึงคาดว่าข้าไฟฟ้าใบเถาอนดและใบโอแคนดและใบโอแคโทดชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้ เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นการใช้ประโยชน์จากเชื้อเพลิงชีวภาพอย่างสูงสุด และเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการนำเชื้อเพลิงชีวภาพมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนพลังงานจากฟอสซิล อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพอย่างยิ่งในการพัฒนาให้เป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เนื่องจากใช้พลังงานจากออกซิเจนซึ่งมีอยู่แล้วในอากาศทั่วไปและกลูโคสที่สามารถหาได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีอยู่ในห้องถัง ประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศที่ทำเกษตรกรรมเป็นหลักจึงมีศักยภาพในการนำต้นติดบีท มีอยู่ในประเทศไทยมาใช้ในการผลิตเพื่อเป็นเชื้อเพลิงที่ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ ทั้งในระดับชุมชนและระดับอุตสาหกรรม การพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งใช้วัตถุบีทเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้เองในประเทศ มาใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทน จึงช่วยในการรักษาเงินตราต่างประเทศ เป็นการสร้างความมั่นคง และสามารถพัฒนาด้านพลังงานของประเทศไทยอีกด้วย

แผนภาพทั่วไปของการทำงานแสดงดังรูปที่ 2.2 เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพประกอบด้วยข้าไฟฟ้าเถาอนดและแคโทดซึ่งถูกแยกออกจากกันด้วยแผ่นแม่เหล็กที่มีเยื่อเลือกผ่าน ข้าเถาอนดประกอบด้วยสารละลายเชื้อเพลิง (fuel) ที่มีเซลล์ของจุลินทรีย์ (microbial cell) หรือเอนไซม์ละลายอยู่ หรือถูกตรึงอยู่ที่ข้าไฟฟ้าด้านเถาอนดสารละลายเชื้อเพลิงที่ใช้ทั่วไป เช่น กลูโคส, เอทานอล, เมทานอล ฯลฯ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ข้าเถาอนด และอเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิเจนนำไปใช้ในการเกิดปฏิกิริยาตัดซัณที่ข้าแคโทด<sup>6</sup>



รูปที่ 2.2 เป็นรูปทั่วไปของ biofuel cell<sup>7</sup>

การใช้เอนไซม์เป็นตัวคatalisต์ หรือการใช้ biocatalyst ให้ข้อดีเหนือกว่าการใช้พากโลหะทรายซึ่งเป็นตัวคatalisต์<sup>1</sup> คือ

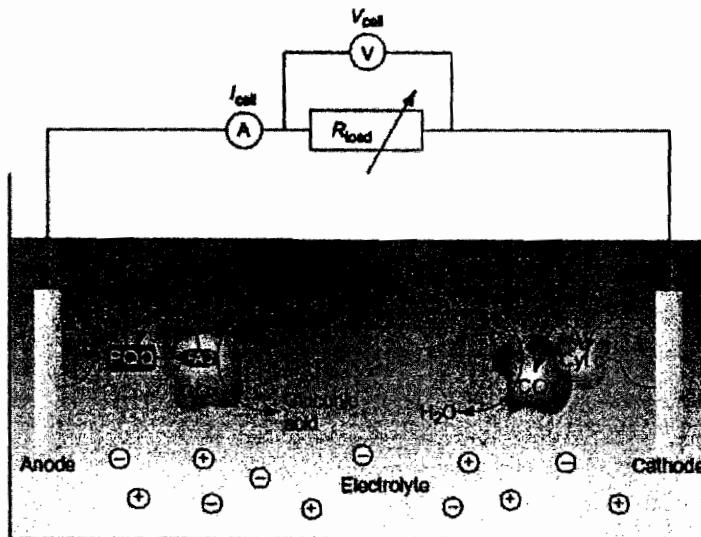
- 1) สามารถในการใช้มีรุนแรง เช่น อุณหภูมิที่ใช้งานอยู่ที่  $20-40^\circ\text{C}$  ค่า pH ของสารละลายที่ใช้ใกล้เคียงกับ
- 2) ทำให้ราคาของเซลล์เชื้อเพลิงถูกลง

- 3) สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้
- 4) สามารถพัฒนาให้เป็นเซลล์เชื้อเพลิงที่ใช้เชื้อเพลิง (fuel) ชนิดต่างๆ ได้หลากหลาย

## 2.1 Enzyme-based biofuel cell

เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นแหล่งกำเนิดไฟฟ้ารูปแบบใหม่เพื่อทดแทนพลังงานที่มาจากการถ่านหินหรือเชื้อเพลิงชนิดอื่น เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้เริ่มต้นจาก Galvani นักชีววิทยา ซึ่งค้นพบว่ากระแสไฟฟ้าสามารถเกิดขึ้นภายในสัตว์หลายชนิด เช่นกับ กบสามารถที่จะกระโดดได้เนื่องจากมีประจุไฟฟ้าภายในเซลล์กระดูกไขสันหลัง ปี ค.ศ. 1911 Potter<sup>2</sup> พบว่าเมื่อจุ่มขั้วไฟฟ้าแพลตินัม (Pt) ลงในสารละลายของเชื้อ E.Coli ทำให้เกิดศักยไฟฟ้าขึ้น จากนั้นปี ค.ศ. 1931 กลุ่มงานวิจัยของ Cohen ได้พัฒนาแบบเตอร์เซลล์จากสารชีวภาพพบว่าสามารถให้ค่าความต่างศักย์ถึง 35 โวลต์<sup>8</sup>

ในทศวรรษที่ผ่านมา มีหลายกลุ่มงานวิจัยได้ทำการพัฒนาและปรับปรุงขั้วไฟฟ้าใบโอแอนด์ไบโอดแคโทดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตอิเล็กตรอนและส่งผ่านอิเล็กตรอน ในปี ค.ศ. 1999 Katz และคณะ<sup>9</sup> สร้างระบบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพประกอบด้วย กรูโคสอิเล็กโทรดที่พัฒนาด้วย PQQ-FAD และ glucose oxidase เอนไซม์ บน Cu<sup>2+</sup>-poly(acrylic acid) film และขั้วแคโทดปรับปรุงโดยใช้ cytochrome C/cytochrome oxidase electrode บน Cu<sup>2+</sup>-poly(acrylic acid) film องค์ประกอบของเซลล์แสดงดังรูปที่ 2.3 ระบบเซลล์เชื้อเพลิงนี้ทำให้เกิดกระแส 550  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  และสามารถให้กำลัง 21  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  มีอายุการใช้งาน 48 ชั่วโมง

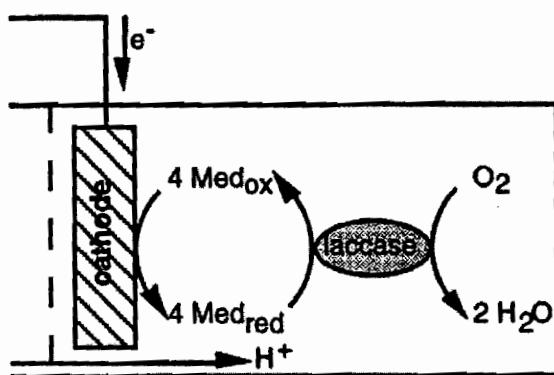


รูปที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีกรูโคสและออกซิเจนเป็นเชื้อเพลิงและออกซิเดนซ์ แสดงถึงการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก PQQ-FAD/GOx anode และ Cytochrom C/COx cathode<sup>9</sup>

## 2.2 Laccase-based biocathodes

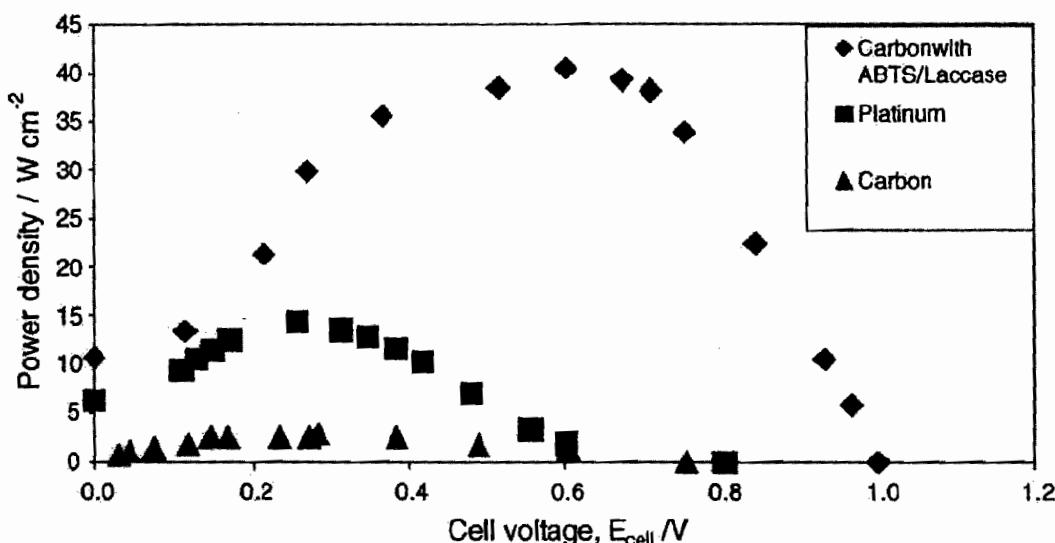
เอนไซม์หกเหลี่ยมนิดที่มี copper เป็นองค์ประกอบ เช่น ascorbate oxidase, laccase, ceruloplasmin สามารถใช้เป็นตัว catalyst ในการเกิดปฏิกิริยาตัดขั้นของ dioxygen ( $O_2$ ) ไปเป็นน้ำ ( $H_2O$ ) ได้ (ผ่านกระบวนการ four-electron reduction) laccase นับเป็นเอนไซม์ที่ใช้งานได้ง่ายที่สุดและน่าสนใจที่สุดในบรรดาเอนไซม์หกเหลี่ยมนี้ active site ของ laccase ประกอบด้วย copper ions 4 ตัว (Cu(II/I)) จากการตรวจวัดโดยใช้เทคนิค EPR)<sup>10</sup> เอนไซม์ laccase ที่ถูกดูดซึบบนพื้นผิวของอิเล็กโทรดชนิดต่าง ๆ เช่น ทอง (gold), pyrolytic graphite และ carbon black สามารถ catalyze ปฏิกิริยาตัดขั้นของ dioxygen ได้ ซึ่งในกรณีนี้อิเล็กโทรดทำหน้าที่เสมือน substrate สำหรับเอนไซม์ laccase<sup>11, 12</sup> กระบวนการนี้เรียกว่า Direct electron transfer (DET) อย่างไรก็ตาม biocatalyst เหล่านี้ยังมีข้อด้อยในการนำไปพัฒนาเป็น biocathode ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ คือระดับของกระแสที่ให้ และความหนาแน่นของกระแส (current density) ของขั้วไฟฟ้าชนิดนี้มีค่าน้อย

คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของเอนไซม์ laccase คือการไม่เฉพาะเจาะจงต่อ substrate ทำให้เกิดข้อดีตามมา คือนอกจากระบวนการ DET แล้ว laccase ยังสามารถ catalyze ปฏิกิริยาตัดขั้นของ dioxygen ( $O_2$ ) ผ่านกระบวนการ Mediated electron transfer (MET) โดยในกระบวนการนี้เอนไซม์ laccase จะ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ substrate ชนิดต่าง ๆ เช่น mono-, di- หรือ polyphenols, arylamines หรือสารอนินทรีย์บางชนิด เมื่อ laccase ไปออกซิไซต์สารเหล่านี้แล้ว จะสามารถทำให้ปฏิกิริยาตัดขั้นของ dioxygen เกิดขึ้นได้ดังแสดงในรูปที่ 2.4 Substrate ในกรณีนี้ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจากขั้วแคโทดของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพไปยัง catalytic site ของ laccase เพื่อให้ dioxygen เกิด electro-enzymatic reduction อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นมักนิยมเรียก substrate ในกรณีนี้ว่า mediator



รูปที่ 2.4 การใช้ laccase เป็น biocathode ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดย laccase ทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ<sup>10</sup>

การพัฒนาประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยการพัฒนาข้าวแคโทดให้การเกิดปฏิกิริยาตัดกัชั่นของ dioxygen มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเป็นอีกรอบวนการที่มีผู้จัดจำนวนมากให้ความสนใจ ในปี ค.ศ. 1999 Palmore และ Kim<sup>10</sup> พัฒนาข้าวแคโทดโดยใช้ออนไซม์ laccase เป็น catalyst และใช้ 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) เป็น mediator รูปที่ 2.5 เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของข้าวแคโทดชนิดต่างๆ ของเซลล์เชื้อเพลิง ได้แก่ ข้าวไฟฟ้าcarbon, platinum และข้าวไฟฟ้าcarbonที่ไม่ดิฟายด์ ด้วยออนไซม์ laccase และ ABTS จากการศึกษาพบว่าข้าวไฟฟ้าcarbonที่ไม่ดิฟายด์ด้วยออนไซม์ laccase และ ABTS ให้ประสิทธิภาพดี โดยสามารถให้ power density สูงถึง  $42 \mu\text{W cm}^{-2}$  ที่ค่าความต่างศักย์  $0.61 \text{ V}$  ( $\text{R} = 1 \text{ k}\Omega$ )



รูปที่ 2.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพข้าวแคโทดชนิดต่าง ๆ ของเซลล์เชื้อเพลิงในเทอมของการให้ power density กับค่าความต่างศักย์ของเซลล์<sup>1</sup>

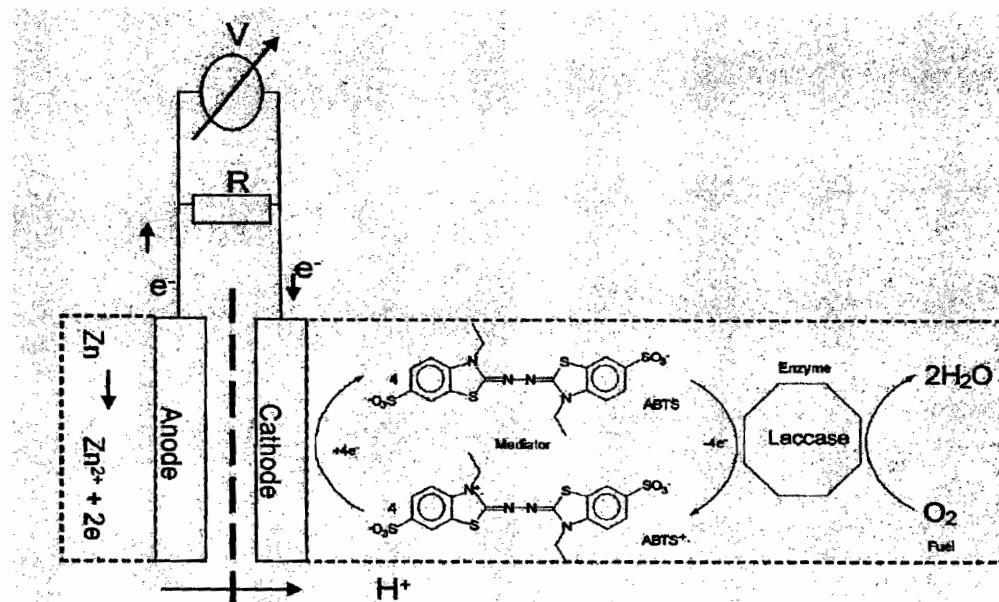
#### - Porous bioelectrode

ในปี ค.ศ. 2005 Farneth และคณะ<sup>13</sup> พัฒนาข้าวไฟฟ้า biocathode โดยใช้พอร์รัสคาร์บอน (porous carbon) ซึ่งมีพื้นผิวสูงเป็นข้าวไฟฟ้าใช้ออนไซม์ laccase เป็น catalyst และใช้ ABTS เป็น mediator ข้อดีของการใช้พอร์รัสคาร์บอนซึ่งมีพื้นที่ผิวที่สูงคือจะทำให้กระแสที่เกิดจากปฏิกิริยาตัดกัชั่นของออกซิเจนสูงขึ้น 3 - 4 เท่า ต่อมา Farneth และ D'More<sup>14</sup> ได้พัฒนาประสิทธิภาพของ biocathode ชนิดนี้ให้ดีขึ้นโดยใช้กระบวนการ encapsulation เพื่อตรึงออนไซม์ laccase โดยให้ทำปฏิกิริยากับ silica แล้วเอาใส่ไว้ในรูพรุนของพอร์รัสคาร์บอน ซึ่งกระบวนการ encapsulation นี้ทำให้ประสิทธิภาพของการเกิดรีตัดกัชั่นของออกซิเจนสูงขึ้น และข้าว biocathode ที่เตรียมขึ้นได้มีความคงตัวสูงซึ่งเป็นลักษณะที่ต้องการอีกประการหนึ่งในการนำไปใช้เป็นข้าวไฟฟ้าในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ

### -Nano-structured biocatalyst

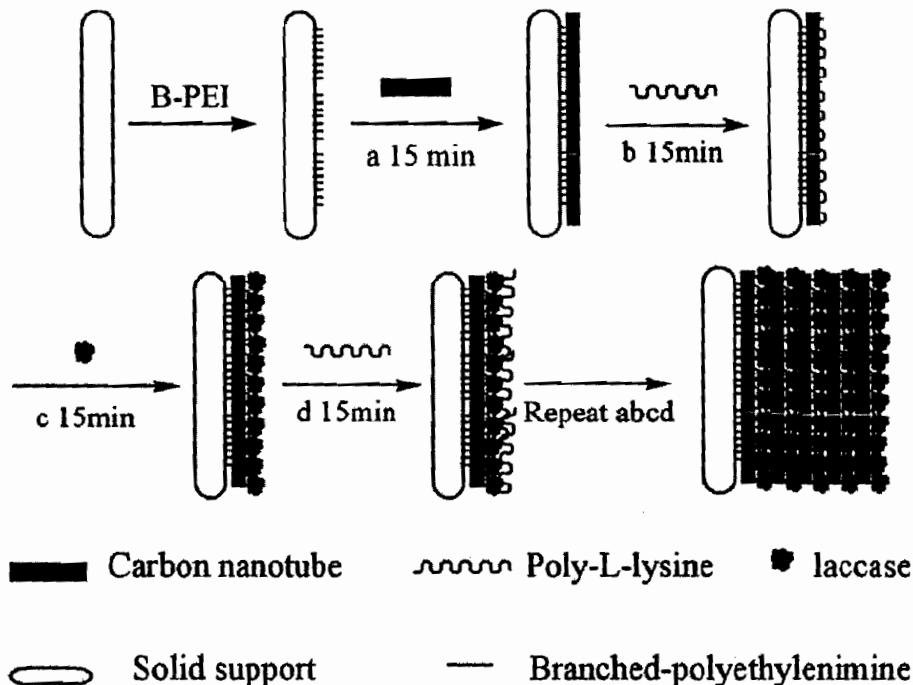
การบอนนาโนทิว์ (carbon nanotube; CNT) คือการบอนที่มีรูปร่างเป็นโครงตัวข่าย ม้วนเชื่อมติดกันเป็นรูปทรงกระบอก และมีเส้นผ่าศูนย์กลางเพียงในระดับนาโนเมตร โครงสร้างของ CNT มีโครงสร้างเป็นแบบโมเลกุลเดียว ที่มีลักษณะเป็นแคลวยาวของคาร์บอนเรียงตัวกันเป็นแนวยาวนับล้านๆ เท่าของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง โครงสร้างของ CNT จะโค้งตัวม้วนเป็นแกนจากด้านหนึ่งไปบรรจบอีกด้านหนึ่ง จากลักษณะการเรียงตัวของโมเลกุลดังกล่าวทำให้ CNT มีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก carbon-based materials อื่น ๆ เช่น glassy carbon (GC), highly oriented pyrolytic graphited (HOPG), fullerene และเพชร<sup>15</sup> CNT มีลักษณะที่พิเศษคือ แข็งแรงและเหนียวกว่าเหล็กกล้า มีพื้นที่ผิวมาก ความยืดหยุ่นสูง โค้งงอได้ สามารถบรรจุอะตอน หรือโมเลกุลชนิดนี้ไว้ภายในห่อได้ นำไปพิมพ์ หรือกล่ายเป็นชั้นวนได้ ขึ้นอยู่กับพิธีทางของแนวการจัดเรียงตัวของอะตอนการบอนบนผนังการบอนนาโนทิว์ นอกจากนี้ยังมีความแข็งแรงและมีน้ำหนักเบา<sup>5</sup> ซึ่งคุณสมบัติที่พิเศษเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางทั้งในด้าน electrochemical sensors, protein electrochemistry, electrocatalysis และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านใบโօเซนเซอร์และเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ<sup>15, 16</sup>

ในปี ค.ศ. 2008 Smolander และคณะ<sup>17</sup> ทำการศึกษาเพื่อพัฒนา printable biocathode โดยใช้พิมพ์หึ่งพิมพ์ต่างๆ เช่น carbon-based ink หรือ silver-based ink ผสมกับ CNT ใช้ ABTS เป็น mediator และเอนไซม์ laccase จากนั้นพิมพ์ลงบนกระดาษกรองให้มีความหนาประมาณ 50  $\mu\text{m}$  biocathode ที่พัฒนาขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับชั้วแอโนไดท์ที่เป็น printed Zn layer ดังรูปที่ 2.6 พบว่าสามารถให้ค่าความต่างศักย์ของเซลล์ที่ 0.6 - 0.8 V เป็นเวลา 2-3 วันเมื่อทดสอบความต้านทานที่ 2.2 k $\Omega$



รูปที่ 2.6 แผนภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ประกอบด้วย laccase-printed biocathode และครึ่งเซลล์ของ Zn<sup>17</sup>

Deng และคณะ<sup>18</sup> ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยพัฒนาข้าวไบโอดีไซด์แบบหลายชั้น (multilayer) ซึ่งเตรียมโดยนำ Indium-doped tin oxide (ITO) อิเล็กโทรดมาเคลือบด้วยฟิล์มของ poly-L-lysine ที่มี CNT และ เอนไซม์ laccase ผ่านกระบวนการ layer-by-layer-self-assembly

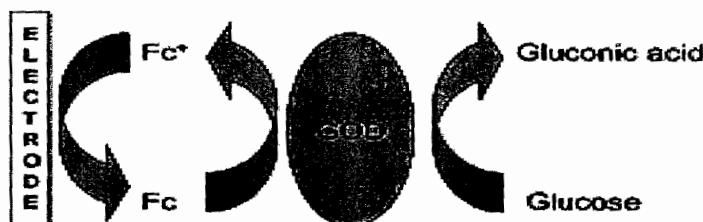


รูปที่ 2.7 แผนภาพกระบวนการเตรียมไบโอดีไซด์แบบ layer-by-layer-self-assembly ของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่พัฒนาขึ้นโดย Deng และคณะ<sup>18</sup>

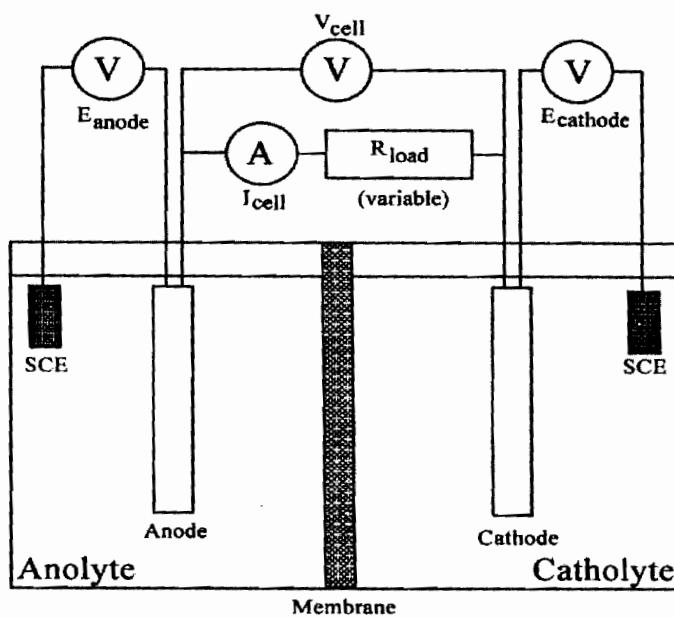
ในการกระบวนการเตรียมแสดงตั้งแต่แผนภาพในรูปที่ 2.7 ขั้นตอนแรกจะทำการเคลือบข้าวอิเล็กโทรด ITO (solid support) ซึ่งมีประจุเป็นลบด้วย branched-polyethylenimine (B-PEI) จากนั้นนำอิเล็กโทรดที่ได้ไปจุ่มในสารละลาย CNT และเอนไซม์ laccase ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำข้าวไบโอดีไซด์แบบหลายชั้น (multilayer) ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ร่วมกับครึ่งเซลล์ของ glucose ที่มีเอนไซม์ glucose dehydrogenase (GDH) เป็น catalyst และ NAD<sup>+</sup> เป็น cofactor พบร่วมกับเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้สามารถให้ power density สูงถึง  $329 \mu\text{W cm}^{-2}$  ที่ค่าความต่างศักย์ 0.47 V

### 2.3 Glucose oxidase-based bioanodes

ในปี ก.ศ. 2002 Pizzariello และคณะ<sup>19</sup> พัฒนาเซลล์เชือเพลิงชีวภาพซึ่งประกอบด้วยขั้วแອโนเดชnid คาร์บอนที่ติดตัวเยนไซม์ glucose oxidase และใช้ ferrocene เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันดังรูปที่ 2.8 ส่วนแคโทดมีลักษณะคล้ายกันแต่ใช้เยนไซม์แตกต่างคือใช้ horseradish peroxidase แผนภาพขององค์ประกอบของเซลล์แสดงในรูปที่ 2.9 เซลล์เชือเพลิงชีวภาพที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้เมื่อให้ศักย์แก่ระบบ 0.22 โวลต์ พบว่าสามารถที่จะให้กำลังออกมา  $0.15 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  เซลล์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมานี้มีอายุการใช้งานได้ 30 วัน

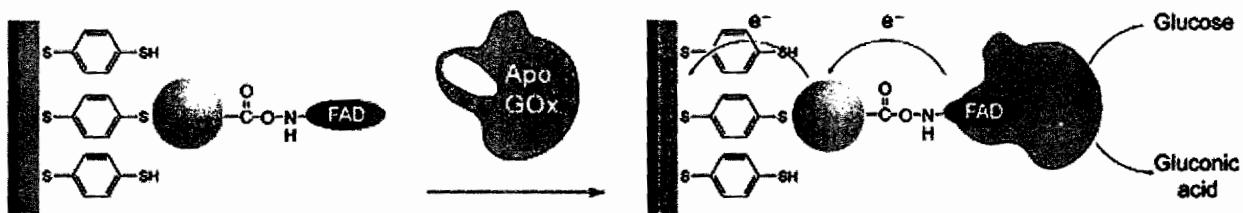


รูปที่ 2.8 แสดงการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยมี Ferrocene เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอน<sup>19</sup>



รูปที่ 2.9 แผนภาพแสดงองค์ประกอบของเซลล์เชือเพลิงโดยมีกลูโคสและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเชือเพลิงและออกซิเดนซ์ตามลำดับ ใช้ glucose oxidase และ horseradish peroxidase ตึงบนขั้วไฟฟ้าแອโนเดชnid และแคโทดตามลำดับ<sup>19</sup>

ในปี ค.ศ. 2003 กลุ่มวิจัยของ Xiao<sup>20</sup> ได้พัฒนาข้าวไฟฟ้าที่มีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อพัฒนาไปเป็นแอโนนดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยใช้ Flavin adenine dinucleotide (FAD) เชื่อมต่อ กับ semiconductor nanoparticle เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอนและมี dithio เป็นตัวเชื่อมระหว่างตัวนำส่งกับผิวน้ำอิเล็กโทรดที่ทำด้วยทองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งอิเล็กตรอนแสดงดังรูปที่ 2.10



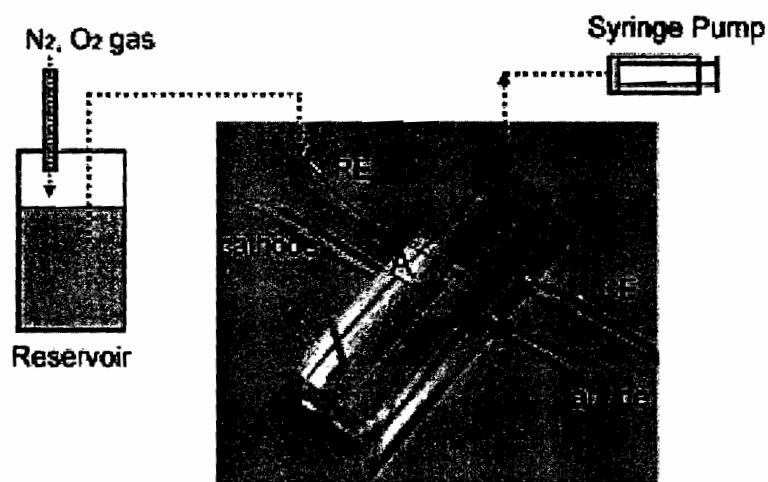
รูปที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของ Au-semiconductor nanoparticle glucose oxidase electrode<sup>20</sup>

ปี ค.ศ. 2006 Barriere และคณะ<sup>21</sup> ได้ศึกษาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ประกอบด้วยแอโนดตรึงด้วยเอนไซม์ glucose oxidase และขี้วัคโตก็อดตรึงด้วยเอนไซม์ laccase โดยใช้ osmium-based redox polymer เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอนบนกราฟฟิตอิเล็กโทรด ศึกษาภายใต้อุณหภูมิ 37 °C เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 4.4-7.4 พบว่าสามารถให้พลังงาน 10 - 40 μW/cm<sup>2</sup>

ในปี ค.ศ. 2006 Ivnitski และคณะ<sup>22</sup> ได้พัฒนาข้าวไฟฟ้าแอโนดที่มีการตรึงเอนไซม์ glucose oxidase ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยตรึงเอนไซม์บน multi-wall carbon nanotube (MWCNT) ซึ่งจะช่วยในการนำส่งอิเล็กตรอนโดยตรง ทำการทดลองภายใต้อุณหภูมิ 25 °C ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 20 mM ในสารละลายอิเล็กโทรไลท์ 0.1 M KCl ให้ศักย์แก๊ะโนด -0.38 และ -0.4 โวลต์ เทียบกับข้าวไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl ผลทำให้เกิดการไหลของอิเล็กตรอนโดยตรงในระบบโดยไม่ต้องใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน

ปี ค.ศ. 2007 Lui และ Dong<sup>23, 24</sup> ได้พัฒนาข้าวไฟฟ้าสำหรับเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยการตรึงเอนไซม์ glucose oxidase และ laccase บน MWCNT เป็นแคตตาไลติกแอโนดและแคโตก็อดตามลำดับ เซลล์เชื้อเพลิงที่พัฒนาขึ้นใช้ ferrocence mono carboxylic acid เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอน ของข้าวแอโนด จากผลการทำลงสามารถให้พลังงาน 4.1 μW

ในปี ค.ศ. 2008 Togo และคณะ<sup>25</sup> ศึกษาและพัฒนาการย่อระบบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีขนาดไมโคร (micro fluidic biofuel cell) โดยระบบที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วย กลูโคสแอโนดโดยตรึงเอนไซม์ glucose dehydrogenase, ไ道อะฟโลเรส (diaphorase) และ VK<sub>3</sub>-pendent poly-L-lysine ส่วนขี้วัคโตก็อดทำการตรึงเอนไซม์ bilirubin oxidase บนออกซิเจนแคโตก็อด ดังรูปที่ 2.11 ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกระแสได้ดีขึ้นกว่าเซลล์ปกติ 10 %



รูปที่ 2.11 microfluidic biofuel cell <sup>25</sup>

### บทที่ 3

#### การทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ในการศึกษาวิจัยนี้ มีเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองใช้คลิกโอลแทนเมทรีและแอมเพอร์โรมეทร์ ดังตารางที่ 3.1 และ ระบบเอฟไอเออที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรมีต์ ดังตารางที่ 3.2

**ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดใช้คลิกโอลแทนเมทรีและแอมเพอร์โรมีต์**

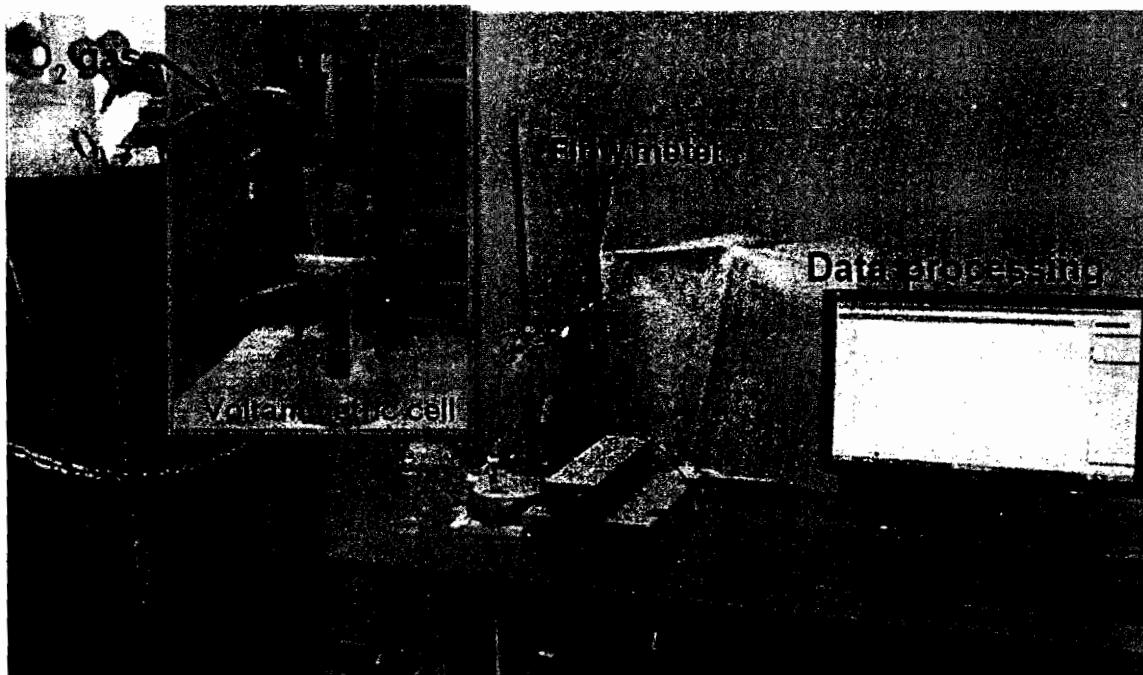
Instrument	Model	Company
Potentiostat, e-Corder	EA161, 210	eDAQ, Australia
Data System	e-Chem	
Working electrode	Glassy carbon electrode (3 mm)	CH Instruments, USA
Reference electrode	Ag/AgCl electrode (3 M KCl)	CH Instruments, USA
Auxiliary electrode	Pt wire	CH Instruments, USA
Thin layer flow cell	CHI 130	CH Instruments, USA
Flow meter	100624-103	Kofloc, Japan

**ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบเอฟไอเออที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรมีต์**

Instrument	Model	Company
Injection	20 $\mu$ L injection loop	Rheodyne, USA.
Pump	LC-10AD	Shimadzu
Detector	EA161, 210	eDAQ, Australia
Data system	eDAQ-chart	eDAQ, Australia
Thin layer flow cell	CHI 130	CH Instruments, USA

### Cyclic voltammetry and amperometry

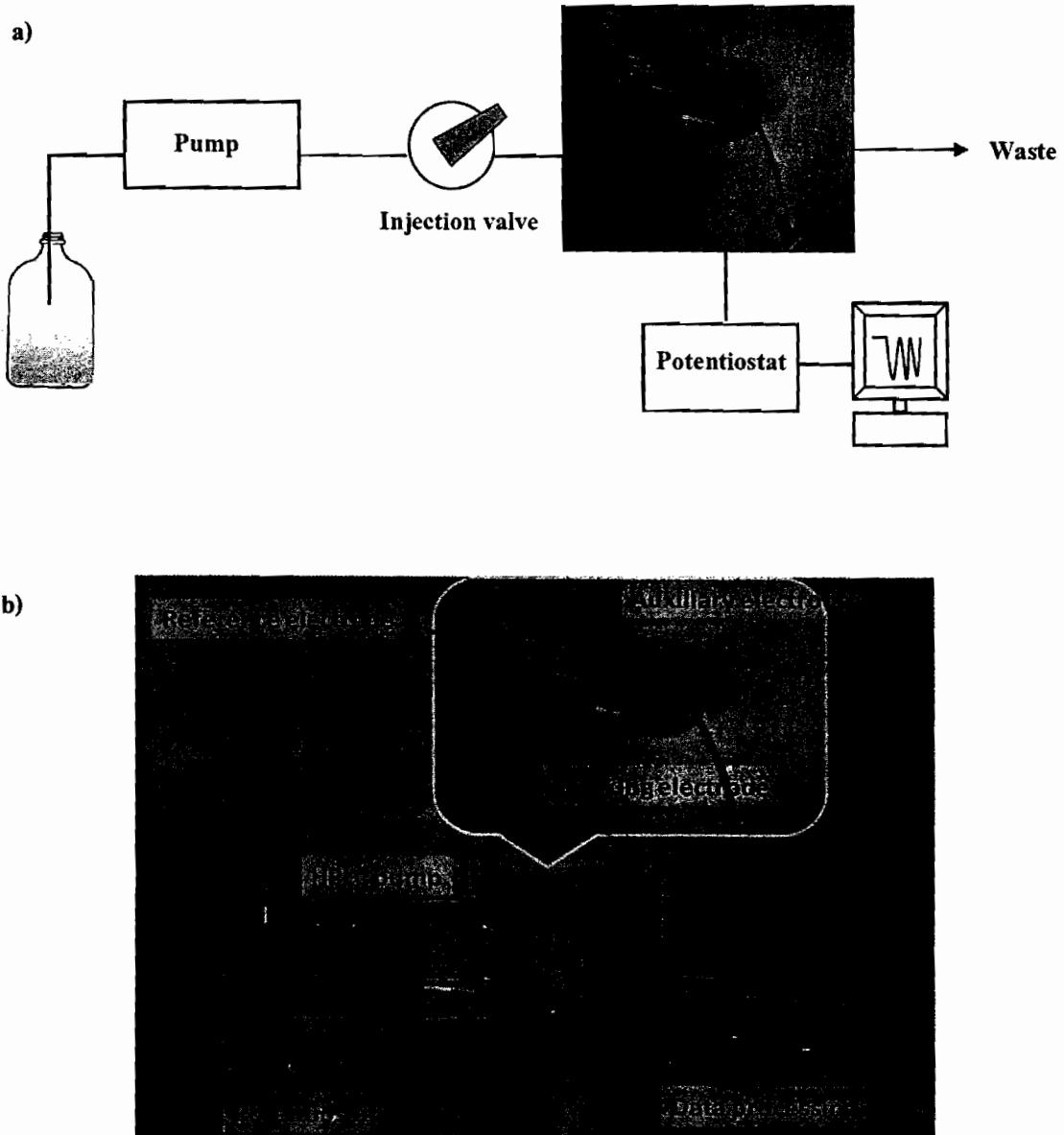
การทดลองใช้คลิกโวลแتمและแอมเพอร์โรมิตรีแสดงดังรูปที่ 3.1 เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210 (บริษัท EDAQ) และ โวลแتمเมทริกเซลล์ ขนาด 25 mL (รูปแทรก, รูปที่ 3.1) ประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า 3 ชั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้านิคกลาสซีคาร์บอน(GC) ธรรมชาติ (3 mm diameter) หรือ ขั้วไฟฟากลางซี คาร์บอนที่มีดิฟายด์ด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้า อ้างอิงและ ใช้ลวด Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย



รูปที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองใช้คลิกโวลแتمเมทรีและแอมเพอร์โรมิตรี รูปแทรกแสดงโวลแتم เมทริกเซลล์

### Flow Injection system with amperometric detection

ระบบเอฟไอเอที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรมทรีแสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 (a) แม่นิโฟลด์ของระบบเอฟไอเอที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรมทรี (b) รูปเครื่องมือที่ใช้ที่ใช้ในการทดลอง

### 3.2 การพัฒนาข้าวใบโอดาโคโนนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase

งานวิจัยในส่วนแรกนี้ได้พัฒนาเทคนิคในการตีรังเรอนไนเม็มแลคเคสนผิวน้ำของข้าวไฟฟ้าชนิดกลาสซีการบอนโดยใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ ซึ่งเป็นสารที่มีพื้นที่ผิวสูงและสามารถจุสารต่างๆ ในท่อการบอนนาโนทิวบ์ได้ เป็นตัวช่วยให้สามารถตีรังเรอนไนเม็มแลคเคสได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ในการพัฒนาข้าวใบโอดาโคโนดโดยใช้เอนไซม์แลคเคสในการตรวจวัดปฏิกิริยาตัดชันของออกซิเจน โดยจะใช้เทคนิคไซคลิกโอลแทมเมทร์ในการศึกษาทำการศึกษาทำการสอนค์ประกอบที่เหมาะสมของข้าวใบโอดาโคโนด และเลือกใช้สารละลายน 0.1 M ชิเทրบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นสารละลายนิเล็กโตรไอล์ต์เกื้องหนุน ในการศึกษาไซคลิกโอลแทมโมแกรมของออกซิเจน

#### สารเคมี

เอนไซม์แลคเคส (Laccase, EC 1.10.3.2) จาก Trametes Versicolor 22.4U/mg (Sigma-Aldrich) คาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotubes; CNT, บริสุทธิ์ 95%), (NanoLab), ไดเมธิลฟอร์มานไมน์ (DMF),(Fluka) ไคโตซาน (Chitosan; CS, medium molecular weight, 75-85% deacetylated) (Sigma-Aldrich), โบวีนซีรัมอัลบูมีน (Bovine Serum Albumin; BSA, non acetylated), (Sigma-Aldrich), ชิเทรบัฟเฟอร์ เตรียมจากซิติกแอชิดโมโนไฮเดรต และไดโซเดียมชิเทรต

#### การเตรียมสารเคมี

สารละลายนแลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยซึ่งเอนไซม์แลคเคส 4 มิลลิกรัมใส่ในขวดขนาด 2 มิลลิลิตร ปีเปตสารละลายน 0.1 โมลาร์ ชิเทรบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด นำสารละลายนไปเขย่าด้วย vertex mixer ประมาณ 5 นาที

สารละลายนิเวนซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% เตรียมโดยปีเปตโบวีนซีรัมอัลบูมีนมา 100 ไมโครลิตร ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำ

สารละลายนิเวนซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยพัฒนาจากวิธีของ J. Wang และ M. Musameh<sup>26</sup> โดยซึ่งคาร์บอนนาโนทิวบ์ 3.0 มิลลิกรัม ใส่ในขวดขนาด 5 มิลลิลิตร ปีเปตสารละลายนิเล็กโตรไอล์ต์ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลายนิเวนซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% เตรียมโดยพัฒนาจากวิธีของ T. Tangkuaram และคณะ<sup>27</sup>โดยซึ่งไคโตซาน 0.10 กรัม ใส่ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ปีเปตลดอัลกิลิคความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรใส่ในขวด นำไปวนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สารละลายนิเวนซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายนิเวนซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% มาอย่างละ 500 ไมโครลิตร ใส่ในขวดขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vertex mixer ประมาณ 5 นาที

ก่อนนำข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปดัดแปรเป็นข้าไฟฟ้าชนิดต่าง ๆ จะนำข้าไฟฟ้ามาทำความสะอาด โดยขัดผิวน้ำของข้าไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาด โดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3 และ 0.05 ไมครอน ตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate ในน้ำเป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

#### **การเตรียมข้าไฟฟ้า**

ก่อนนำข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปดัดแปรเป็นข้าไฟฟ้าชนิดต่าง ๆ จะนำข้าไฟฟ้ามาทำความสะอาด โดยขัดผิวน้ำของข้าไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาด โดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3 และ 0.05 ไมครอน ตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate ในน้ำเป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

#### **ข้าไฟฟ้า GC/laccase**

หยดสารละลายเอนไซม์แลคเคลสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทึ่งไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้าข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์แลคเคลส (GC/laccase)

#### **ข้าไฟฟ้า GC/CNT**

หยดสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทึ่งไว้ในแห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้าข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT)

#### **ข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS**

หยดสารละลายของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณ บนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทึ่งไว้ในแห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้าข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณ (GC/CNT-CS)

#### **การตรึงเอนไซม์แลคเคลสและสารละลายโบวีนชีรัมอัลบูมีนบนข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS**

นำข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS ที่ได้จากการเตรียมมาตั้งเริ่มเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์แลคเคลสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และหยดสารละลายโบวีนชีรัมอัลบูมีน ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณ เอนไซม์แลคเคลส และโบวีนชีรัมอัลบูมีน (GC/CNT-CS/laccase/BSA)

#### **การตรวจวัดปริมาณออกซิเจน**

ศึกษาปฏิกริยาเรดักชันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิกโวเทมเมทร์โดยใช้เครื่อง โพเทนชิโอสเตท และระบบ 3 ข้าไฟฟ้า ใช้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) หรือข้าไฟฟ้าไบโอดีเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมา เป็นข้าไฟฟ้าทำงาน โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0.0 ถึง -0.6 โวลต์ เทียบกับข้าไฟฟ้าอ้างอิง ให้แก่ข้าไฟฟ้าทำงาน ในสารละลายของ ซิเทรดบัพเพอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การทดลองในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน จะนำสารละลายนิเตรตบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่อิ่มด้วยแก๊สออกอกอน (Ar) มาทำการวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวเทนเมทริเกย์ได้บรรยายกาศแก๊สออกอกอน ส่วนในสภาวะที่มีออกซิเจนจะนำสารละลายนิเตรตบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อิ่มด้วยแก๊สออกอกูโคน มาทำการทดลองภายใต้อัตราการไหลของออกอกูโคน 40 มิลลิลิตรต่อนาที

### 3.3 การพัฒนาข้าวใบโอลอโนดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

#### 3.3.1 การพัฒนาข้าวใบโอลอโนดโดยใช้โพลิเมอร์ชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) ใน การครึ่งเอนไซม์กลูโคสออกอกูโคน

งานวิจัยในส่วนนี้ได้พัฒนากลูโคสใบโอลอโนดโดยใช้โพลิเมอร์ชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) ใน การครึ่งเอนไซม์กลูโคสออกอกูโคน งานวิจัยในส่วนนี้ได้พัฒนาจากกลูโคสใบโอลอโนดโดยใช้โพลิเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง และมีสภาพไว้สูงโดยการ ผสมพ้ายด้วยไฟฟ้ากากาศที่สามารถดูดไขโพลิเมอร์นำไปใช้เป็นตัวเร่งตัวเร่ง polyaniiline (co-m-ferrocenylaniline) และได้ต่อ ชานซึ่งเป็นใบโอลอโนดโดยใช้โพลิเมอร์ธรรมชาติตามช่วยในการทำให้เอนไซม์กลูโคสออกอกูโคนมีความคงตัวมากขึ้น เพื่อพัฒนา เป็นใบโอลอโนดสำหรับตรวจวัดปริมาณของกลูโคส

#### การเตรียมสารละลายน้ำที่ใช้ในการโมดิฟายด์ข้าวไฟฟ้า

สารละลายนิเตรต ความเข้มข้น 0.5% เตรียมโดย ซึ่งไคโตชานมา 0.0500 g ละลายน้ำด้วยสารละลายนิตรอ acetic acid ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10 mL นำไปกวนเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายนิเตรต ความเข้มข้น 0.5%

สารละลายนิตร poly (aniline-co-m-ferrocenylaniline) ความเข้มข้น 2.5 mg/mL เตรียม โดย ซึ่ง poly (aniline-co-m-ferrocenylaniline) หรือ PFcANI มา 0.0050 g ละลายน้ำ tetrahydrofuran (THF) 2 mL นำไป sonicate เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

สารละลายนิตร ความเข้มข้น 2 mg/mL เตรียมโดย ซึ่งกลูโคสออกอกูโคนมา 0.0020 g ละลายน้ำด้วยสารละลายนิตร pH 7 ปริมาตร 1 mL (เก็บไว้ในตู้เย็น)

สารละลายนิตร Sodium Citrate ความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ซึ่ง sodium citrate มา 0.1000 g ละลายน้ำด้วยน้ำ DI ปริมาณเล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยน้ำ DI

สารละลายนูภาคทองนาโน (AuNPs) ความเข้มข้น 0.01% เตรียมโดย ปีเปตสารละลายนิตร HAuCl<sub>4</sub> มา 10 mL เจือจางด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยน้ำ DI จากนั้นปีเปตสารละลายนิตร HAuCl<sub>4</sub> มาปริมาตร 5 mL นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที พร้อมกับการติดต่อเวลา จากนั้นเติมสารละลายนิตร Sodium Citrate ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 170 μL ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125°C พร้อมกับการติดต่อเวลา เป็นเวลา 30 นาที จะได้ AuNPs ความเข้มข้น 10 mM

สารละลายนิตรฐานกลูโคส (glucose standard solution) ความเข้มข้น 0.2 M เตรียมโดย ซึ่งกลูโคส มา 1.8000 g ละลายน้ำด้วยสารละลายนิตร pH 7 ปริมาณเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายนิตร

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ให้ครบ 50 mL จะได้สารละลายน้ำตาลกูลูโคส (glucose standard solution) ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 50 mL ซึ่งใช้เป็น stock solution ในการเตรียมสารละลายน้ำตาลกูลูโคสความเข้มข้นต่างๆ

**การเตรียมชี้วิไฟฟ้าใบโอดอนดินิตต่างๆ โดยใช้โพลีเมอร์ ชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline)**

#### GC/PFcANI

เตรียมโดยหยดสารละลาย PFcANI ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนชี้วิไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 40 ไมโครลิตรในโครงลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ชี้วิไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลาย polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) หรือ GC/PFcANI

#### GC/PFcANI/GOx

นำชี้วิไฟฟ้า GC/PFcANI ที่ได้จากการเตรียมมาตรึงเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์กูลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรในโครงลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ชี้วิไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลาย PFcANI และ กูลูโคสออกซิเดส (GC/PFcANI/GOx)

#### GC/CS/PFcANI

หยดสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 0.5% บนชี้วิไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดสารละลาย PFcANI ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนชี้วิไฟฟ้า 40 ไมโครลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ชี้วิไฟฟ้า GC/CS/PFcANI

#### GC/CS/PFcANI/GOx

นำชี้วิไฟฟ้า GC/CS/PFcANI มาตรึงเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์กูลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรในโครงลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ชี้วิไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลาย CS, PFcANI และ กูลูโคสออกซิเดส (GC/PFcANI/GOx)

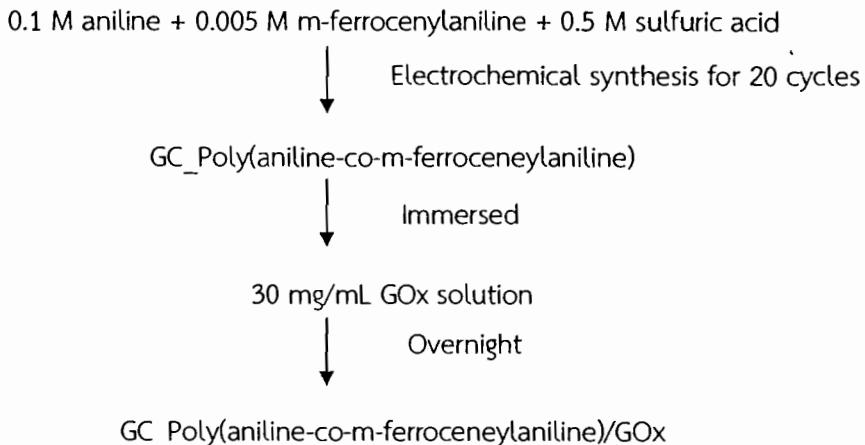
#### GC/CS/PFcANI/AuNPs/GOx

นำชี้วิไฟฟ้า GC/CS/PFcANI น้ำยาสารละลายนูนภาคทองนาโน ปริมาตร 40 ไมโครลิตรในโครงลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จนนั่นนำมาตรึงเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์กูลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรในโครงลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ชี้วิไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลาย CS, PFcANI, AuNPs และ กูลูโคสออกซิเดส (GC/PFcANI/AuNPs/GOx)

#### การสังเคราะห์ poly(aniline-co-m-ferrocenylaniline) ด้วยวิธีการทางไฟฟ้า

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาและพัฒนาชี้วิไฟฟ้าโดยใช้โพลีเมอร์ในกลุ่มโพลิอนิลีนที่มีหมู่เฟอร์เซ็นเป็นหมู่แทนที่บันทงเบนซินด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางไฟฟ้า (electrochemical synthesis) เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการ

นำมาช่วยตึงเงนไชเมกูลูโคสออกซิเดส โดยการแสกนค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.3 ถึง 0.9 โวลต์ จำนวน 10 รอบ รายละเอียดแสดงดัง Flow diagram



เรียกว่าไฟฟ้าที่เตรียมได้นี้ว่า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni) จากนั้นนำไปตึงเงนไชเมกูลูโคสออกซิเดส ชั่วไฟฟ้าในสารละลายน้ำ 30 mg/mL GOx เป็นเวลา 1 คืน ก่อนนำไปใช้เคราะห์กูลูโคส

### 3.3.2 การพัฒนาขึ้นไปอย่างต่อเนื่องโดยใช้นาโนคอมโพสิตของคาร์บอนนาโนทิเบ็ต และไคโตโซนในการตึงเงนไชเมกูลูโคสออกซิเดส

#### สารเคมี

ไคโตโซน (Chitosan; CS, medium molecular weight)(Sigma), คาร์บอนนาโนทิเบ็ต (Carbon nanotube : MWCNT, บริสุทธิ์ 95%), (Nanolabinc., MA, USA), เอนไซเมกูลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) เพอร์โตรีซินคาร์บอซัลเดไฮด์ (Ferrocenecarboxaldehyde; FcCHO, AR เกรด)(Sigma), พอสเฟตบัฟเฟอร์ เตรียมจากไดอะเดียมไอกโซಡเจนฟอสเฟต และโพเทเชียมไดอะಡเจนฟอสเฟต (pH 7.0, 0.1M)

#### การเตรียมสารเคมี

สารละลายน้ำ ไคโตโซน ความเข้มข้น 0.5 % (0.5 % chitosan) เตรียมโดย ชั่งไคโตโซน มา 0.0500 g ละลายน้ำสารละลายน้ำ กระดาษซีติก ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10 mL จากนั้นกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายน้ำไคโตโซนที่มีลักษณะ ขัน ใส ไม่มีสี

การเตรียม MWCNT-FcCHO และ MWCNT-NH<sub>2</sub>-FcCHO ชั่ง MWCNT มา 15 mg และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 mL นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น เดิม FcCHO ความเข้มข้น 7 mg/mL ปริมาตร 10 mL นำไป stirred ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้ง หลังจากนั้นนำไป centrifuge 15 นาทีตั้งทิ้งไว้ให้ตกร่อง กองล้างด้วยเมทานอล 10 mL และล้างด้วยน้ำ DI 10 mL นำตกร่อง MWCNT ที่ได้ไปอบให้แห้งการเตรียม MWCNT-NH<sub>2</sub>-FcCHO สามารถเตรียมได้ในทำงเดียวกัน โดยใช้ MWCNT-NH<sub>2</sub> แทน MWCNT

การเตรียม MWCNT-FcCHO-NaCNBH<sub>3</sub> และ MWCNT-NH<sub>2</sub>-FcCHO-NaCNBH<sub>3</sub> โดยชั้ง MWCNT มา 15 mg แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 mL นำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 7 mg/mL FcCHO ปริมาตร 10 mL นำไป stirred ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเติม NaCNBH<sub>3</sub> 200 mg นำไป stirred ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้งหลังจากนั้นนำไป centrifuge 15 นาทีตั้งทึ้งไว้ให้ตกรตะกอน ล้างด้วย เมทานอล 10 mL และล้างด้วยน้ำ DI 10 mL นำผงที่ได้ไปอบให้แห้ง จะได้ MWCNT-FcCHO-NaCNBH<sub>3</sub> การเตรียม MWCNT-NH<sub>2</sub>-FcCHO-NaCNBH<sub>3</sub> สามารถเตรียมได้ในทำนองเดียวกัน

สารละลายผสม MWCNT-CS เตรียมโดยชั้งคาร์บอนนาโนทิวบ์ (MWCNT) มา 4 mg เติมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5 % ปริมาตร 1 mL แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที คาร์บอนนาโนทิวบ์ชนิดอื่นสามารถทำการเตรียมได้ทำนองเดียวกัน

สารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั้งคาร์บอนนาโนทิวบ์ (MWCNT) มา 4 mg ลงในขวด เติม DMF ปริมาตร 1 mL นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที คาร์บอนนาโนทิวบ์ชนิดอื่นสามารถทำการเตรียมได้ทำนองเดียวกัน

สารละลายเออนไซเม็กلوโคสออกซิเดสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยชั้งเออนไซเม็กلوโคสออกซิเดส มา 2 mg ละลายในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 mL สารละลายเฟอร์โรซิเนอร์บอชลัดดีไซด์ (FcCHO) สามารถเตรียมได้โดย ชั้ง FcCHO  $0.2140 \pm 0.0005$  g ละลายด้วยเมทานอล 10 mL เทลงในขวดวัดปริมาตร 50 mL ปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอลจะได้สารละลาย FcCHO ความเข้มข้น 20 mM ซึ่งใช้เป็น stock solution

การตรวจ FcCHO ในคาร์บอนนาโนทิวบ์โดยใช้การดูดซับทางกายภาพร่วมกับวิธีการทางเคมี เตรียม MWCNT-FcCHO โดยชั้ง MWCNT มา 15 mg แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 mL นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 7 mg/mL FcCHO ปริมาตร 10 mL นำไป stirr ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเติม NaCNBH<sub>3</sub> 200 mg นำไป stirred ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonicate เป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้งหลังจากนั้นนำไป centrifuge 15 นาทีตั้งทึ้งไว้ให้ตกรตะกอนแล้วคูดส่วนที่เสื่อม นำสารที่เตรียมได้ล้างด้วย เมทานอล 10 mL สองครั้ง และล้างด้วยน้ำ DI 10 mL สองครั้ง นำผงที่ได้ไปอบให้แห้งเราจะได้ผงที่เรียกว่า MWCNT-FcCHO

### การเตรียมข้าไฟฟ้า

ก่อนที่จะนำข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปดัดแปลงไปเป็นข้าไฟฟ้าชนิดต่างๆ ต้องนำข้าไฟฟ้ามาทำความสะอาดโดยขัดผิวน้ำของข้าไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินิกับผ้าลักษณะโดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3, และ 0.05 ไมครอนตามลำดับ จากนั้nl ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate กับน้ำประปาจากไอก้อน 5 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

### ข้าไฟฟ้า GC/GOx

หยดสารละลายเออนไซเม็กلوโคสออกซิเดสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรบนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ทึ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยเออนไซเม็กلوโคสออกซิเดส (GC/GOx)

### **ข้าไฟฟ้า GC/CS**

หดสารละลายไคโটอ่านความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 40 มิลลิลิตรบนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ทึ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยไคโটอาน (GC/CS)

### **ข้าไฟฟ้า GC/MWCNT**

หดสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรบนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ทึ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/MWCNT)

### **ข้าไฟฟ้า GC/MWCNT-CS**

หดสารละลาย MWCNT-CS ปริมาตร 40 มิลลิลิตรบนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ทึ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์และเอนไซม์กูลโคสออกซิเดส (GC/MWCNT-CS)

### **ข้าไฟฟ้า GC/MWCNT-CS-GOx**

นำสารละลาย MWCNT-CS ปริมาตร 50 มิลลิลิตรและสารละลายเอนไซม์กูลโคสออกซิเดสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาผสมกันในชุดให้เข้ากันด้วย vertex mixer เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายผสม MWCNT-CS-GOx

นำสารละลาย MWCNT-CS-GOx 40 มิลลิลิตรมาคริติรบนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ทึ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ไคโটอานและเอนไซม์กูลโคสออกซิเดส (GC/MWCNT-CS-GOx)

### **การตรวจวัดปริมาณกูลโคส**

ศึกษาปฏิกริยาออกซิเดชันของกูลโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวทัมเมทรี (cyclic voltammetry ; CV) โดยใช้เครื่องโพเทนชิโอลสเตท และระบบ 3 ข้าไฟฟ้า ใช้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) หรือข้าไฟฟ้าไบโอดีเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เป็นข้าไฟฟ้าทำงาน โดยใช้ศักยไฟฟ้าในช่วง +0.15 ถึง +0.50 V เทียบกับข้าไฟฟ้าอ้างอิง ให้ข้าไฟฟ้าทำงานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิ摩ลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีเฟอร์โรซีนคาร์บอชัลตีไฮด์ (FcCHO) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเมดิเอเตอร์ ทั้งหมดทำทำภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (ภายใต้บรรยากาศกําก朽ของกํอกอน)

## บทที่ 4

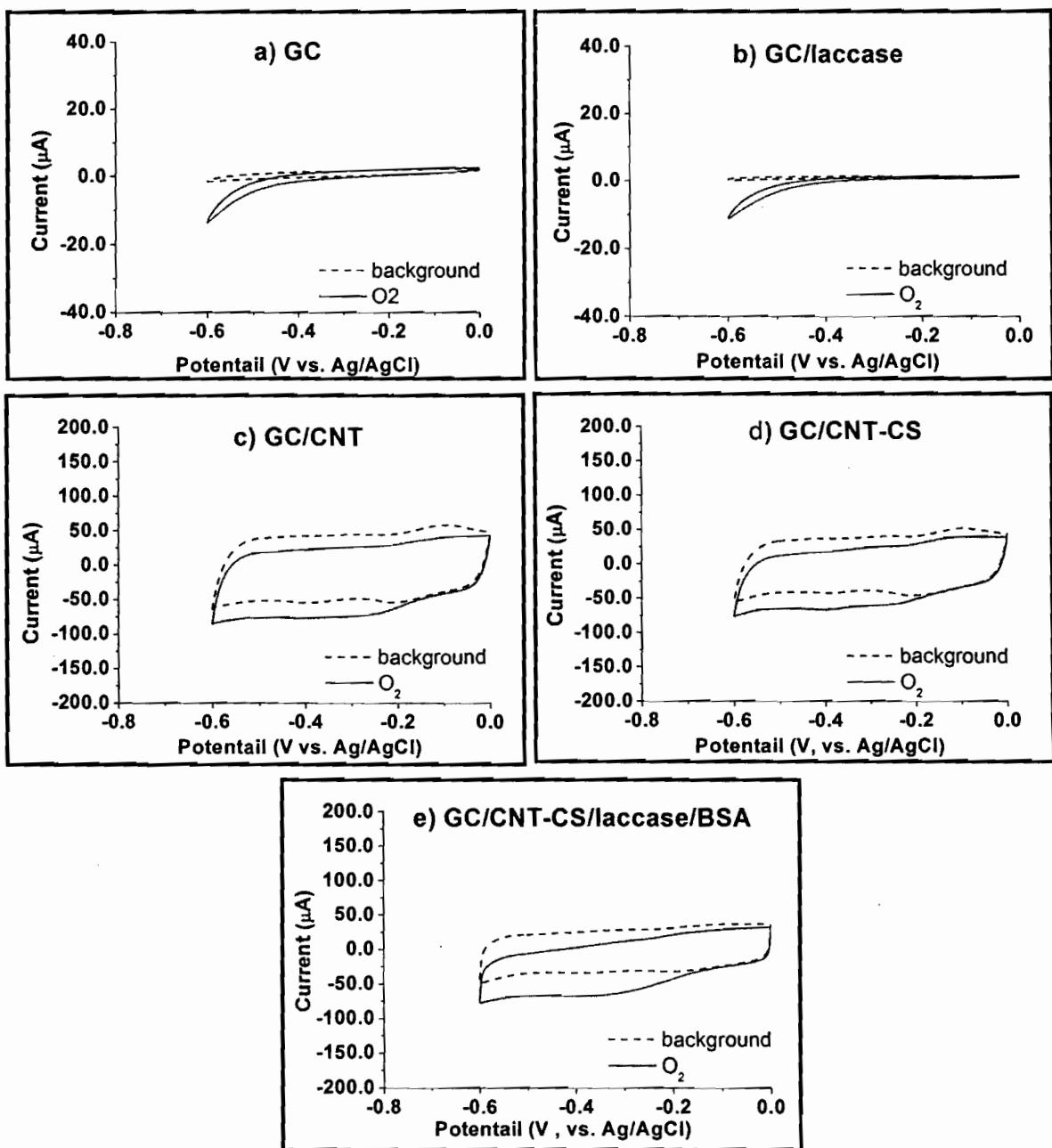
### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การพัฒนาข้าวใบโอแคล็อกโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase

#### 4.1.1 การศึกษาห้องค์ประกอบที่เหมาะสมของใบโอแคล็อกโทด

การศึกษาห้องค์ประกอบที่เหมาะสมของใบโอแคล็อกโทดโดยใช้แลคเคสในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) จะศึกษาการเกิดปฏิกิริยาที่ข้าวไฟฟ้าทั้ง 5 ชนิด (a-e) ได้แก่ a: ข้าวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC), b: ข้าวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคส (GC/laccase), c: ข้าวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่มีดิฟายด์ด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT), d: ข้าวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณคอมโพสิต (GC/CNT-CS) และ e: กลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณคอมโพสิต สารละลายเอนไซม์แลคเคส และสารละลายใบวินเชร์รัมอัลบูมีน (GC/CNT-CS/laccase/ BSA) ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1

พบว่าปฏิกิริยาเรตักชันของออกซิเจนเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าสูงกว่า -0.6 V เมื่อใช้ GC และ GC/laccase เป็นข้าวไฟฟ้า แต่เมื่อใช้ข้าว GC/CNT, ข้าวGC/CNT-CS และข้าว GC/CNT-CS/laccase/BSA เป็นข้าวไฟฟ้าใช้งานปฏิกิริยาเรตักชันเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.3 ถึง -0.4 V จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4.1 c , d และ e) พบว่าค่ากระแสพื้น (background current; B) ของข้าวไฟฟ้า GC/CNT สูงที่สุดตามด้วย GC/CNT-CS และข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ตามลำดับ เมื่อพิจารณาที่ข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA พบว่าให้สัญญาณ (Signal; S) จากค่ากระแสเรตักชันของออกซิเจนมีอlobด้วยค่ากระแสพื้น (S/B) ที่มีค่ามากที่สุด แสดงว่ามีสภาพไฟสูงที่สุด และให้ค่าศักย์ที่ยอดพีค ( $E_p$ ) ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 V แสดงว่าปฏิกิริยาเรตักชันของออกซิเจนถูก catalyzed ด้วยประสิทธิภาพสูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีพื้นที่ผิวสูงและนำไฟฟ้าได้ดี และสมบัติที่เข้ากันได้กับสารชีวภาพของไคโตชาณจึงทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ได้ดี และส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ อีกทั้งยังสนับสนุนด้วยสารละลายใบวินเชร์รัมอัลบูมีนที่ช่วยให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานมากขึ้น ส่งผลให้ค่ากระแสเฉลี่ยค่ามากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่เตรียมได้มีลักษณะทางกายภาพที่เสถียร คือเมื่อล้างด้วยน้ำกลันก่อนทำการวัดจะไม่ทำให้เกิดการหลุดร่อนของสารละลายที่นำมาโมดิฟายด์ที่ผิวน้ำของข้าวไฟฟ้า

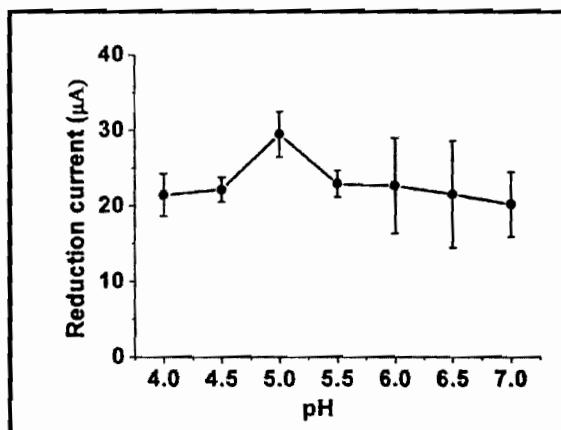


รูปที่ 4.1 ไฟคอลิกโวลแทด์โนมแกรมของ (a) ขั้วไฟฟ้า GC ในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน (เส้นประ) และในสภาวะที่มีออกซิเจน (เส้นทึบ), (b) ขั้วไฟฟ้า GC/laccase, (c) ขั้วไฟฟ้า GC/CNT, (d) ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS และ (e) ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ซิเทรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร พิโซช 5.0 (อัตราการไหลของออกซิเจนหนึ่งสารละลายเป็น 40 มิลลิลิตรต่อนาที)

#### 4.1.2 การศึกษาหาองค์ประกอบสารละลายที่ใช้โมดิฟายด์ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนและสภาวะที่เหมาะสมของการวัดค่ากระแสเรติกซั่นของออกซิเจน

การศึกษาหาพีอีของสารละลายอิเล็กโทรไรลิต์เกือบหนุนที่เหมาะสม

ข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA จะถูกนำไปตรวจด้วยปฏิกิริยาเรติกซั่นของออกซิเจนในสารละลายซิเทրบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 มोลาร์ พีอี 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2 ค่ากระแสเรติกซั่นในรูปเป็นค่าเฉลี่ยจาก ข้าไฟฟ้าที่เตรียมขึ้น 3 ข้าไฟฟ้า ส่วนแนวความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวัด



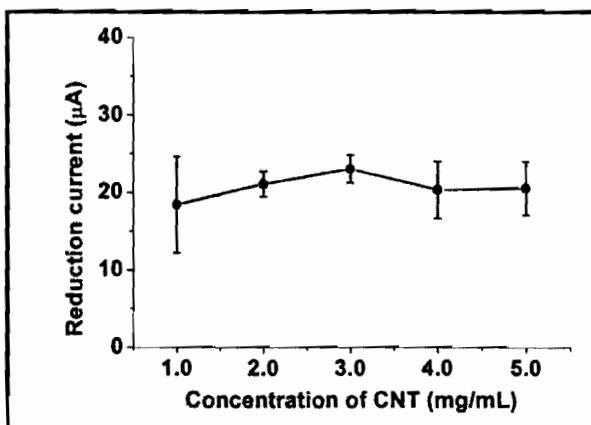
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรติกซั่นของออกซิเจน กับค่าพีอีของสารละลายอิเล็กโทรไรลิต์ 0.1 มोลาร์ ซิเทรบัพเฟอร์

พบว่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ พีอี 5.0 ให้ค่ากระแสที่สูงที่สุด แสดงว่าเอนไซม์แลคเคสทำงานได้ดีในสารละลายอิเล็กโทรไรลิต์ พีอี 5.0 สอดคล้องกับผลการทดลองของ B. Haghghi<sup>28</sup> และ M. Portaccio<sup>29</sup> ซึ่งใช้เอนไซม์แลคเคสในการพัฒนาใบโอลเซนเชอร์สำหรับวัดสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และพบว่าเอนไซม์แลคเคสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีอี 5.0

เมื่อเพิ่มพีอีของสารละลายให้สูงขึ้นค่ากระแสที่ได้ลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ S. K. Lee และคณะ<sup>30</sup> และ R. Santucci และคณะ<sup>31</sup> ซึ่งพบว่าในขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยาเรติกซั่นของออกซิเจนไปเป็นน้ำของแลคเคส การเกิดเรติกซั่นของออกซิเจนที่ตำแหน่ง T2 และ T3 ไอดรอกซิลและไชยาในดีสามารถยับยั้งการเข้าไปจับของออกซิเจนกับคอปเปอร์ที่ตำแหน่ง T2 และ T3 ของเอนไซม์แลคเคสได้ ทำให้แลคเคสสูญเสียสมบัติการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ค่ากระแสจึงลดลงเมื่อพีอีของสารละลายเพิ่มขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกพีอี 5.0 เป็นพีอีของสารละลายอิเล็กโทรไรลิต์เกือบหนุนที่เหมาะสม

### การศึกษาปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสมในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบ คาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตไซน์คอมโพสิต

ในการศึกษาหาปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบcarbon nano tube-CNT composite ที่เหมาะสม จะเตรียม ไบโอดีเซนเซอร์ GC/CNT-CS/laccase/BSA โดยใช้สารละลายนอง carbon nano tube 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลายนไคโตไซน์ความเข้มข้น 1.0% ผลของการปริมาณcarbon nano tube ต่อการตรวจวัดปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจนแสดงดังรูปที่ 4.3

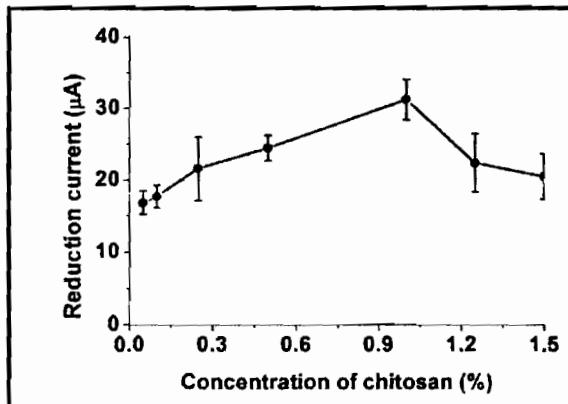


รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจนกับความเข้มข้นของ  
carbon nano tubeที่ใช้ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบcarbon nano tube-ไคโตไซน์

จากการทดลอง เมื่อปริมาณของcarbon nano tubeเพิ่มขึ้นจาก 1- 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่ากระแสที่ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการบดตีของcarbon nano tubeซึ่งเป็นสารที่มีพื้นที่ผิวสูงและมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี เมื่อมีปริมาณของcarbon nano tubeมากขึ้นจึงทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ได้มากขึ้น ค่ากระแสที่ได้จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าปริมาณของcarbon nano tubeมีมากเกินไปกลับทำให้ค่ากระแสลดลง ซึ่งเป็นผลจากการนำไฟฟ้าได้ดีของcarbon nano tube ทำให้ค่ากระแสเพิ่น (background; B) มีขนาดใหญ่ขึ้น สัญญาณ (Signal; S) จากค่ากระแสเรียดักชันของออกซิเจนมีlobด้วยค่ากระแสเพิ่น (S/B) จึงมีค่าลดลง ดังนั้นจึงเลือกปริมาณcarbon nano tube 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ค่ากระแสที่สูงที่สุดใช้ในการทดลองต่อไป

### การศึกษาปริมาณไคโตไซน์ที่เหมาะสมในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบcarbon nano tube- ไคโตไซน์คอมโพสิต

ในการศึกษาหาปริมาณของไคโตไซน์ที่เหมาะสมในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบcarbon nano tube-ไคโตไซน์ ใช้ปริมาณของไคโตไซน์เข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.25 และ 1.5 % ใน carbon nano tube 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4

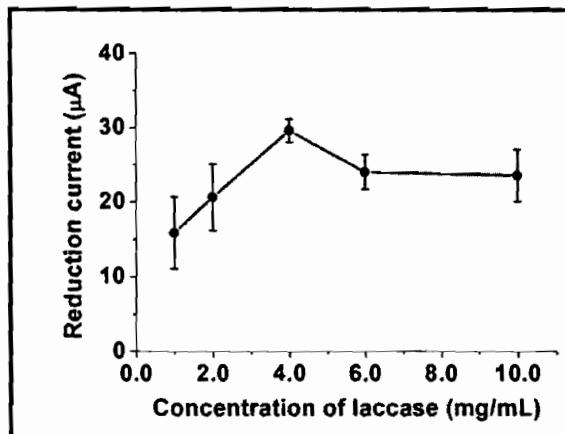


รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจน กับความเข้มข้นของไคโตไซน์ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบการบอนนาโนทิวบ์-ไคโตไซน์

พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไคโตไซน์เพิ่มมากขึ้นค่ากระแสที่ได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากสมบัติที่เข้ากันได้ดีของไคโตไซน์กับสารชีวภาพ จึงช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แลคเคส ค่ากระแสที่ได้จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นมากกว่า 1.0 % พบว่าค่ากระแสเริ่มลดลง เนื่องจากถ้ามีปริมาณไคโตไซน์มากขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มขึ้นและมีความสามารถในการนำไฟฟ้าลดลง ปริมาณไคโตไซน์ที่มากขึ้นกว่า 1.0% ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงเลือก 1.0% ไคโตไซน์ซึ่งให้ค่ากระแสที่สูงที่สุดเป็นค่าที่เหมาะสม

#### การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์แลคเคส

เมื่อได้อัตราส่วนของเมทริกซ์วัสดุเชิงประกลบการบอนนาโนทิวบ์-ไคโตไซน์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์แลคเคส ความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงรูปที่ 4.5

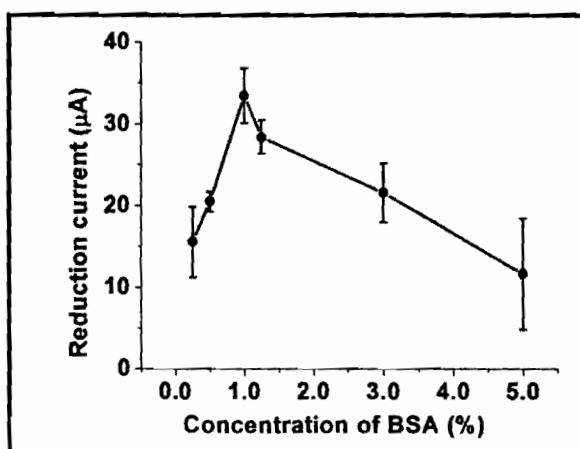


รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจน กับความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ใช้ในการเตรียมข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.5 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสจาก 1 - 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ค่ากระแสตัดขั้นของออกซิเจนที่สูงขึ้น เนื่องจากปริมาณเอนไซม์สูงขึ้นช่วยเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น จึงเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดสูงขึ้น ค่ากระแสที่ได้จะสูงขึ้น โดยปริมาณเอนไซม์ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่ากระแสที่มากที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้นมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่ากระแสได้ไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากพื้นที่ผิวในการตรวจเอนไซม์แลคเคสใน เมทริกซ์วัสดุเชิงประยุกต์มีปริมาณจำกัด ดังนั้นปริมาณที่เติมมากเกินพอกองเอนไซม์แลคเคสไม่มีผลต่อค่ากระแส หรืออาจเกิดเนื่องมาจากปริมาณเอนไซม์ที่เติมเพิ่มมากเกินพอก ส่งผลให้เกิดการต้านทานการถ่ายเทอเล็กตรอนได้ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการทดลองต่อไป

#### การศึกษาผลของปริมาณสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีน

การศึกษาปริมาณสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีน จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีน 0.25, 0.5, 1.0, 1.25, 3 และ 5% ผลของปริมาณสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีนต่อขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ต่อค่ากระแสตัดขั้นของออกซิเจน แสดงดังรูปที่ 4.6



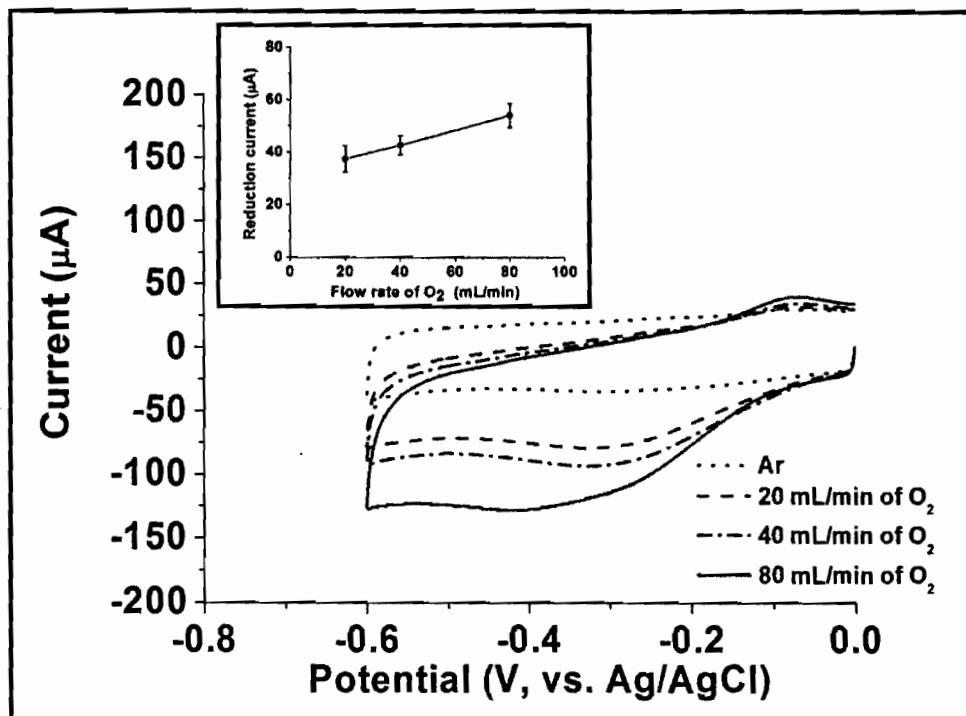
รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาตัดขั้นของออกซิเจนกับความเข้มข้นของสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีนที่ใช้ในการเตรียมไบโอดีเซอร์

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีนจาก 0.25 จนถึง 1.0% จะได้ค่ากระแสที่เพิ่มขึ้น (เพิ่มขึ้นจากเดิมถึงประมาณ 120%) โดยค่าความเข้มข้นที่ 1.0% ให้ค่ากระแสสูงที่สุด แสดงว่าสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีนมีส่วนช่วยในการทำงานของเอนไซม์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ J. Kulys และคณะ<sup>32</sup> ซึ่งใช้แลคเคสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methyl syringates และพบว่าใบวีนชีรัมอัลบูมีนสามารถป้องกันการเกิด inactivate ของเอนไซม์แลคเคส

จากการทดลองเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากกว่า 1.0% ค่ากระแสที่ได้กลับลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากปริมาณของโบวีนชีรัมอัลบูมีนที่มีมากเกินไปทำให้เกิดการขัดขวางการถ่ายเทอเล็กตรอนได้ ค่ากระแสที่ได้จึงลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1% โบวีนชีรัมอัลบูมีนในการตัดแปรข้าวไฟฟ้า

#### 4.13 การศึกษาสัญญาณการตอบสนองของข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ต่อปริมาณแก๊สออกซิเจน

จากการทดลองในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบร่วมค่าประกอบต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเตรียมข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/ BSA คือใช้สารละลายของคาร์บอนนาโนทิเบิล 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1.0% นำมาหมักบนข้าวไฟฟ้ากลาสี คาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำตرىงเรืองเอนไซม์โดยการหยดเงินไฮเม็มแลคเคลส ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และหยดสารละลายโบวีนชีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA เมื่อนำข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA มาศึกษาการตอบสนองต่อปริมาณแก๊สออกซิเจน โดยในการทดลองจะควบคุมอัตราการไหลของออกซิเจนหนึ่งระดับสารละลายที่ 20, 40 และ 80 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ รูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจนกับอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจน

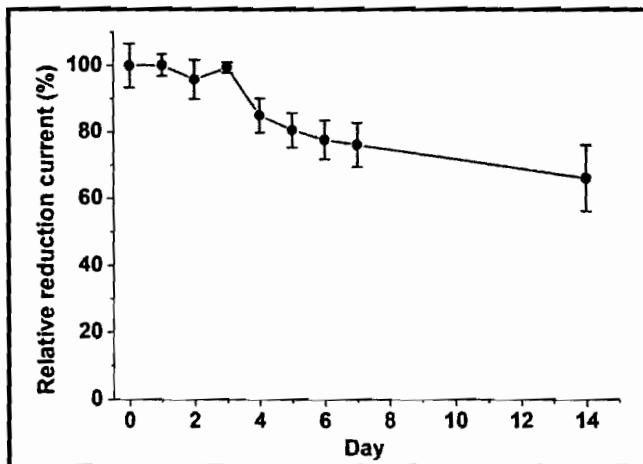
ค่ากระเพรีดักชันของออกซิเจนจะสัมพันธ์กับอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นแบบเป็นเส้นตรง ( $r^2 = 0.9996$ , ค่าความชันของสมการเส้นตรงเป็น 0.279) ที่ช่วงของอัตราการไหลที่ทำการทดลอง 20 – 80 มิลลิลิตรต่อนาที ค่ากระเพรีดักชันที่ได้จากการวัดซ้ำ ๆ มีความเที่ยง (precision) ต่ำมากคือให้ค่า %RSD เท่ากับ 3.89 ( $n=5$ )

ผลการทดลองจากเทคนิคเทคนิคไซคลิกโวแท็มเมทรี แสดงให้เห็นว่า ข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่พัฒนาขึ้นตอบสนองต่อปริมาณออกซิเจน สามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจน และอาจจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดในการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนในระบบที่มีการไหลด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรมเมทรี เพื่อพัฒนาให้เป็นระบบวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สะดวก รวดเร็ว และใช้สารปริมาณน้อย ต่อไป

#### 4.14 ศึกษาความเสถียรของใบโอลเซนเชอร์

ศึกษาความเสถียรของข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA โดยการเตรียมข้าไฟฟ้า 3 ข้า และนำมาวัดค่ากระเพรีดักชันจากปฏิกริยาเรดักชันของออกซิเจน หลังจากเตรียมข้าไฟฟ้าไว้เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, และ 14 วัน

จากรูปที่ 4.8 พบร้าข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA มีความเสถียร โดยค่ากระเพรีดักชันของออกซิเจนที่ได้จากการวัดเมื่อเตรียมได้ใหม่ ๆ หลังจากเตรียมใบโอลเซนเชอร์ไว้ 1, 2 และ 3 วัน มีค่าที่ค่อนข้างคงที่และใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้น (~100%) และเริ่มลดลงเมื่อวัดในวันที่ 4 โดยวัดค่ากระเพรีดักชันที่ได้ประมาณ 85% และเมื่อทิ้งไว้ 7 วันค่ากระเพรีดักชันเหลือประมาณ 76% และลดลงเหลือประมาณ 70% เมื่อทิ้งไว้ 14 วัน



รูปที่ 4.8 ความเสถียรของข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในการเก็บรักษา (เก็บที่อุณหภูมิ 4°C)

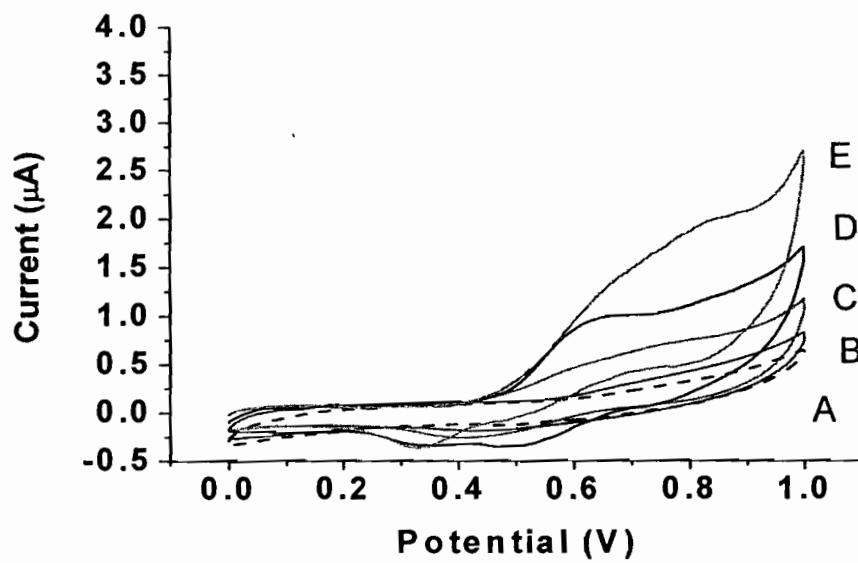
เมื่อเปรียบเทียบกับความเสถียรของข้าไฟฟ้า จากร้านวิจัยของ H. L. Pang<sup>33</sup> ชีวศึกษา ข้าไฟฟ้า 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 กลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์และเอนไซม์ แลคเคส (GC/CNT/laccase) และข้าไฟฟ้าชนิดที่ 2 ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยสารละลาย คาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีหมู่พังก์ชันเป็น 1-aminopyrene (CNT-AP) และนำมาตรีง่อนไชม์แลคเคสโดยใช้ก ลูตราลัตเติร์ดเป็นตัวช่วย (GC/CNT-AP/laccase) ซึ่งพบว่าเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน ค่ากระແสที่ได้จากการ วัดข้าไฟฟ้าชนิดที่ 1 จะลดลงเหลือประมาณ 69.3% และในข้าไฟฟ้าชนิดที่ 2 เหลือประมาณ 85.3 % ข้าไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ซึ่งตรงเงอนไขมในเมทริกของคาร์บอนนาโนทิวบ์ - โคโตชาณที่มีบอเวิน ชีรัมอัลบูมีนจึงมีความเสถียรกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงเงอนไขมในคาร์บอนนาโนทิวบ์ (ข้าไฟฟ้าชนิด ที่ 1 , GC/CNT/laccase) และมีความเสถียรน้อยกว่าข้าไฟฟ้าชนิดที่ 2 (GC/CNT-AP/laccase) เล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบวิธีการในการเตรียมข้าไฟฟ้าซึ่งในข้าไฟฟ้าชนิดที่ 2 ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมคาร์บอน นาโนทิวบ์ให้มีหมู่พังก์ชันเป็น 1-aminopyrene (CNT-AP) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน ข้าไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสะดวก และง่ายในการเตรียมมากกว่า ข้าไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมี ความเสถียรดีสามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจน และอาจจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นใบโอดิโทดในเซลล์ เชื้อเพลิงชีวภาพได้

## 4.2 การพัฒนาข้าไฟฟ้าไปโอดิโนดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

### 4.2.1 การพัฒนาข้าไฟฟ้าไปโอดิโนดโดยใช้โพลิเมอร์ชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) ในการตรึงเงอนไขมกลูโคสออกซิเดส

#### 4.2.1.1 ศึกษาทางค ประกอบที่เหมาะสมของไปโอดิโนด

งานวิจัยในส่วนนี้ใช้โพลิเมอร์นำไฟฟ้าชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) หรือ PFcANI, โคโตชาณ และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมาใช้ในการโมดิฟายด์ข้าไฟฟ้านิดกลาสซีคาร์บอน เพื่อพัฒนาใช้ในการตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลกลูโคส โดยในการศึกษาทางค ประกอบที่เหมาะสมจะ ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่ข้าไฟฟ้าทั้ง 5 ชนิด (A-E) คือ A: ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC), B : ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยโพลิเมอร์ PFcANI (GC/PFcANI), ข้าไฟฟ้า C : ข้าไฟฟ้า กลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยโพลิเมอร์ PFcANI และกลูโคสออกซิเดส (GC/PFcANI/GOx), D : ข้าไฟฟ้า กลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยโคโตชาณ, โพลิเมอร์ PFcANI และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GC/CS/PFcANI/GOx) และข้าไฟฟ้า E : ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยโคโตชาณ, โพลิเมอร์ PFcANI, อนุภาคทองนาโน (AuNPs) และกลูโคสออกซิเดส (GC/CS/PFcANI/AuNPs/GOx) โดย ทำการศึกษาในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (ทดลองภายใต้บรรยากาศกํากือกอน) ผลการศึกษาทาง ค ประกอบที่เหมาะสมของไปโอดิโนดเซอร์ แสดงได้ดังรูปที่ 4.9

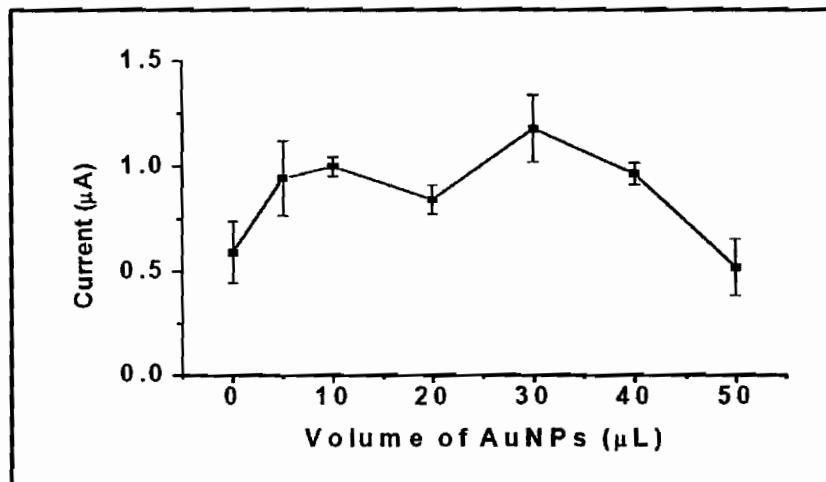


รูปที่ 4.9 ไซคลิกโวลต์แอมโนแกรมของสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 mM ที่ข้าไฟฟ้า (A) glasic carboron ; GC (เส้นประ) และข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงวัสดุนาโนเชิงประกอบต่าง ๆ (B) GC/PFcANi, (C) GC/PFcANi/GOx, (D) GC/CS/PFcANi/GOx และ (E) GC/CS/PFcANi/AuNPs/GOx

พบว่าที่ข้าไฟฟ้านิด A (GC) และข้าไฟฟ้านิด B (GC/PFcANi) กลูโคสเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักยไฟฟ้าสูง และไม่เห็นสัญญาณค่ากระแสอาโนดิกในช่วงที่สแกน ส่วนข้าไฟฟ้านิด C (GC/PFcANi/GOx) กลูโคสเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ค่าศักยไฟฟ้า +0.65 V และให้ค่ากระแสอาโนดิกเป็น 0.50  $\mu\text{A}$  แสดงให้เห็นว่าโพลิเมอร์ PFcANi และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสช่วยเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของกลูโคส ทำให้ปฏิกิริยาเกิดที่ศักยไฟฟ้าต่ำลง ส่วนข้าไฟฟ้านิด D (GC/CS/PFcANi/GOx) ออกซิเดชันของกลูโคสเกิดที่ค่าศักยไฟฟ้า +0.61 V และให้ค่ากระแสอาโนดิกเป็น 0.90  $\mu\text{A}$  แสดงให้เห็นว่าการโมดิฟายด์ข้าไฟฟ้า โดยเพิ่มไคโตซานจากเดิมที่มีเฉพาะโพลิเมอร์ PFcANi และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสช่วยให้ข้าไฟฟ้ามีสภาพไวขึ้น ส่วนข้าไฟฟ้านิด E (GC/CS/PFcANi/AuNPs/GOx) ให้ค่ากระแสอาโนดิกที่สูงที่สุดคือ 1.20  $\mu\text{A}$  ที่ศักยไฟฟ้า +0.60 V แสดงให้เห็นว่า AuNPs เป็นตัวช่วยทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสเกิดได้ดีขึ้นทำให้ค่ากระแสอาโนดิกสูงขึ้น ตั้งนั้นข้าไฟฟ้า E (GC/CS/PFcANi/AuNPs/GOx) จึงเป็นข้าไฟฟ้าที่มีสภาพไวในการตรวจวัดที่สูงที่สุด เหมาะกับการพัฒนาเป็นกลูโคสไปโอเจนเซอร์ดังนั้นจึงเลือกข้าไฟฟ้านิด E เป็นองค์ประกอบที่เหมาะสมของไปโอเจนต์

#### 4.2.1.2 ศึกษาผลของปริมาณอนุภาคทองนาโน (AuNPs) ในการโมดิฟายด์ชี้ไฟฟ้า

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษาหาปริมาณ AuNPs ที่เหมาะสมในการโมดิฟายด์ชี้ไฟฟ้า ชนิด GC/PFcANi/AuNPs/CS/GOx ผลการทดลองในการศึกษาหาปริมาณ AuNPs ที่เหมาะสมในการโมดิฟายด์ชี้ไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน แสดงดังรูปที่ 4.10

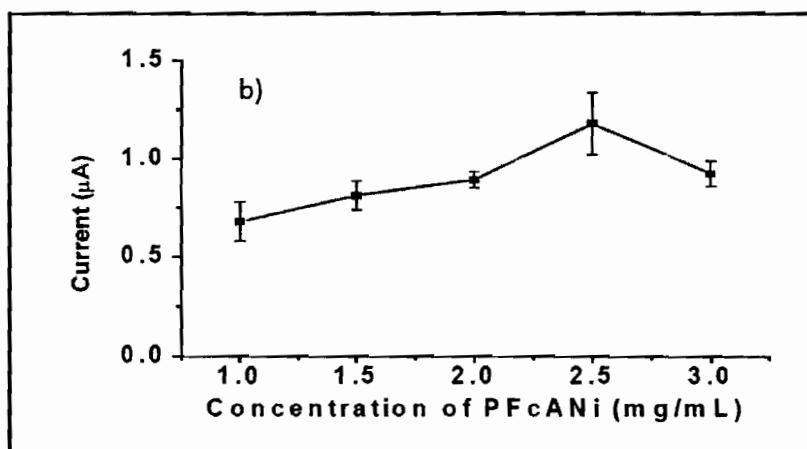


รูปที่ 4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าเฉลี่ย (สัญญาณจาก 3 ชี้ไฟฟ้า) ของกลูโคส ความเข้มข้น 10 mM กับปริมาตรของ AuNPs ที่ในการโมดิฟายด์ชี้ไฟฟ้า GC/PFcANi/AuNPs/CS/GOx

จากรูป 4.10 พบว่าเมื่อปริมาณของ AuNPs เพิ่มสูงขึ้น จาก 0 -30  $\mu\text{L}$  ค่ากระแสที่ได้มีแนวโน้มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจาก AuNPs มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าและเร่งปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสเกิดได้ดีขึ้นค่ากระแสที่ได้จึงเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเพิ่มปริมาณ AuNPs มากขึ้นกว่า 30  $\mu\text{L}$  สัญญาณของกลูโคสมีแนวโน้มลดลง อาจเนื่องจากพื้นที่ผิวน้ำของชี้ไฟฟ้าสามารถบรรจุ AuNPs ได้จำกัด เมื่อเพิ่มปริมาณ AuNPs ให้มีปริมาณมากขึ้นกิน 30  $\mu\text{L}$  ค่ากระแสที่ได้จึงมีค่าลดลง ผลการศึกษาพบว่าปริมาตรของ AuNPs ที่ใช้ในการโมดิฟายด์ชี้ไฟฟ้า 30  $\mu\text{L}$  เป็นค่าที่เหมาะสม

#### 4.2.1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย polyaniline (co-*m*-ferrocenylaniline) ในการโมดิฟายด์ชี้ไฟฟ้า

การทดลองนี้จะศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโพลี PFcANi ที่ในการโมดิฟายด์ชี้ไฟฟ้า GC/PFcANi/AuNPs/CS/GOx โดยจะวัดสัญญาณของกลูโคส โดยใช้ชี้ไฟฟ้าโมดิฟายด์ด้วยสารละลายโพลิเมอร์ PFcANi (ใน THF) ความเข้มข้นต่าง ๆ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 mg/mL ปริมาตร 40  $\mu\text{L}$  ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11

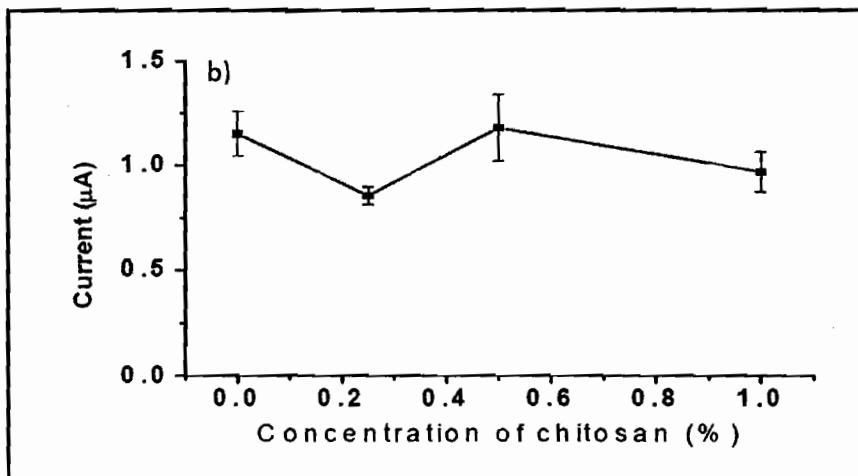


รูปที่ 4.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าเฉลี่ย (สัญญาณจาก 3 ขั้วไฟฟ้า) ของกลูโคส ความเข้มข้น 10 mM กับความเข้มข้นของโพลิเมอร์ PFcANi ในการโมดิฟายต์ขั้วไฟฟ้า GC/PFcANi/AuNPs/CS/GOx

ผลการทดลองในรูปที่ 4.11 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพลิเมอร์ PFcANi จาก 1.0 ถึง 2.5 mg/mL ค่ากระแสออกนิดก็ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น และให้ค่ากระแสสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 2.5 mg/mL ทั้งนี้อาจเนื่องจากโพลิเมอร์ PFcANi มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าที่ดี มีความสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าได้ดี และในโพลิเมอร์ยังมีเฟอร์โรเชนิลผสมอยู่ ซึ่ง เฟอร์โรเชนเป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน ช่วยให้กลูโคส สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ ได้ดีขึ้น ผลจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของโพลิเมอร์ PFcANi ที่เหมาะสม คือ 2.5 mg/mL

#### 4.2.1.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้ในการโมดิฟายต์ขั้วไฟฟ้า

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานไคโตซาน หรือ CS ที่ในการโมดิฟายต์ขั้วไฟฟ้า GC/PFcANi/AuNPs/CS/GOx ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12



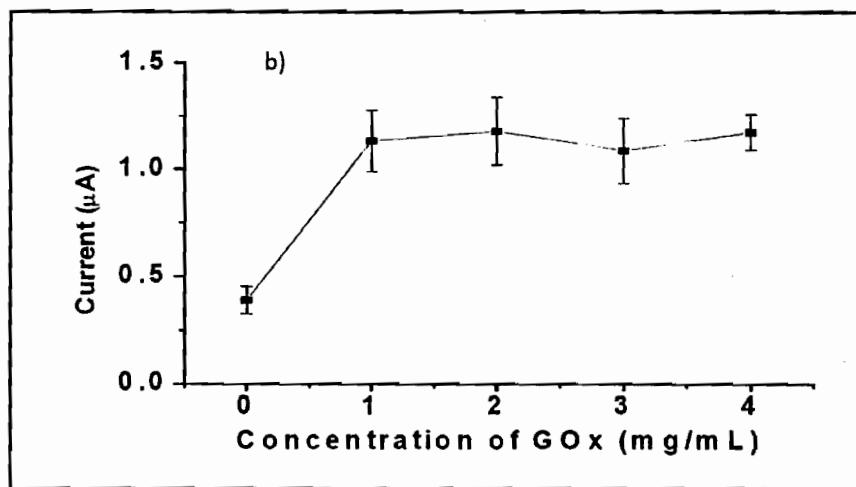
รูปที่ 4.12 グラฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าเฉลี่ย (สัญญาณจาก 3 ขั้วไฟฟ้า) ของกลูโคสความเข้มข้น 10 mM กับความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน ในการโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้า GC/PFcANI/AuNPs/CS/GOx

ผลการทดลองในรูปที่ 4.12 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน 0.5% จะให้ค่ากระแสที่มากที่สุด คือ  $1.18 \mu\text{A}$  โดยปกติหากความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานมากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการตรวจจับสูงขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติที่เข้ากันได้ดีของไคโตซานกับสารเชื้อภาพ ช่วยให้ออนไซเมิร์กสามารถคงตัวมากขึ้นและส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส แต่เมื่อความเข้มข้นสูงมากเกินไป ค่ากระแสลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากถ้ามีปริมาณไคโตซานมากขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มขึ้นและมีความสามารถในการนำไฟฟ้าลดลง ความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมในการโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้าคือ 0.5 %

#### 4.2.1.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซเมิร์กกลูโคสออกซิเดส (GOx)

ในการทดลองนี้จะศึกษาผลของความเข้มข้นเอนไซเมิร์กกลูโคสออกซิเดส (GOx) ที่ใช้ในการโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้า GC/PFcANI/AuNPs/CS/GOx ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.13

ผลจากการทดลองจากรูปที่ 4.12 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอนไซเมิร์กกลูโคสออกซิเดสจาก 1 เป็น  $2 \text{ mg/mL}$  จะได้ค่ากระแสที่เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากพื้นที่ผิวน้ำของขั้วไฟฟ้าสามารถจุเอนไซเมิร์กกลูโคสออกซิเดสได้เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซเมิร์กกลูโคสออกซิเดสมากขึ้น ( $2-4 \text{ mg/mL}$ ) พบว่าค่ากระแสที่ได้เริ่มคงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการจุน้ำของขั้วไฟฟ้าสามารถจุเอนไซเมิร์กกลูโคสออกซิเดสได้ในปริมาณจำกัด การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซเมิร์กกลูโคสออกซิเดสในสารละลายที่ใช้ในการโมดิฟายด์จึงไม่มีผลต่อค่ากระแส ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซเมิร์กกลูโคสออกซิเดสที่เหมาะสมคือ  $2 \text{ mg/mL}$

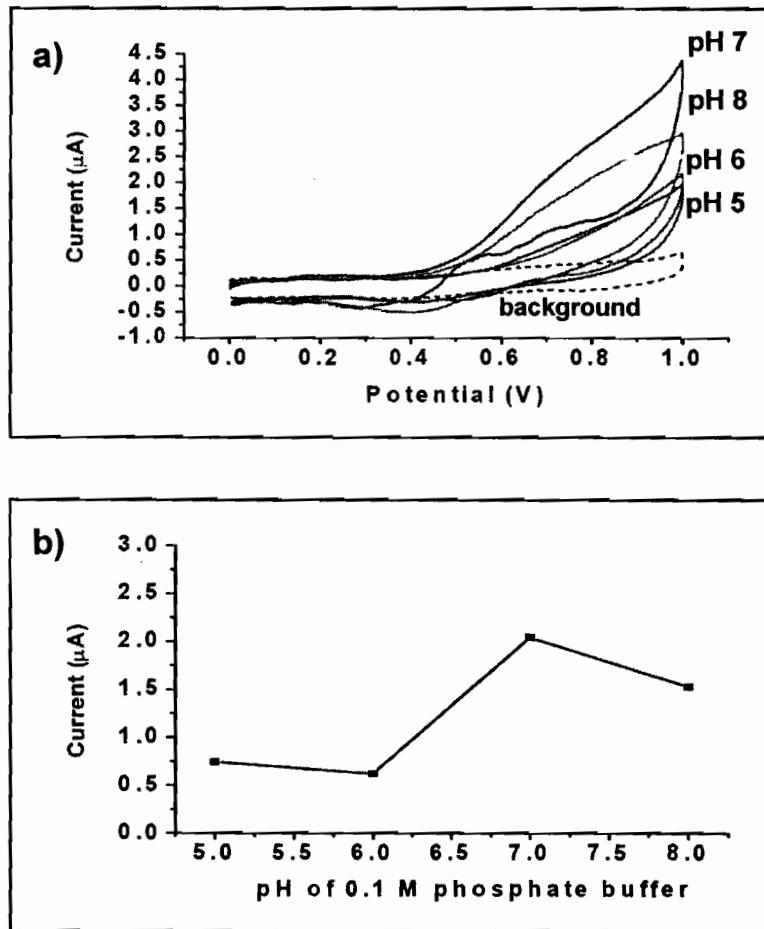


รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าเฉลี่ย (สัญญาณจาก 3 ขั้วไฟฟ้า) ของกลูโคสความเข้มข้น 10 mM กับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในการโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้า GC/PFcANi/AuNPs/CS/GOx

#### 4.2.1.6 ศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกื้อหนุน (supporting electrolyte)

ผลจากการศึกษา pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกื้อหนุน แสดงดังรูปที่ 4.12

จากรูปที่ 4.14 a) พบว่าในการปฏิกริยาออกซิเดชันของกลูโคสจะเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำลง เมื่อ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกื้อหนุนเพิ่มขึ้น แสดงว่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เกื้อหนุนมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ จากรูปที่ 4.14 b) พบว่าสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกื้อหนุน pH 7.0 จะให้ค่ากระแสสูงที่สุด แสดงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่นำมาใช้ในการพัฒนาเป็นกลูโคสไบโอนด์นี้ สามารถทำงานได้ดีในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.0

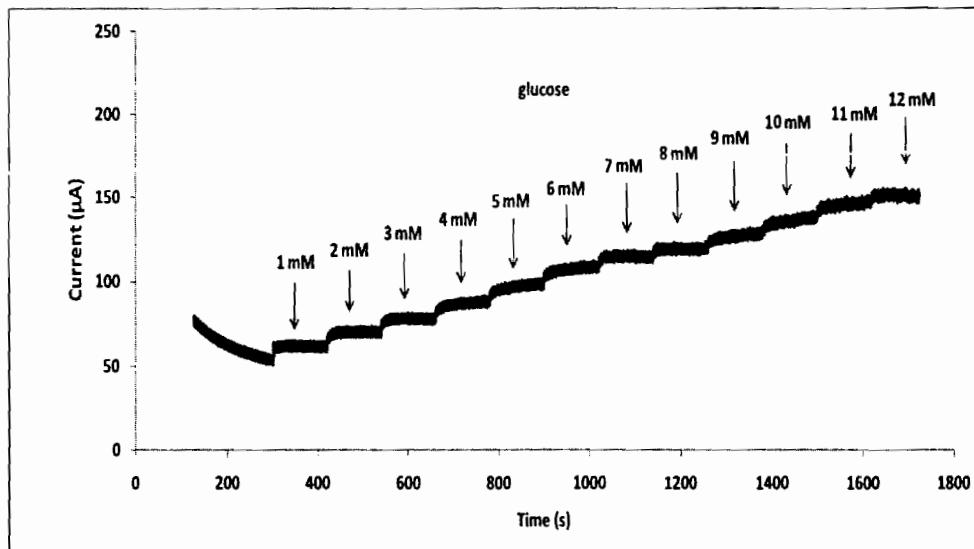


รูปที่ 4.14 การศึกษาผลของ pH ของสารละลายนิเล็กโอลิตเกือหบุนต่อการตรวจวัดกลูโคส a) ไซคลิก โวลต์แอมมิเมทร์ของสารละลายนิเล็กโอลิต ความเข้มข้น 10 mM ในสารละลายนิเล็กโอลิตเกือหบุนเป็นฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 5, 6, 7, 8 b) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสอาโนไดค์ pH ต่างๆของสารละลายนิเล็กโอลิตเกือหบุนในการโมดิฟายด์ชิ้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน

#### 4.2.1.7 การศึกษาคุณลักษณะของกลูโคสไบโอดีเซนเซอร์

##### ความเสถียรของกลูโคสไบโอดีเซนเซอร์

ในการศึกษาความเสถียรของกลูโคสไบโอดีเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจะใช้เทคนิคแอมเพอร์มิเตอร์โดยใช้กลูโคสไบโอดีเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (GC/CS/PFcCAni/AuNPs/GOx) เป็นชิ้วไฟฟ้าใช้งาน ให้สักกิ้งไฟฟ้าแก่ชิ้วไฟฟ้าใช้งานที่ +0.7 V ในการทดสอบความเสถียรของกลูโคสไบโอดีเซนเซอร์ทำการทดลองโดยเติมสารละลายนิตรฐานกลูโคสความเข้มข้นที่ละ 1 mM (12 ครั้ง) ลงในสารละลายนิฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แอมเพอร์โกร姆ของกลูโคสไบโอดีเซนเซอร์ในการศึกษาความเสถียรของกลูโคสไบโอดีเซนเซอร์

จากรูปที่ 4.15 พบร่วมกับความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นค่ากระแสที่ได้จะสูงขึ้นโดยเมื่อเติมกลูโคสความเข้มข้น 1 mM กลูโคสไบโอดีเซนเซอร์สามารถตรวจจับกระแสที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ขณะที่เวลาผ่านไปค่ากระแสที่ตรวจวัดได้จะคงที่ และการตอบสนองค่ากระแสที่ได้มีอัตราเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าใกล้เคียงกัน

#### ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (limit of detection; LOD)

ในการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพอร์โรมetri ทำการทดลองโดยเติมสารละลายน้ำตาลในน้ำตาล 1 mM (5 ครั้ง) ลงในสารละลายน้ำตาล ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.0 นำค่ากระแสที่ได้จากการวัดจำนวน 5 ครั้ง คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ใน การวัดสารละลายน้ำตาลกลูโคสโดยคำนวณจาก นำ 3 S.D. มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่เป็นขีดจำกัดต่ำสุด ในการตรวจวัด ซึ่งคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.125 mM มีค่า RSD เท่ากับ 4.34 % แสดงว่า กลูโคสไบโอดีเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสได้ที่ความเข้มข้นต่ำถึงระดับ mM และมีความเที่ยงสูง

#### ศึกษาผลของตัวรับกวน

ในการศึกษาผลของตัวรับกวนที่มีผลต่อการตรวจวัดปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิค แอมเพอร์โรมetri โดยใช้ไบโอดีเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยสารละลายน้ำตาลของตัวรับกวนที่ทำการศึกษา ได้แก่ sucrose, fructose, ascorbic acid และ dopamine จะวัดสัญญาณของกลูโคส และสัญญาณของกลูโคสที่มีตัวรับกวน ความเข้มข้นค่าต่างๆ นำสัญญาณของค่ากระแสที่ได้จากการทดลองในสารละลายน้ำตาลที่มีสารละลายน้ำตาลของตัวรับกวนมาเปรียบเทียบกับสัญญาณของค่ากระแสที่ได้จากการทดลองในสารละลายน้ำตาลที่ไม่มีตัวรับกวน ซึ่งถ้า

สัญญาณของค่ากระแสแตกต่างกันเกิน  $\pm 5\%$  ถือว่าสารละลายน้ำตาลของตัวรับกวนมีการระบบควบคุมที่ดี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาผลของตัวรับกวน

ตัวรับกวน (interferences)	ช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (concentration range ; mM)	Tolerance limit (mM)
Sucrose	0.1-11.1	1.1
Fructose	0.1-10	11.1*
Dopamine	0.1-0.2	0.1
Ascorbic acid	0.05-0.15	0.05

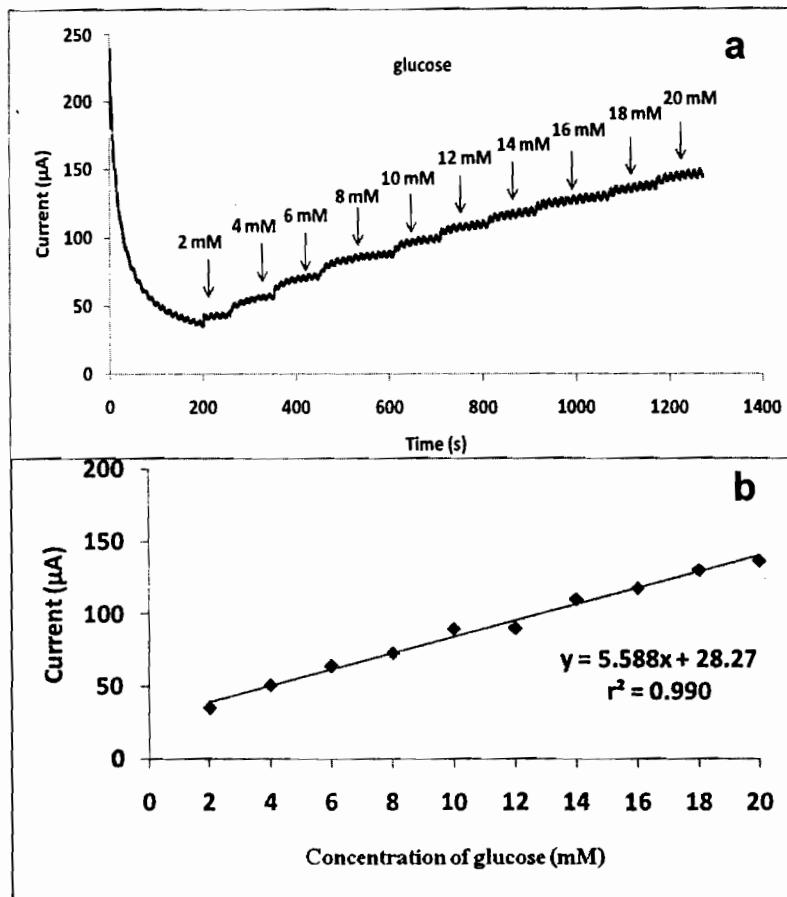
\* แทนสัญญาณเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า  $\pm 5\%$

จากตารางที่ 4.1 พบว่าสารละลายน้ำตาลของตัวรับกวน sucrose และ fructose มีการระบบควบคุม tolerance limit ของ sucrose และ fructose คือ 1.1, 10 mM ส่วน ตัวรับกวน dopamine และ ascorbic acid มีการระบบการตรวจจับกลูโคส tolerance limit ของ dopamine และ ascorbic ซึ่งมีค่าเพียง 0.1, 0.05 mM ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทั้งสองชนิดนี้เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ศักยภาพฟ้าที่ใกล้เคียงกับกลูโคส ซึ่งอาจมีผลต่อสัญญาณของค่ากระแสที่ตรวจวัดได้

#### การศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรง (linearity range)

ในการศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของสารละลายน้ำตาลกลูโคส โดยการศึกษาสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ช่วงความเข้มข้น 2 – 20 mM ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.16

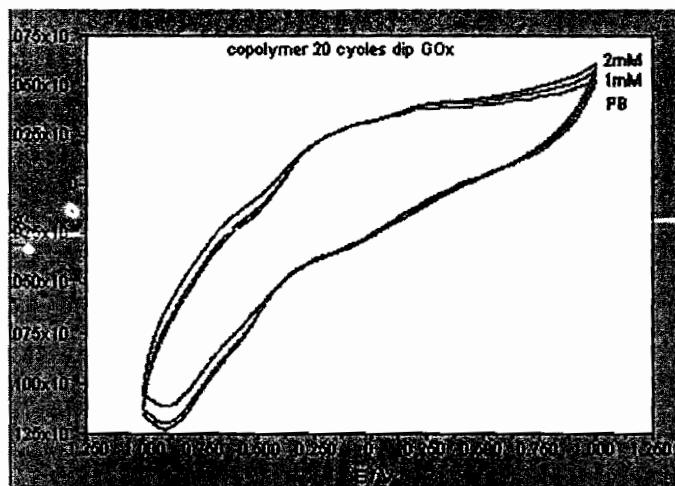
จากรูปที่ 4.16 พบว่าค่ากระแสที่ศักยภาพฟ้า + 0.7 V เพิ่มขึ้นแบบเป็นเส้นตรงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เมื่อพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 ถึง 20 mM กับค่ากระแสจะได้กราฟเส้นตรง แสดงดังรูป 4.14 b) ได้สมการเส้นตรงเป็น  $y = 5.5588x + 28.27$  มีค่า  $r^2 = 0.990$  ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ 1 ซึ่งถือว่ายอมรับได้ นั่นคือ ค่ากระแสแปรผันตรงกับความเข้มข้นของกลูโคส มีช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของสารละลายน้ำตาลกลูโคส คือ 2 ถึง 20 mM



รูปที่ 4.16 ผลการศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรง a) แอมเพอร์โกราฟของกลูโคสในการศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของกลูโคสไปออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2-20 mM b) กราฟแสดงช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรง

#### 4.2.1.8 การสังเคราะห์ poly(aniline-co-m-ferroceneylaniline) ด้วยวิธีการทางไฟฟ้า

คณะกรรมการศึกษาและพัฒนาข้าวไฟฟ้าโดยใช้โพลิเมอร์ในกลุ่มโพลิอนิลินที่มีหมู่เฟอโรซีนเป็นหมู่แทนที่บันวงเบนซินด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางไฟฟ้า เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำมาช่วยตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยนำข้าวไฟฟ้า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni) ที่เตรียมได้ไปจุ่มในสารละลายกลูโคสออกซิเดส (30 mg/mL) เป็นเวลา 1 คืน จะได้ข้าวไฟฟ้า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni\_Gox) ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าข้าวไฟฟ้า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni\_Gox) ที่เตรียมขึ้นไม่ตอบสนองต่อการใช้งานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ในสารละลายบัฟเฟอร์ของฟอสเฟต ที่ pH 7.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.17



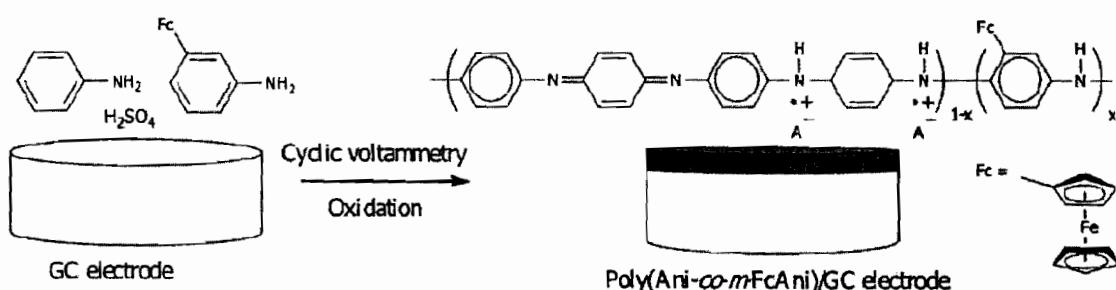
รูปที่ 4.17 ไซค์ลิกโวลแฒมไม้แกรมของข้าวไฟฟ้า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni)\_GOx ในสารละลายน้ำฟเฟอร์ของฟอสเฟต ที่ pH 7.0 ความเข้มข้นของ glucose ต่างๆ เป็น 0, 1 และ 2 mM ตามลำดับ

โพลิอนิลินที่มีหมู่เฟอร์ชีนเป็นหมู่แทนที่บันวงเบนซินซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางไฟฟ้า ไม่สามารถช่วยในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสร้างของโพลิอนิลินบนขั้วกลาสซี คาร์บอน ไม่มีความเป็นรูปพรุน ดังนั้น เมื่อนำ GC\_poly(Ani-co-m-FcAni) ไปตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยการเชื้อไฟฟ้าในสารละลายน้ำฟเฟอร์ของฟอสเฟต ทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ไม่สามารถแพร่เข้าไปแทรกตัวระหว่างชั้นฟิล์มของโพลิอนิลินบนขั้วกลาสซี คาร์บอน จึงส่งผลให้ข้าวไฟฟ้านี้ไม่ตอบสนองต่อการวิเคราะห์กลูโคส

อย่างไรก็ตามข้าวไฟฟ้าดังกล่าวสามารถตอบสนองต่อ กรดแอสคอร์บิค หรือวิตามินซีได้เป็นอย่างดี การทดลองต่อไปจึงเป็นการพัฒนาข้าวไฟฟ้า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni) เพื่อเป็นข้าวไฟฟ้าในการวัดกรดแอสคอร์บิค

#### การประยุกต์ใช้โพลิเมอร์ชนิด PFcANi ในการวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิค

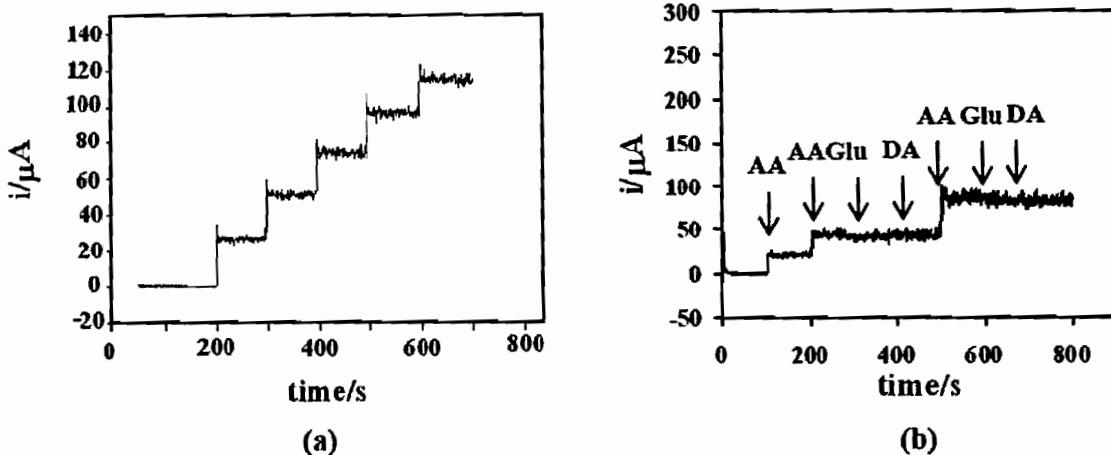
กลไกในการสังเคราะห์ poly(Ani-co-m-FcAni) ที่ข้าวไฟฟ้ากลาสซี คาร์บอนแสดงได้ดังรูปที่ 4.18



where  $x$  ( $0 \leq x \leq 1$ ) relates to the substitution stoichiometry of  $m$ -FcAni unit in poly(Ani-co- $m$ -FcAni), a ferrocenyl group is labeled as -Fc and  $A^-$  is referred to  $HSO_4^-$  as a dopant to poly(Ani-co- $m$ -FcAni) backbone.

รูปที่ 4.18 กลไกในการสังเคราะห์ poly(Ani-co-m-FcAni) ที่ข้าวไฟฟ้ากลาสซี คาร์บอน

ข้าไฟฟ้า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni) ที่พัฒนาขึ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นข้าไฟฟ้าในการวัดกรดแอกซ์โคร์บิคได้ เนื่องจากข้าไฟฟ้านี้ตอบสนองต่อกรดแอกซ์โคร์บิค โดยค่ากระแสที่วัดได้ที่ศักยไฟฟ้า +0.25 V เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกรดแอกซ์โคร์บิค ดังรูปที่ 4.19 (a) ข้าไฟฟ้า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni) ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อกรดแอกซ์โคร์บิค เนื่องจากสารรบกวนต่างๆ เช่น โคลามีน และกลูโคส จะไม่ให้สัญญาณที่ข้าไฟฟ้านี้ ดังรูปที่ 4.19 (b)

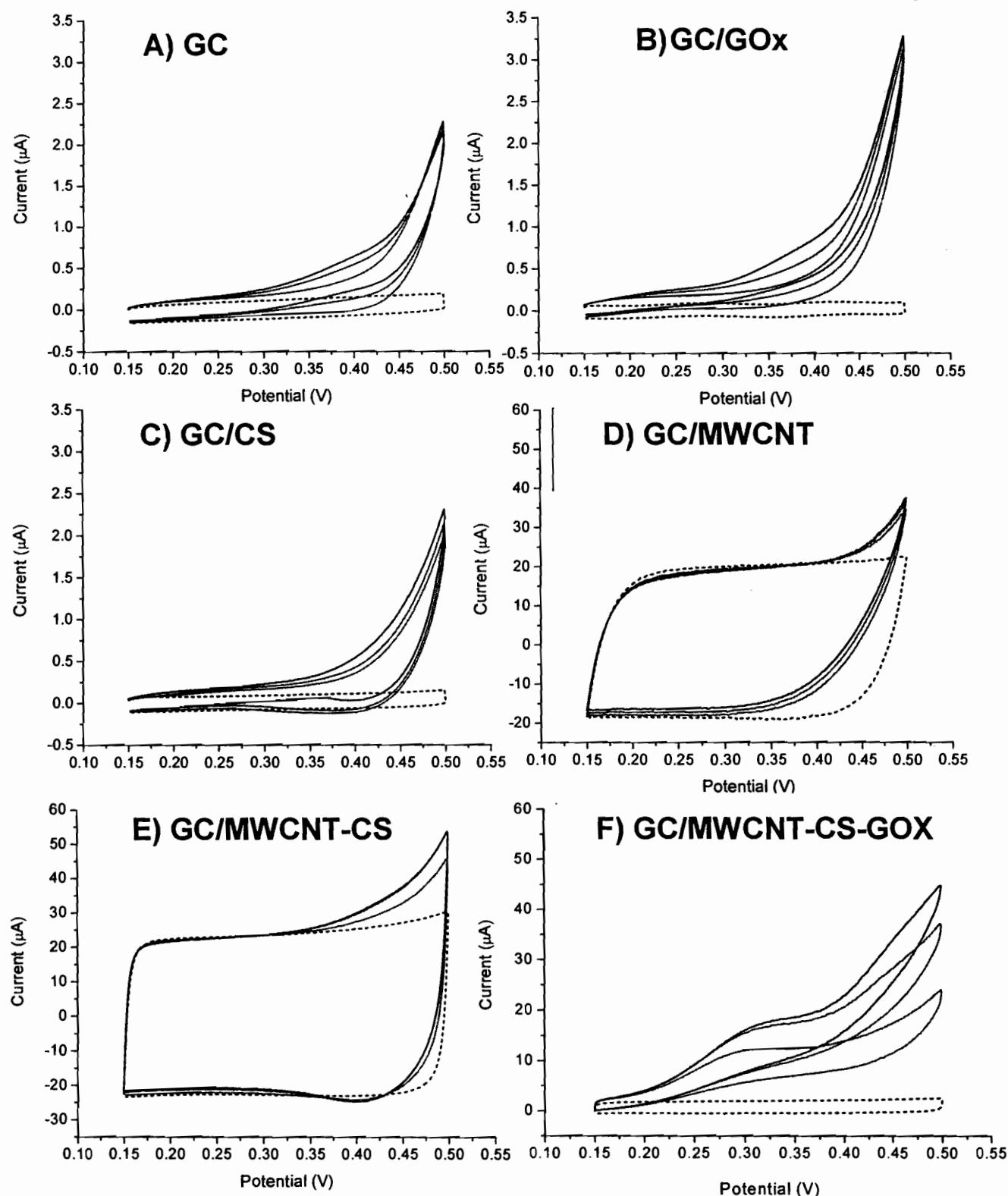


รูปที่ 4.19 แผนเพอร์โรมแกรมที่ได้จากการวัดข้าไฟฟ้า GC\_poly(Ani-co-m-FcAni) ที่วัดที่ศักยไฟฟ้า +0.25 V (a) เมื่อมีการเติมแอกซ์โคร์บิคแอดิชิต (AA) ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นครั้งละ 0.1 mM จำนวน 5 ครั้ง ลงในสารละลายน้ำ 0.1 M ซิเทรตบัฟเฟอร์ (pH 5.0) และ (b) สัญญาณของแอกซ์โคร์บิคแอดิชิต ความเข้มข้น 0.1 mM และ 0.2 mM เมื่อมีการเติม โคลามีน (DA) และกลูโคส (Glu) ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นครั้งละ 1.0 mM

#### 4.2.2 การพัฒนาข้าไฟฟ้าในโอลอโนดโดยใช้ nano-composite ของคาร์บอนนาโนทิวบ์ และไคโตชาณในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

##### 4.2.2.1 การศึกษาทางค์ประกอบที่เหมาะสมของใบโอลอโนด

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนผิวน้ำของข้าไฟฟ้านิดกลาสซีคาร์บอน โดยใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ ซึ่งเป็นสารที่มีพื้นที่ผิวสูงและสามารถจุลสารต่างๆ ในห้องคาร์บอนนาโนทิวบ์ได้ เป็นตัวช่วยให้สามารถตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ใช้สารละลายน้ำไคโตชาณในการช่วยให้เอนไซม์มีความคงตัวสูงขึ้น ในการพัฒนาข้าไฟฟ้าในโอลอโนดโดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในการตรวจวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส ผลการศึกษาทางค์ประกอบที่เหมาะสมของข้าไฟฟ้าในโอลอโนดแสดงดังรูปที่ 4.20



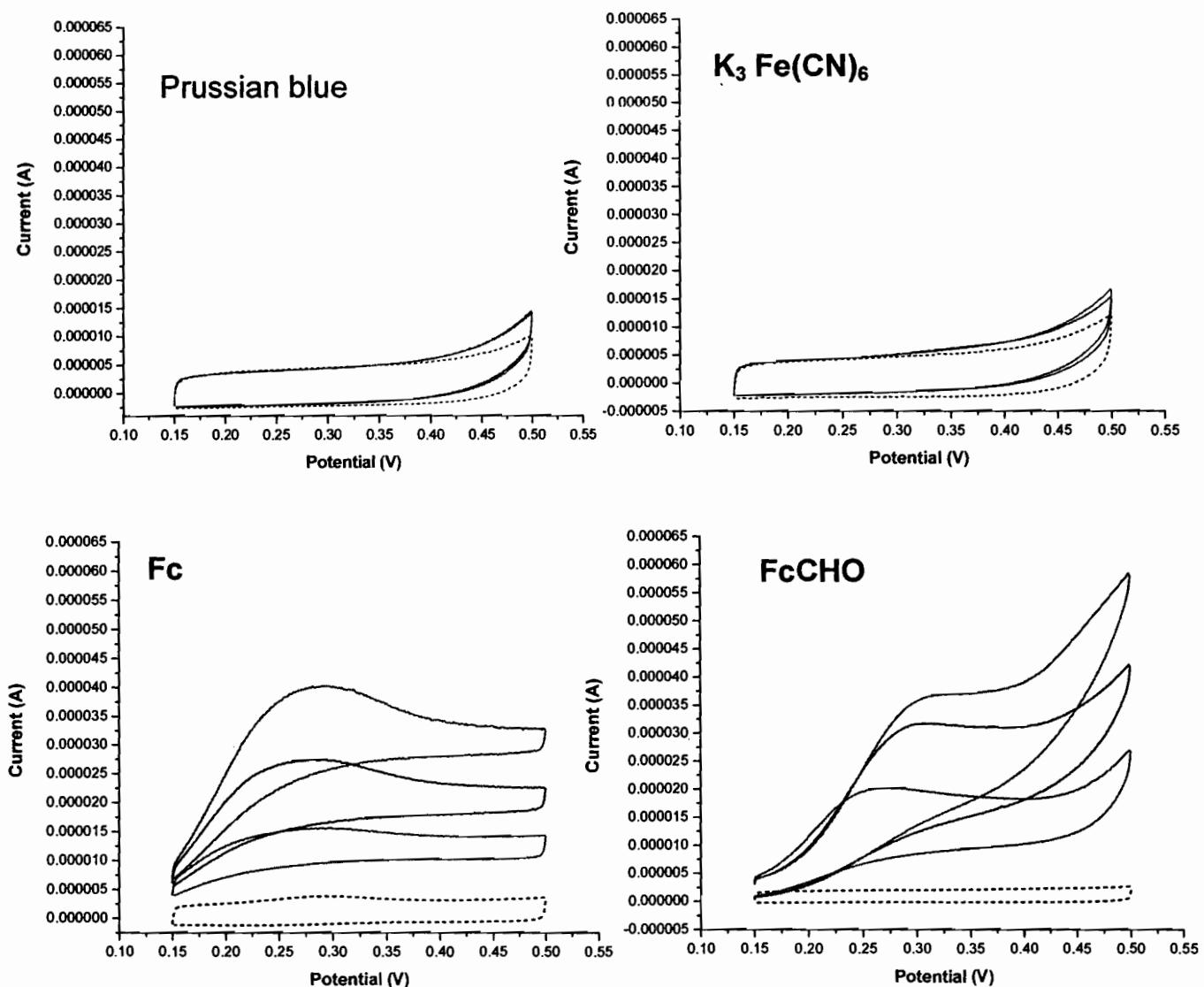
รูปที่ 4.20 ไฟคัลิกโลแทนโนแกรมของกลูโคสความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM ที่ข้าไฟฟ้ากลาสซี คาร์บอน (A) และข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ถูกโมดิฟายด์ทั้ง 5 ชนิด (B-F) ทำการทดลองในสารทดลองในสารละลายนอกสเปตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี FcCHO ความเข้มข้น 0.5 mM เป็นเมติเอเตอร์

เมื่อพิจารณาใช้คลิกโวล์แหม่มограмของกลูโคสในรูปที่ 4.20 ที่ข้าไฟฟ้าห้อง 6 ชนิด (A-F) ได้แก่ A ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC), B ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยกลูโคสออกซิเดส (GC/GOx), C ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลายไคโตชาณ (GC/CS), D ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/MWCNT), E ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์/ไคโตชาณ (GC/MWCNT-CS) และ F ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดิฟายด์ด้วยสารละลายผสมของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณและเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส(GC/MWCNT-CS-GOx) ทำการทดลองโดยมี FcCHO ความเข้มข้น 0.5 mM เป็นเมดิเอเตอร์ จะเห็นได้ว่าข้าไฟฟ้าห้อง 5 ชนิด (A-E) กลูโคส เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าที่สูงกว่า 0.50 V ในขณะที่ข้าไฟฟ้า F (GC/MWCNT+CS+GOx) กลูโคส เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้า 0.32 V และให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่สุด เมื่อจากข้าไฟฟ้านิด F มี เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา ทำให้สามารถตรวจกลูโคสที่ศักย์ต่ำๆได้ มีไคโตชาณช่วยให้ เอนไซม์มีความคงตัวมากขึ้น ส่วนการบอนนาโนทิวบ์ช่วยให้สามารถนำไฟฟ้าได้ดี และเพิ่มพื้นที่ผิวในการจุเอนไซม์ ทำให้มีอัตราการขนส่งอิเล็กตรอนสูงจึงช่วยให้กลูโคสเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เร็วที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำ ดังนั้นข้าไฟฟ้า ชนิด GC/MWCNT-CS-GOx จึงเป็นข้าไฟฟ้าใบโอลิโอลูดที่เหมาะสม

#### 4.2.2.2 ศึกษาเคมีดิเอเตอร์ที่เหมาะสม

ในการทดลองนี้จะศึกษาเคมีดิเอเตอร์ที่เหมาะสมในการช่วยนำส่งอิเล็กตรอน ในข้าไฟฟ้านิด GC/MWCNT-CS-GOx โดยเมดิเอเตอร์ที่จะทำการศึกษาได้แก่ ferrocenecarboxaldehyde (FcCHO), ferrocene (Fc) , potassium hexacyano ferrate ( $K_3 Fe(CN)_6$ ) และ prussian blue ความเข้มข้น 0.5 mM ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.21

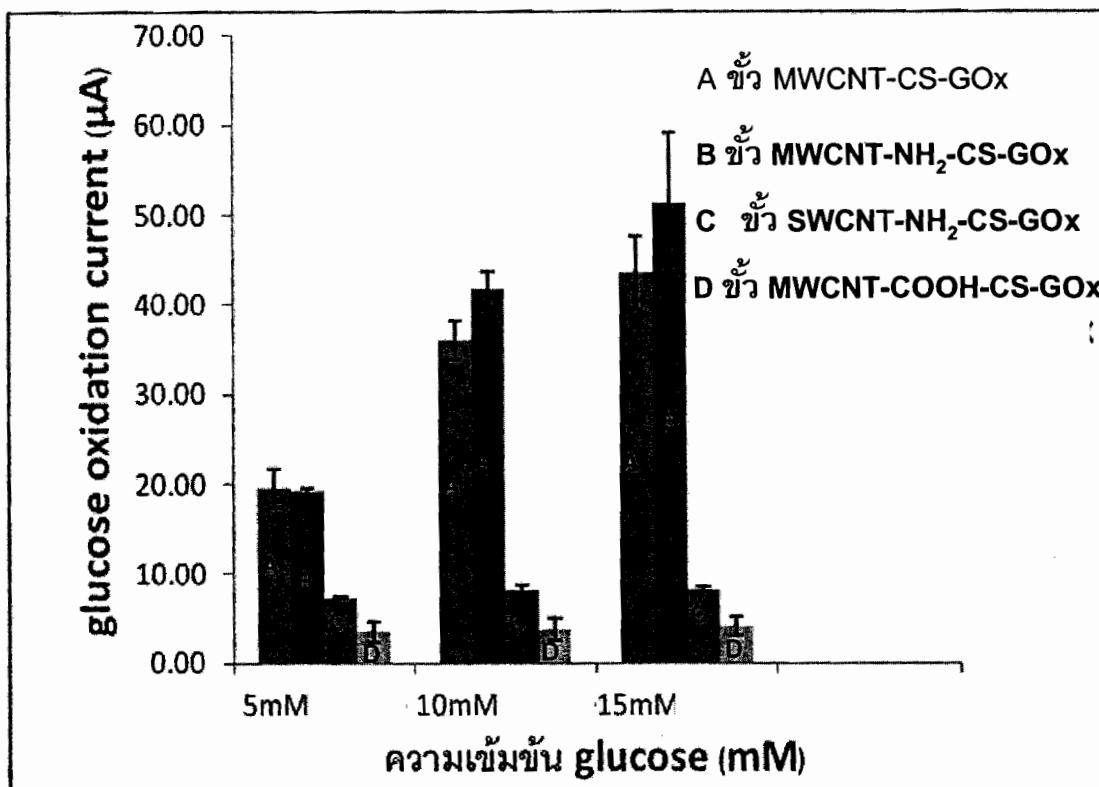
จากการทดลองในรูปที่ 4.21 พบว่าในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส จะเกิดที่ศักย์ต่ำลง เมื่อมีเมดิเอเตอร์ทำหน้าที่ในการนำส่งอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าเมื่อมี FcCHO เป็นเมดิเอเตอร์จะให้ค่ากระแสที่สูงที่สุด แสดงว่า FcCHO ทำหน้าที่ในการนำส่งอิเล็กตรอนได้ดีที่สุด และพบว่าศักย์ไฟฟ้าที่ยอดพีคอาโนดิกมีค่าแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอนของเมดิเอเตอร์แต่ละชนิด  $K_3 Fe(CN)_6$  และ Prussian blue ให้ค่าศักย์ที่ยอดพีคอาโนดิกที่สูง (มากกว่า 0.50 V) และให้สัญญาณของกระแสสั่นข้างตัว ส่วน Fc และ FcCHO จะให้ค่าศักย์ที่ยอดพีคอาโนดิกต่ำกว่า คือ ที่ 0.25 และ 0.30 V ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ FcCHO เมื่อใช้ FcCHO เป็นเมดิเอเตอร์ จะเห็นว่า FcCHO ให้ค่ากระแสที่สูงกว่า แสดงว่า FcCHO ช่วยในการถ่ายเท อิเล็กตรอนระหว่างบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์กับผิวน้ำของข้าไฟฟ้าได้ดีกว่า จึงทำให้ได้สัญญาณ กระแสที่สูงและช่วยให้เกิดปฏิกิริยาที่ศักย์ไฟฟ้าที่ลดต่ำลง ดังนั้น FcCHO จึงเป็นเมดิเอเตอร์ที่เหมาะสม



รูปที่ 4.21 ไซคลิกโวลเทมโมแกรมของสารละลายน้ำในน้ำ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M และเมื่อเติมสารละลายน้ำดีเอเตอร์ชนิดต่างๆ (Prussian blue,  $K_3 Fe(CN)_6$ , Fc และ FcCHO) ความเข้มข้น 0.5 mM

#### 4.2.2.3 การศึกษาหานิคของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสม

ในการศึกษาถึงนิคของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสมในการเตรียมไบโอดีไซด์ ชนิดcarbon nanoทิวบ์ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ MWCNT, MWCNT-NH<sub>2</sub>, MWCNT-COOH และ SWNT-NH<sub>2</sub> ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 4.22



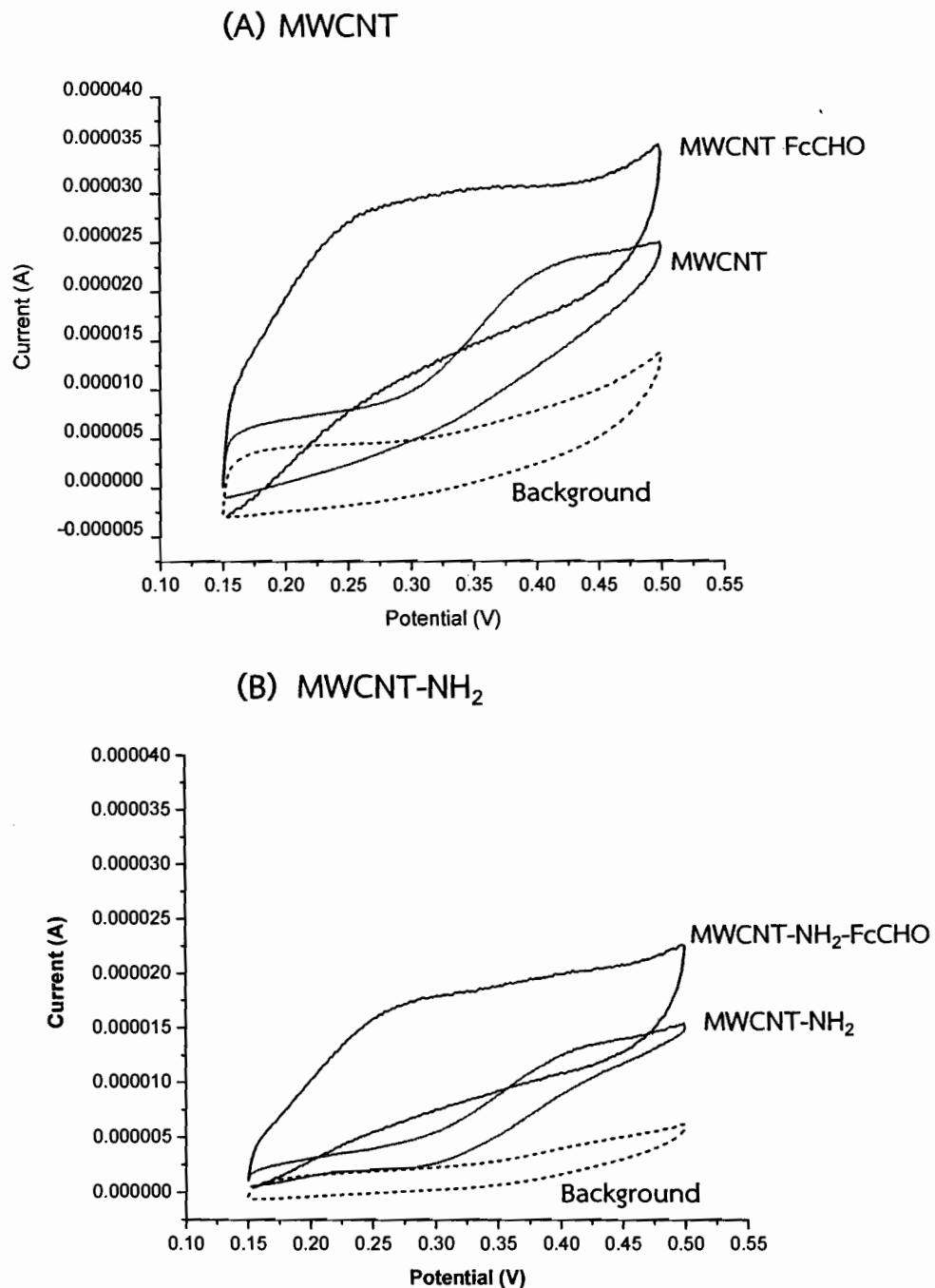
รูปที่ 4.22 กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบชั่วไบโอดีไซด์ที่ไม่ดิฟายด์ต่างๆ ในการโมดิฟายด์ชั่วไฟฟ้า

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.22 ที่ได้จะเห็นว่าที่ศักยไฟฟ้าที่ 0.35 V ชั่วไบโอดีไซด์ที่ไม่ดิฟายด์ ด้วย MWCNT-NH<sub>2</sub> จะให้ค่ากระแสที่สูงที่สุดรองลงมาเป็นชั่ว MWCNT ชั่ว SWNT-NH<sub>2</sub> และ ชั่ว MWCNT-COOH ตามลำดับ แสดงว่าคาร์บอนนาโนทิวบ์ชนิด MWCNT และ MWCNT-NH<sub>2</sub> ช่วยในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างสารละลายกับผิวน้ำชั่วไฟฟ้าได้ดีกว่า คาร์บอนนาโนทิวบ์ชนิดอื่นๆ

#### 4.2.2.4 การเพิ่มประสิทธิภาพของข้าวใบโอลอโนดโดยการตรึง FcCHO ในคาร์บอนนาโนทิวบ์ด้วยการดูดซับทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี

การทดลองนี้จะศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึง FcCHO ในคาร์บอนนาโนทิวบ์ 2 ชนิด (MWCNT และ MWCNT-NH<sub>2</sub>) โดยใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมีก่อนนำมาโมดิฟายด์ ข้าวไฟฟ้า จะข้าวไฟฟ้า GC/MWCNT-FcCHO-CS-GOx และ ข้าวไฟฟ้า GC/ MWCNT-NH<sub>2</sub>-FcCHO-CS-GOx เป็นข้าวไฟฟ้าใช้งาน เมื่อนำข้าวไฟฟ้าหั่งสองชนิดที่เตรียมได้ มาใช้ศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.23

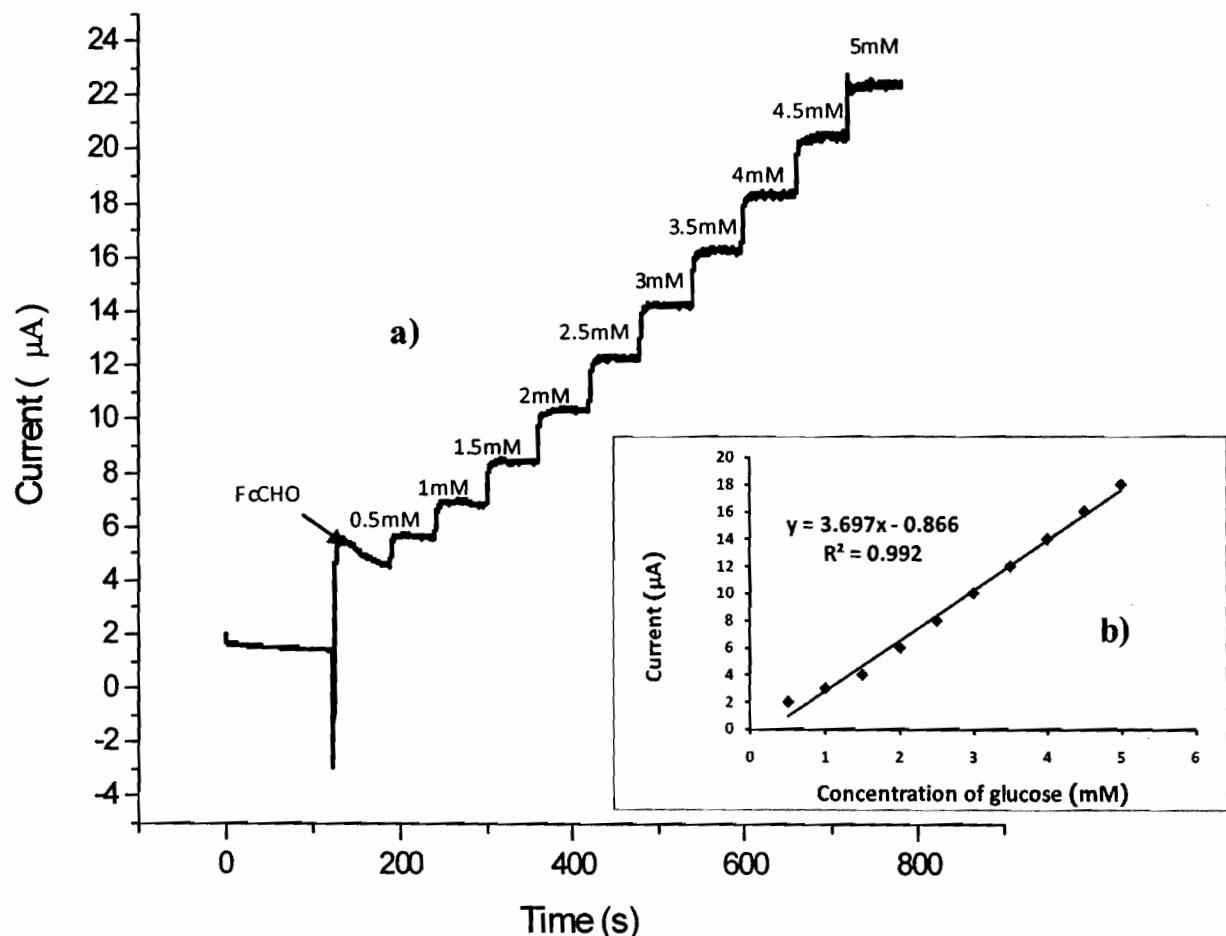
จากผลการทดลองในกราฟรูปที่ 4.23 ทั้งสองกราฟจะเห็นว่าค่ากระแสงของกลูโคสความเข้มข้น 10 mM ที่ได้จากข้าวไฟฟ้าที่มีการตรึง FcCHO ในท่อคาร์บอนนาโนทิวบ์ (MWCNT-FcCHO และ MWCNT-NH<sub>2</sub>-FcCHO) ให้สัญญาณค่ากระแสงที่สูงกว่าค่ารับอนนาโนทิวบ์ ที่ไม่มีการตรึง FcCHO (MWCNT และ MWCNT-NH<sub>2</sub>) อย่างเห็นได้ชัด และว่าตั้ง FcCHO ในโครงสร้างของคาร์บอนนาโนทิวบ์ ส่งผลให้การนำส่งอิเล็กตรอนเกิดขึ้นได้ดีขึ้นทำให้ค่ากระแสงออกซิเดชันของกลูโคสที่วัดได้เพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบชนิดของคาร์บอนนาโนทิวบ์ระหว่าง MWCNT และ MWCNT-NH<sub>2</sub> พบว่าคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ไม่มีหมุนฟังก์ชัน (MWCNT) สามารถตรึง FcCHO ได้ดีกว่าคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีหมุนฟังก์ชันอะมิโน (MWCNT-NH<sub>2</sub>) ทำให้สัญญาณของกลูโคสที่ได้จากข้าวไฟฟ้าที่ใช้ MWCNT-FcCHO มีค่าสูงกว่า



รูปที่ 4.23 ไซคลิกโวลต์แอมป์เวย์ของสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 mM ที่ข้าวไฟฟ้าที่ใช้การบอนนโนในทิวบ์ที่ตرجี FcCHO (A) MWCNT-FcCHO และ (B) MWCNT-NH<sub>2</sub>-FcCHO และ ค่ารบอนนาโนทิวบ์ที่ไม่ผ่านกระบวนการ MWCNT และ MWCNT-NH<sub>2</sub> (control) เส้นประแสดงกระแสพื้น (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M)

#### 4.2.2.5 การศึกษาคุณลักษณะกลูโคสไปโอเชนเซอร์

นำข้าวไฟฟ้า GC/MWCNT-FcCHO-CS-GOx มาศึกษาโดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี เพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่ศักยไฟฟ้า +0.4 V ในสารละลายน้ำฟลูอิดบัฟเฟอร์ pH 7 ความเข้มข้น 0.1 M ทำการศึกษาโดยเติม FcCHO ความเข้มข้น 0.5 mM ลงในสารละลายน้ำเพื่อใช้เป็นเมติเอเตอร์แล้วเติมกลูโคสที่ละ 0.5 mM ในสารละลายน้ำ ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 4.24a



รูปที่ 4.24 a) แอมเพอร์โรแกรมและ b) กราฟมาตรฐานของกลูโคสความเข้มข้น 0.5- 5 mM (สมการเส้นตรงคือ  $y = 3.697x - 0.866$  มีค่า  $r^2 = 0.992$  )

จากรูปที่ 4.24a พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสความเข้มข้นค่ากระแสที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้นโดยเมื่อเติมกลูโคสความเข้มข้น 0.5 mM กลูโคสไปโอเชนเซอร์สามารถตรวจวัดให้ค่ากระแสที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคงที่อย่างรวดเร็ว และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสที่ละ 0.5 mM ไปจนถึง 5 mM ค่ากระแสที่ได้เพิ่มมากขึ้นแสดงว่ากลูโคสไปโอเชนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีการตอบสนองต่อความเข้มข้นของกลูโคสที่เติมลงไปและสัญญาณที่

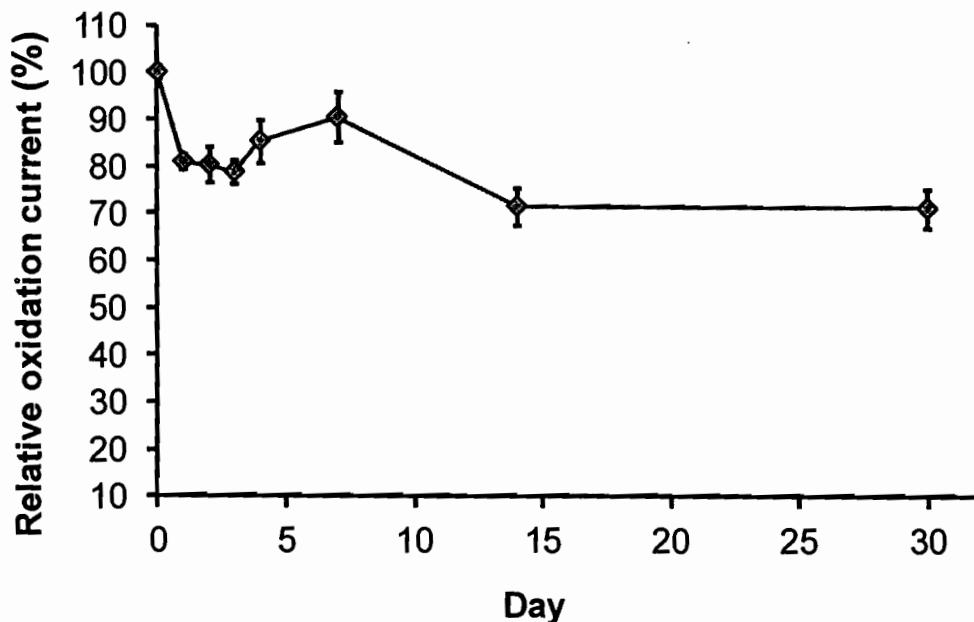
ได้จากการวัดมีความเสถียรดี ดังนั้นนอกจะจะเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นข้าวไปโอแอนดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ แล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดกลูโคสโดยใช้เทคนิคเอมเพอร์โรเมทรีได้ด้วย

จากรูปที่ 4.24 b เมื่อพLOTกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสกับค่ากระแส จะได้สมการเส้นตรงคือ  $y = 3.697x - 0.866$  มีค่า  $r^2 = 0.992$  ระบบวิเคราะห์เอมเพอร์โรเมทรีที่ข้าวกลูโคสใบโอเชนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีสภาพไวและความเที่ยงตรงสูง สามารถตรวจวัดกลูโคสในระดับต่ำถึง 0.081 mM และ RSD เท่ากับ 3.01% ( $n=5$ )

ดังนั้นข้าว GC/MWCNT-FcCHO-CS-GOx ที่พัฒนาขึ้มนี้นอกจากสามารถใช้เป็นไปโอแอนดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพแล้ว ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิคเอมเพอร์โรเมทรีได้

#### 4.2.2.6 การศึกษาความเสถียรของไปโอแอนด

ผลการศึกษาความเสถียรของข้าวไฟฟ้า GC/MWCNT-FcCHO-CS-GOx แสดงดังรูปที่ 4.25 ผลการทดลองพบว่าข้าวไฟฟ้า GC/MWCNT-FcCHO-CS-GOx มีความเสถียร โดยค่ากระแสออกซิเดชันของกลูโคสที่ได้จากการวัดเมื่อเตรียมได้ใหม่ ๆ หลังจากเตรียมใบโอเชนเซอร์ไว้ 1-7วัน มีค่าที่ค่อนข้างคงที่และใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้น (~90%) และเริ่มลดลงเมื่อวัดในวันที่ 14 โดยวัดค่ากระแสได้ประมาณ 71% และเมื่อทิ้งไว้ 30 วัน ค่ากระแสยังคงเหลือประมาณ 71% ของค่าเริ่มต้น



รูปที่ 4.25 ความเสถียรของข้าวไฟฟ้า GC/MWCNT-FcCHO-CS-GOx ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในการเก็บรักษา (เก็บที่อุณหภูมิ 4°C)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

ในการพัฒนาข้าวใบโอแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase สามารถพัฒนาขึ้นโดยการตึงเย็นไนซ์แลคเคลสไว้ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประจักษ์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน ทำให้ได้ใบโอเซนเซอร์ที่มีสภาพไว มีความจำเพาะเจาะจง และมีความเสถียรที่ดี เนื่องจากวัสดุเชิงประจักษ์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานมีความสามารถเข้ากับสารชีวโมเลกุล (biocompatibility) สามารถช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการตึงเย็นไนซ์แลคเคลสไว้ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประจักษ์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานและสารละลายใบวินเชร์รัมอัลบูมีน ทำให้สามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจน และมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นใบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้ต่อไป

ในการพัฒนาข้าวใบโอแอนิด โดยพัฒนากระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนด้วยตัวนำส่งอิเล็กตรอนที่เป็นโพลิเมอร์นำไฟฟ้า polyaniline (co-*m*-ferrocenylaniline) หรือ PFcANI เพื่อช่วยให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่ถูกเร่งด้วยเย็นไนซ์กลูโคสออกซิเดสเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้าวใบโอแอนิดใบโอแอนิดชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นได้โดยนำข้าวไฟฟ้ากลาสชีคาร์บอนมาดัดปรัดด้วยวัสดุเชิงประจักษ์ไคโตซาน-PFcANI และอนุภาคทองนาโน (GC/PFcANI/AuNPs/CS/GOx) มีความจำเพาะเจาะจง และมีความเสถียรที่ดี เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้

ในการพัฒนาข้าวใบโอแอนิดชนิดใหม่ โดยอาศัยการตึงเย็นไนซ์กลูโคสออกซิเดสในเมทริกซ์ของคาร์บอนนาโนทิวบ์และไคโตซานก่อนนำไปเป็นดิฟายต์ข้าวไฟฟ้ากลาสชีคาร์บอน พบว่าการการตึงไฟฟอร์โนนิล์บากหัลตีไฮด์ (FcCHO) บนคาร์บอนนาโนทิวบ์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี สามารถให้สัญญาณค่ากระแสที่สูงขึ้น ทำให้สภาพไวของข้าวไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ข้าวไฟฟ้า GC/MWCNT-FcCHO-CS-GOx ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรดีมาก โดยค่ากระแสออกซิเดชันของกลูโคสที่ได้จากการวัดหลังจากเก็บไว้ 1 สัปดาห์มีค่า ~90% ของค่าเริ่มต้น และหลังจาก 1 เดือนค่ากระแสมีค่า ~70% ของค่าเริ่มต้น คุณสมบัติในการมีความเสถียรที่ดีของข้าวไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นใบโอแอนิดใบโอแอนิดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### เอกสารอ้างอิง

1. Bullen, R. A.; Arnot, T. C.; Lakeman, J. B.; Walsh, F. C., Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics* 2006, 21, (11), 2015-2045.
2. Potter, M. C., Electrical effects accompanying the decomposition of organic compound. *Proceedings of the Royal Society* 1911, 260, (B84), 260-276.
3. H.P. Benetto, J. L. S., K. Tanaka and C.A. Vega, Anodic reaction in microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering* 1991, 25, (2), 559-568.
4. <http://www.sony.net/SonyInfo/News/Press/200708/07-074E/index.html>.
5. Zheng, W.; Zho, H. M.; Zheng, Y. F.; Wang, N., A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell. *Chemical Physics Letters* 2008, 457, (4-6), 381-385.
6. Davis, F.; Higson, S. P. J., Biofuel cells - Recent advances and applications. *Biosensors & Bioelectronics* 2007, 22, (7), 1224-1235.
7. Davis, F.; Higson, S. P. J., Biofuel cells--Recent advances and applications. *Biosensors and Bioelectronics* 2007, 22, (7), 1224-1235.
8. Cohen, B., The bacterial culture as an electrical half-cell. *J. Bacteriology* 1931, 21, 18.
9. E. Katz, I. W. a. A. B. K., A non-compartmentalized glucose O<sub>2</sub> biofuel cell by bioengineered electrode surfaces. *J. Electroanalytical Chemistry* 1999, 479, 64-68.
10. Palmore, G. T. R.; Kim, H.-H., Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999, 464, (1), 110-117.
11. I. V. Berezin, V. A. B., S.D. Varfolomeev, M. R. Tarasevich, A.I. Yaropolov, *Doklady Akad. Nauk SSSR* 1978, 240, 615.
12. V.A. Bogdanovskaya, E. F. G., M. R. Tarasevich, *Elektrokhimiya* 1986, 22, 742.
13. Farneth, W. E.; Diner, B. A.; Gierke, T. D.; D'Amore, M. B., Current densities from electrocatalytic oxygen reduction in laccase/ABTS solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2005, 581, (2), 190-196.
14. Farneth, W. E.; D'Amore, M. B., Encapsulated laccase electrodes for fuel cell cathodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2005, 581, (2), 197-205.
15. K. Gong, Y. Y., M. Zhang, L. Su, S. Xiong and L. Mao, *Electrochemistry and Electroanalytical Applications of Carbon Nanotubes: A Review*. *Analytical Sciences* 2005, 21, (12), 1383.
16. R. H. Baughman, A. A. Z., W. A. de Heer, *Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications*. *Science* 2002, 297, (5582), 787 - 792.
17. Smolander, M.; Boer, H.; Valkainen, M.; Rozeman, R.; Bergelin, M.; Eriksson, J. E.; Zhang, X. C.; Koivula, A.; Viikari, L., Development of a printable laccase-based biocathode for fuel cell applications. *Enzyme and Microbial Technology* 2008, 43, (2), 93-102.

18. Deng, L.; Shang, L.; Wang, Y.; Wang, T.; Chen, H.; Dong, S., Multilayer structured carbon nanotubes/poly-l-lysine/laccase composite cathode for glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell. *Electrochemistry Communications* 2008, 10, (7), 1012-1015.
19. A. Pizzariello, M. S. a. S. M., A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 2002, 56, 99-105.
20. Y. Xiao, F. P., E. Katz, J. Hainfeld and I. Willner, *Science* 2003, 299, 1877-1881.
21. F. Barriere, P. K. a. D. L., A laccase–glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer. *Electrochimica Acta* 2006, 51, 5187-5189.
22. Ivnitski, D.; Atanassov, P., Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *Trametes versicolor*. *Electroanalysis* 2007, 19, (22), 2307-2313.
23. Dong, Y. L. a. S., A biofuel cell harvesting energy from glucose-air and fruit juice-air. *Biosensors and Bioelectronics* 2007, 23, (4), 593-597.
24. Dong, Y. L. a. S., A biofuel cell with enhanced power output by grape juice. *Electrochemistry Communications* 2007, 9, 1423-1427.
25. M. Togo, A. T., T. Asai, H. Kaji and M. Nishizawa, Structural studies of enzyme-based microfluidic biofuel cells. *J. Power Sources* 2008, 178, 53-58.
26. Wang, J. and Musameh, M. (2004) Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified-electrodes. *Analytica Chimica Acta* , 511, 33-36.
27. Tangkuaram, T et al. (2007) Highly stable amplified low-potential electrocatalytic detection of NAD<sup>+</sup> at azure-chitosan modified carbon electrodes. *Sensors and Actuators B*, 30, 277-281.
28. Haghghi, B., Gorton, L., Ruzgas, T. and Jonsson, L.J. (2003) Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Tametes vesicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 487, 3-14.
29. Portaccio, M., Di Martino, S., Durante, et al. (2006) Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41, 97-102.
30. Lee, S. K., et al. (2002) Nature of the intermediate formed in the reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of American Chemical Society*, 124, 6180-6193.
31. Santucci, R. et al. (1998) Unmediated heterogenous electron transfer reaction of ascorbate oxidase and laccase at gold electrode. *Biochemistry Journal*, 332, 611-615.
32. Kulys, J., et al.(2002) Laccase-catalyzed oxidation of syringates in presence of albumins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatics*, 18, 99-108.

### รายงานสรุปการเงิน

**โครงการ: การพัฒนาใบโอแครโทดและใบโอแอนดอนนิดใหม่โดยใช้อ่อนไขม์เพื่อการประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ**  
**ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน นางสาว มะลิวรรณ ออมตองไชย**  
**รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค.2552 ถึงวันที่ 30 ก.ย. 2554**

รายการ	ปี 2553	รายจ่าย	ปี 2554	รายจ่าย	คงเหลือ
<b>1. งบดำเนินการ</b>	<b>155,000</b>		<b>160,400</b>		
<b>1.1 ค่าตอบแทน และค่าใช้สอย</b>					
1.1.1 ค่าตอบแทน (ค่าอาหารทำการนอกเวลา)	40,000	10,000	20,000	4,980	15,020
<b>1.1.2 ค่าใช้สอย</b>					
-ค่าจ้างเหมาผู้ช่วยวิจัย (12X 8,000 บาท)	96,000	96,500	96,000	96,000	0
-ค่าจ้างอื่น ๆ เช่น เหมาพิมพ์/จัดทำรูปเล่มรายงาน, วิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ	9,000	6,589.20	30,000	5,820	24,180
-ค่าเดินทางเพื่อเสนอผลงานภายในประเทศ	5,000	0	10,000	11,912	-1,912
-ค่าสืบค้นข้อมูลทั้งในและต่างประเทศ	5,000	0	4,400	0	4,400
<b>2. ค่าวัสดุและสารเคมี</b>	<b>249,500</b>		<b>319,600</b>		
-สารเคมีและเครื่องแก้ว	100,000	91,835.13	175,600	215,477.01	-39,877.01
-อุปกรณ์และวัสดุวิทยาศาสตร์	109,500	175,556.67	110,000	116,279.88	-6,279.88
-วัสดุสื่อสารและวัสดุสำนักงาน	10,000	4,917	19,000	6,538	12,462
-วัสดุหนังสือ วารสารและตำรา	5,000	0	0	1,586	-1,586
-วัสดุสิ่นเปลืองในห้องปฏิบัติการ/สำนักงาน	25,000	19,102	15,000	21,406.38	-6,406.38
<b>2.2 ค่าสาธารณูปโภค</b>					
-ค่าสาธารณูปโภค (ค่าน้ำ 5%, มหาวิทยาลัย 5%)	40,500	40,500	48,000	48,000	0
<b>รวมงบประมาณทั้งสิ้น</b>	<b>445,000</b>		<b>445,000</b>		<b>527,999.27</b>
					0.73

## ผลผลิต (Output) ของโครงการ

### 1 ผลผลิตของโครงการในเรื่องของการพิมพ์สรุปได้ดังต่อไปนี้

#### · 1.1 วารสารระดับชาติ 1 เรื่อง

- ยุวกร เสนศรี, เสนอ ชัยรัมย์, ดวงใจ นาคปรีชา และ มะลิวรรณ ออมตองไชย “การพัฒนาใบโอลูเซอร์ด้วยเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตไซน์เร่งปฏิกิริยาเรตักชันของออกซิเจนด้วยแลคเคส” วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 16 (2554) 2: 40-50.

#### 1.2 วารสารนานาชาติ 1 เรื่อง

- S. Chairam, W. Sriraksa, M. Amatatongchai and E. Somsook “Electrocatalytic Oxidation of Ascorbic Acid Using a Poly(aniline-co-m-ferrocenylaniline) Modified Glassy Carbon Electrode” Sensors, 2011, 11(11), 10166-10179.

#### 1.3 นำเสนอในงานประชุม

##### 1.3.1 ระดับชาติ

- ยุวกร เสนศรี, เสนอ ชัยรัมย์ และ มะลิวรรณ ออมตองไชย “การพัฒนาใบโอลูแคโทดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเซลล์เชือเพลิงชีวภาพด้วยเอนไซม์แลคเคส” การประชุมวิชาการ มอบ.วจัย ครั้งที่ 4, 9-10 สิงหาคม 2553 (อุบลราชธานี, ประเทศไทย).

- Y. Sensri, S. Chairam, D. Nacapricha and M. Amatatongchai “Development of biosensor based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite for laccase-catalyzed oxygen reduction” 36<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT36) 26 - 28 October 2010 (Bangkok, Thailand).

##### 1.3.2 ระดับนานาชาติ

- M. Amatatongchai, J. Phanthuwat and D. Nacapricha “Development of glucose biosensor based on glucose oxidase entrapped in the matrix of carbon nanotube/chitosan modified glassy carbon electrode” 16<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2010) including related techniques 25-30 April 2010 (Pattaya, Thailand).

### 2 Output ของโครงการในเรื่องของผลการวิจัยสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. ได้ข้าวไฟฟ้าใบโอลูแคโทดและใบโอลูแอนดอนิดใหม่ ที่สามารถนำไปในเซลล์เชือเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

1.1 ข้าวไฟฟ้าใบโอลูแคโทดชนิดใหม่ ที่พัฒนาขึ้นจากการตีริงเอนไซม์แลคเคสลงบนเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตไซน์ และให้เป็น biocatalyst ในการเกิดปฏิกิริยาเรตักชันของ dioxygen ( $O_2$ ) ไปเป็นน้ำ ( $H_2O$ ) ที่มีความคงตัวของเอนไซม์และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้อิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นข้าวไฟฟ้าใบโอลูแคโทดในเซลล์เชือเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

1.2 ข้าวไฟฟ้าใบโอลอโนดชนิดใหม่ ที่พัฒนาจากวิธีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1) บนโพลิเมอร์นำไฟฟ้านิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) หรือ PFcANI และ 2) ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประจุของสารบอนนานิทิวบ์ที่มีการตรึงตัวอย่างเฟอร์โรเซ็นคาร์บอชัลด์ไฮด์ (FcCHO) และไคโตชาโนก่อนนำไปโมดิฟายด์ข้าวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน โดยสารดังกล่าวทำหน้าที่เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอนทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ตรึงบนโพลิเมอร์และเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประจุของสารบอนนานิทิวบ์ catalyze การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายกลูโคสทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้า ( $H_2O_2$ ) ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ศักยิ่งสูงนัก ทำให้ได้ข้าวไฟฟ้าใบโอลอโนดชนิดใหม่ที่ให้สัญญาณค่ากระแสที่สูงขึ้น ทำให้สภาพใบของข้าวไฟฟ้าเพิ่มขึ้น มีความเสถียร สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นข้าวใบโอลอโนดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

2. ผลงานที่ได้พัฒนาขึ้นได้ถูกถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการนำผลการทดลองที่ได้ไปแสดงหรือบรรยายในที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ และนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

3. ได้อย่างความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาศักยภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อเพิ่มนูลค่าทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย เช่น ข้าวโพด มันส้มปะหลัง อ้อย ฯลฯ รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้กับภาคอุตสาหกรรมที่ต้องการนำเทคโนโลยีที่ได้พัฒนาขึ้นไปผลิตเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีประสิทธิภาพในการให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้น และ/หรือสามารถนำไปใช้ในการย่อยขนาดให้เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีขนาดเล็กลงได้

4. โครงการวิจัยนี้สามารถอื้อให้มีการผลิตมหาบัณฑิต ทางด้านเคมี จำนวน 2 คน องค์ความรู้จากงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดเป็นสารนิพนธ์สำหรับนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิชาเคมี จำนวน 2 เรื่อง

# ผลงานวิจัย

การพัฒนาใบโฉมแคทด์และใบโฉมในด้า

ปีงบประมาณ 2553- 2554

## ผลงานวิจัย

### บทความวิจัย

#### วารสารระดับชาติ 1 เรื่อง

- ยุวกร เสนศรี, เสนอ ชัยรัมย์ และ มะลิวรรณ ออมตรังไชย การพัฒนาไปโอลเซนเซอร์ด้วยเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบcarbon nanotubes-on-titanium-coated carbon fiber ปฏิการิยารีดักชันของออกซิเจนด้วยแลคเคส, วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 16 (2554) 2: 40-50.

#### วารสารนานาชาติ 1 เรื่อง

- S. Chairam, W. Sriraksa, M. Amatatongchai and E. Somsook “Electrocatalytic Oxidation of Ascorbic Acid Using a Poly(aniline-co-m-ferrocenylaniline) Modified Glassy Carbon Electrode” Sensors, 2011, 11(11), 10166-10179.

## นำเสนอในงานประชุม

### ระดับชาติ

1. ยุวกร เสนศรี, เสนอ ชัยรัมย์ และ มะลิวรรณ อุมาตงไชย “การพัฒนาใบโอลูโคท็อดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพด้วยเอนไซม์แลคเคส” การประชุมวิชาการ มอ.วิจัย ครั้งที่ 4, 9-10 สิงหาคม 2553 (อุบลราชธานี, ประเทศไทย).
2. Y. Sensri, S. Chairam, D. Nacapricha and M. Amatatongchai “Development of biosensor based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite for laccase-catalyzed oxygen reduction” 36<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT36) 26 - 28 October 2010 (Bangkok, Thailand).

### ระดับนานาชาติ

- 2 M. Amatatongchai, J. Phanthuwat and D. Nacapricha “Development of glucose biosensor based on glucose oxidase entrapped in the matrix of carbon nanotube/chitosan modified glassy carbon electrode” 16<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2010) including related techniques 25-30 April 2010 (Pattaya, Thailand).



# วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา

## BURAPHA SCIENCE JOURNAL

ISSN 0858-7612

ปีที่ 16 (ฉบับที่ 2) กรกฎาคม - ธันวาคม 2554 Volume 16 (No.2 July - December 2011)

## บทความวิจัย

การศึกษาเรื่องการฟักไข่ของหอยทากน้ำจืดชนิดหนึ่ง ( <i>Pteria penguin</i> , Roding, 1798) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดย Mortality of winged Pearl Oysters, <i>Pteria penguin</i> (Roding, 1798), caused by Nucleation and Rearing	3
ผลกระทบของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	13
ผลกระทบของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	16
การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมสำหรับการปลูกต้นไม้ในบริเวณกรุงเทพฯ (Acropora sp.) เมื่อการฟื้นฟู กรณีศึกษาในเขตกรุงเทพฯ จังหวัดชลบุรี Appropriate Material for Transplantation of Staghorn Coral (Acropora sp.) A Case study at Koh-Kham, Chonburi Province	21
การสำรวจปริมาณรังสีธรรมชาติในแม่น้ำบางปะกง จังหวัดชลบุรี ประจำปี พ.ศ. 2545 Quantitative Determination of a Natural Radioactive Dissolved $^{226}\text{Ra}$ in the Bangpakong Estuary in 2002	26
การพัฒนาเอนเซนเซอร์พื้นฐานของไนโตรเจนไนท์-ชิตติโซน์ (Nitrogen-Nitosan) สำหรับการลดออกไซด์ออกซิเจน Catalytic Reduction of Oxygen Oxide by Nitrogen-Nitosan Sensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite	40
การพัฒนาเอนเซนเซอร์พื้นฐานของไนโตรเจนไนท์-ชิตติโซน์ (Nitrogen-Nitosan) สำหรับการลดออกไซด์ออกซิเจน Catalytic Reduction of Oxygen Oxide by Nitrogen-Nitosan Sensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite	43
การพัฒนาเอนเซนเซอร์พื้นฐานของไนโตรเจนไนท์-ชิตติโซน์ (Nitrogen-Nitosan) สำหรับการลดออกไซด์ออกซิเจน Catalytic Reduction of Oxygen Oxide by Nitrogen-Nitosan Sensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite	46
การพัฒนาเอนเซนเซอร์พื้นฐานของไนโตรเจนไนท์-ชิตติโซน์ (Nitrogen-Nitosan) สำหรับการลดออกไซด์ออกซิเจน Catalytic Reduction of Oxygen Oxide by Nitrogen-Nitosan Sensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite	49
การพัฒนาเอนเซนเซอร์พื้นฐานของไนโตรเจนไนท์-ชิตติโซน์ (Nitrogen-Nitosan) สำหรับการลดออกไซด์ออกซิเจน Catalytic Reduction of Oxygen Oxide by Nitrogen-Nitosan Sensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite	52
การพัฒนาเอนเซนเซอร์พื้นฐานของไนโตรเจนไนท์-ชิตติโซน์ (Nitrogen-Nitosan) สำหรับการลดออกไซด์ออกซิเจน Catalytic Reduction of Oxygen Oxide by Nitrogen-Nitosan Sensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite	55
การพัฒนาเอนเซนเซอร์พื้นฐานของไนโตรเจนไนท์-ชิตติโซน์ (Nitrogen-Nitosan) สำหรับการลดออกไซด์ออกซิเจน Catalytic Reduction of Oxygen Oxide by Nitrogen-Nitosan Sensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite	58
การพัฒนาเอนเซนเซอร์พื้นฐานของไนโตรเจนไนท์-ชิตติโซน์ (Nitrogen-Nitosan) สำหรับการลดออกไซด์ออกซิเจน Catalytic Reduction of Oxygen Oxide by Nitrogen-Nitosan Sensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite	61
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	65
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	68
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	71
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	74
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	77
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	80
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	83
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	86
ผลของการเพาะเลี้ยงต้นไม้ในพื้นที่ดินโภชนาญาณในช่วงฤดูแล้ง ภาคใต้ตอนบน ประเทศไทย (ฉบับที่ 2) Effect of Cultivation of seedlings in Phetchaburi Province during the dry season (ฉบับที่ 2)	89
<b>STUDY OF CACI</b>	
Performance of Neural Networks, Multi-Layer Perceptron and Radial Basis Function for Multivariate Quality Control Charts	93
การประเมินค่าคุณภาพของเครื่องจักรตัดกระดาษแบบดิจิตอล ด้วยเครื่องมือวัดความถี่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า Frequency Measurement of Paper Cutting Machine by Electromagnetic Wave Frequency Counter	97
Review of Lyapunov-based Design via Control Lyapunov Functions	101
มอลลัสกัสในระบบนิเวศน์ป่าชายเลนในอ่าวไทย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ Molluscs in Mangrove Ecosystems in the Gulf of Thailand: Diversity and Adaptation	104
การบล็อกการทำงานของ CYP2A6 ให้ลดลงในกลุ่มบุหรี่ อาจเป็นสาเหตุของการติดบุหรี่ Inhibition of the Human CYP2A6, the Nicotine-Metabolizing Enzyme: An Alternative Smoking Cessation Strategy	114
การแก้ปัญหาเชิงเส้นแบบมีขอบเขตและควบคุมแบบมีข้อจำกัดในฟีลด์ฟูล ไม่สามารถใช้วิธีการคำนวณเชิงเส้นได้ Infeasibility and Unboundedness of Primal-Dual Problems Using Interior-point Methods	125
การแก้ปัญหาเชิงเส้นแบบมีขอบเขตและควบคุมแบบมีข้อจำกัดในฟีลด์ฟูล ไม่สามารถใช้วิธีการคำนวณเชิงเส้นได้ Infeasibility and Unboundedness of Primal-Dual Problems Using Interior-point Methods	135

# วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา BURAPHA SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 16 (ฉบับที่ 2) กรกฎาคม - ธันวาคม 2554 Volume 16 (No.2) July - December 2011

เจ้าของ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
สำนักงาน	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ถ.ลงหาดบางแสน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131 โทร. 0-3810-3042 โทรสาร. 0 3839-4480
บรรณาธิการที่ปรึกษา	ศ.นพ.สมพล พงศ์ไทย ศ.ดร.สุชาติ อุปัมณ์ ศ.ดร.อิรุณี บุญยโสภณ ศ.ดร.วิชัย รั้วตระกูล <sup>1</sup> Prof.Dr. Frederick W.H. Beamish
ผู้เชี่ยวชาญภายนอกสถาบัน	ศ.นพ.เรื่อง สมณะ ศ.ดร.ชิดชานก เหลือสินทรัพย์ ศ.ดร.สมพงษ์ ธรรมพงษา <sup>2</sup> ศ.ดร.สุทธัคณ์ ยกล้าน ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ศ.ดร.สมศักดิ์ พันธุ์อุดมนา <sup>3</sup> ศ.ดร.สมศักดิ์ ปัญหา <sup>4</sup> ศ.ดร.วิเชียร เลาหโภคล ศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ <sup>5</sup> ศ.ดร.วิภูษิต มณฑะจิตร <sup>6</sup> ผศ.ดร.ศิริโอม ทุ่งเก้า <sup>7</sup> ผศ.ดร.เอกกวัช ศรีสุข <sup>8</sup> ดร.เอกพงษ์ สุวรรณมาลา <sup>9</sup> ผศ.ดร.คณินทร์ วีระพาโวหาร <sup>10</sup> ผศ.ดร.กล่าววชัย ศรีสุข <sup>11</sup> ผศ.ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร <sup>12</sup> ผศ.ดร.สุวรรณ ภาณุตระกูล <sup>13</sup> ผศ.ดร.อรสา สุริยาพันธ์ <sup>14</sup> ผศ.ดร.อนุเทพ ภาสุรัส <sup>15</sup> ผศ.นวลศรี เด่นวัฒนา <sup>16</sup> ดร.นิตยา ไชยเนตร <sup>17</sup>
กรรมการ	รศ.ดร.เสรี ชัดแข็ง ผศ.ดร.พิชาญ สว่างวงศ์ ผศ.ดร.สมกิจ จริตควร <sup>18</sup> ผศ.ดร.อุษากิตติ ตันติราบูรักษ์ <sup>19</sup> รศ.ดร.วิทยา เรืองพรวิสุทธิ์ <sup>20</sup> รศ.ดร.วิเชียร มากรตุ้น <sup>21</sup> รศ.ดร.จินتنا จิรดาวยุ <sup>22</sup> รศ.ดร.ดุษฎี อุตਪาพ <sup>23</sup> รศ.ดร.วีไล รังสาดทอง <sup>24</sup> ผศ.ดร.ธรรมศักดิ์ ยืนมิน <sup>25</sup> ดร.ปานหนัน เวิงสำราญ <sup>26</sup> ดร.สุรพล ภัทราชร <sup>27</sup>
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	ผศ.จักรพันธ์ ถาวรธิรา <sup>28</sup> ดร.อโนชา สุขสมบูรณ์ <sup>29</sup>
กองบรรณาธิการ	ดร.อาดูลย์ มีพูล <sup>30</sup> ดร.พรเพ็ญ อาทรสิกิจวัฒน์ <sup>31</sup> ดร.อารีรักษ์ ชัยวร <sup>32</sup> อาจารย์กันทิมา อ่อนละอ้อ <sup>33</sup> อาจารย์อธิตา อ่อนอี้อ่อน <sup>34</sup> อาจารย์ประจักษ์ จิตเงินมะดัน <sup>35</sup> นางรังสินما สุตตรอนันต์ <sup>36</sup>
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ
ทุนอุดหนุน	ฉบับที่ 1 (มกราคม-มิถุนายน) ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม-ธันวาคม)
การเผยแพร่	ได้รับทุนอุดหนุนจากบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พิมพ์ที่	แจกฟรีให้กับสถาบันการศึกษาต่างๆ ในประเทศไทย และผู้ที่สนใจ ชลบุรีการพิมพ์ โทร. 0-3827-4991, 0-3828-2370 โทรสาร. 0-3827-2732

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ด้วยเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบcarbon nano tube ในทิวบ์-ไคโตซานเร่งปฏิกิริยาดักชันของออกซิเจนด้วยแลคเคส

Development of a Biosensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite for Laccase-Catalyzed Oxygen Reduction

ยุวกร เสนศรี<sup>1</sup> เสนอ ชัยรัมย์<sup>1</sup> ดวงใจ นาคะบรีชา<sup>2,3</sup> และ มะลิวรรณ ออมตองไซ<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>3</sup>ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Yuwakorn Sensri<sup>1</sup>, Sanoe Chairam<sup>1</sup>, Duangjai Nacapricha<sup>2,3</sup> and Maliwan Amatatongchai<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University.

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University.

<sup>3</sup>Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs)

บทคัดย่อ

วัสดุเชิงประกลบcarbon nano tube ในทิวบ์-ไคโตซานเป็นเมทริกซ์ที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพเนื่องจากมีความเสถียรสูง สามารถเข้ากับสารชีวโมเลกุลและนำไฟฟ้าได้ดี งานวิจัยนี้เสนอการพัฒนาสภาพไวและความจำเพาะเฉพาะของของไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปฏิกิริยาดักชันของออกซิเจน โดยการตึงเอนไซม์แลคเคสในฟลั่มของวัสดุเชิงประกลบcarbon nano tube ในทิวบ์-ไคโตซาน เอ็นไซม์แลคเคสถูกตรึงบนพื้นผิวของข้าวไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนบนวัสดุเชิงประกลบของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน และสารละลายใบวินเชรัมอัลบูมิน ทำให้สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจดักชันของออกซิเจน ได้ศึกษาปฏิกิริยาดักชันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลเทมเมทรี ในสารละลายซิเทրตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 ไมลาร์ พีเอช 5.0 ที่ใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เก็บอนุน โดยใช้ข้าวไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นข้าวไฟฟ้าทำงาน ข้าวไฟฟ้าชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรต์เป็นข้าวไฟฟ้าอ้างอิง และแพลทินัมเป็นข้าวไฟฟ้าช่วย พบว่า ออกซิเจนเกิดรีดักชันที่ศักยไฟฟ้า -0.35 โวลต์ (เมื่อเทียบกับ Ag/AgCl) นอกจากนี้ได้ศึกษาความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ที่ได้พัฒนาขึ้น

คำสำคัญ : แลคเคส ไคโตซาน คาร์บอนนาโนทิวบ์ ออกซิเจนรีดักชัน

\*Corresponding author. E-mail: scmaliam@ubu.ac.th, m\_amatatongchai@yahoo.com

## Abstract

The carbon nanotubes-chitosan (CNT-CS) composite provides a suitable biosensing matrix due to its high stability, good biocompatibility, and good conductivity. Development of a sensitive and selective biosensor was proposed by entrapping laccase enzyme into the composite film for detection of oxygen reduction. The nano-composite of CNT-CS could be conveniently cast on the glassy carbon (GC) electrode surfaces. With the aid of the CNT-CS composite and bovine serum albumin (BSA), laccase was then immobilized on the nanostructure film to form an oxygen sensor. Electrochemical reduction of oxygen was studied at the developed biosensor using cyclic voltammetry (CV). The GC/CNT-CS/laccase/BSA electrode was used as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode. Cyclic voltammograms of oxygen were measured in a 0.1 M citrate buffer pH 5.0. The reduction wave was observed at -0.35 V (Vs Ag/AgCl). The stability was also studied.

**Keywords :** laccase, chitosan, carbon nanotubes, oxygen reduction

## บทนำ

ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) เป็นอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างเฉพาะเจาะจง และใช้ ตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลากหลายชนิด โดยทั่วไปไบโอเซนเซอร์ ประกอบด้วยอุปกรณ์ 2 ส่วนคือตัวแปลงสัญญาณ และสารชีวภาพ ความจำเพาะของไบโอเซนเซอร์เป็นผลมาจากการจำเพาะ ของไบโอเรซเฟเตอร์ ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyze) กับไบโอเรซเฟเตอร์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพและ/หรือทางเคมี เช่น การผลิต ไอออน, อิเล็กตรอน, แก๊สและความร้อน, เกิดการเปลี่ยนแปลง มวล หรือสมบัติของสีหรือแสง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถ ตรวจวัดได้ด้วยตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการลดขั้นตอนที่ยุ่งยากและสารเคมีที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ (สถาปัตย์ กลุ่มจันทร์, 2001; Rasooly et al., 2009)

carbon nanotubes) มีโครงสร้าง ประกอบด้วยคาร์บอนชนิด  $sp^2$  เชื่อมต่อกันในลักษณะเป็นแผ่น ชั้นสามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยัง  $\pi$ -electron ได้ มีสมบัติคล้าย แท่งโลหะ สารกึ่งตัวนำ และตัวนำยิ่งยวด (Iijima, et al., 1993; Gong, et al., 2005; Popov, 2004) สามารถนำไฟฟ้าได้ดี มีพื้นที่ผิวสูงรวมทั้งทนต่อกรด-เบส และความร้อนสูงได้มาก (Gong, et al., 2005) มีงานวิจัยที่นำ carbons nanotubes ในทิวบ์มาใช้ ในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ โดยช่วยเพิ่มสมบัติในการขนส่ง อิเล็กตรอนและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์แลคเคสในการ เร่งปฏิกิริยาการเกิดรีดักชันของน้ำเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นไบโอ แคร์บอนในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel cell) (Popov, 2004; Kaempgen, et al., 2008; Zheng, et al., 2008; Tan, et al., 2009)

ไคโตซาน (chitosan) เป็นโพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วย หน่วยของดี-กลูโคซามีน [poly (D-glucosamine)] มีสมบัติ ละลายได้ในกรดอินทรีย์และมีประจุเป็นบวก มีความเหนียว ใส สารละลายไคโตซานสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ ไม่เป็นพิษต่อ สิ่งมีชีวิตและย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) จึงมี การนำมาประยุกต์ใช้งานด้านต่างๆ เช่น การเกษตร อาหาร สิ่งทอ การแพทย์ ยา เครื่องสำอาง ใช้ในการจัดการคุณภาพน้ำ (Rinaudo, 2006; Klotzbach, et al., 2006) และยังสามารถนำไปไคโตซาน มาปรับปรุงให้มีสมบัติที่ดีขึ้นโดยการผสมกับวัสดุอื่น เช่น เอ็นไซม์ โดยที่หมู่เยมีนของไคโตซานจะสามารถจับกับหมู่แอลกิลของ เอ็นไซม์ได้ (Rinaudo, 2006) ทำให้สามารถยึดจับเอนไซม์ได้ดี

แลคเคส (laccase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกไซด์รีดักเตส (oxidoreductase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้าย อะตอมไฮโดรเจนหรือออกซิเจน หรืออิเล็กตรอน จากสารประกอบ หนึ่งไปยังสารประกอบอื่น มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลักและมี โลหะคอปเปอร์ 4 อะตอมอยู่ในโครงสร้าง โลหะคอปเปอร์ใน โครงสร้างแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ type-1 (T1) มีคอปเปอร์ 1 อะตอม, type-2 (T2) คอปเปอร์ 1 อะตอม และ type-3 (T3 และ T3') มีคอปเปอร์ 2 อะตอม (Zheng, et al., 2008; Solomon, et al., 1992) กระบวนการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของ ออกซิเจนของเอนไซม์แลคเคสเริ่มขึ้นที่ตำแหน่ง T1 ซึ่งเป็น ตำแหน่ง active site ที่มีการจับกับสารเป้าหมาย เกิดปฏิกิริยา รีดักชันของคอปเปอร์ ที่ตำแหน่ง T1 และส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยัง ตำแหน่ง T2/T3 และออกซิเจนเกิดปฏิกิริยารีดักชันไปเป็นน้ำ (Solomon, et al., 1992) ข้อดีของการใช้เอนไซม์แลคเคส เป็นตัวเร่งที่เหนือกว่าตัวเร่งปฏิกิริยานิทรรย์ ได้แก่ ความจำเพาะ เจาะจง (selectivity) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการถาวรสานั้น สามารถทำซ้ำ (repeatability) ได้ ปฏิกิริยาเกิดได้ภายในตัวสภาวะการทดลอง เช่น พีเอชของ สารละลาย อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง และสามารถ ถ่ายตัวได้ทางชีวภาพ (Stolarczyk, et al., 2008; Fernández-Sánchez, et al., 2002)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไบโอเซนเซอร์ในการ ตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน ที่มีสกปรกไว (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) และความเสถียร (stability) สูง โดยอาศัยการตีระงับเอนไซม์แลคเคสในวัสดุเชิงประกอบของ คาร์บอนในทิวบ์-ไคโตซาน (CNT-CS) ซึ่งเป็นเมทริกซ์ที่มีสมบัติ ที่ดี สามารถนำมาระบบนาไปไบโอเซนเซอร์ได้ คาร์บอนในทิวบ์ ช่วยทำให้สามารถตีระงับเอนไซม์แลคเคสได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น ส่วนไคโตซานซึ่งมีสมบัติที่เข้ากับสารชีวโมเลกุลได้ดี จึงเหมาะสม ที่นำมาใช้งานควบคู่กับเอนไซม์แลคเคส ทำให้สามารถพัฒนา ไบโอเซนเซอร์เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจนและสามารถประยุกต์ใช้ เป็นไบโอแคร์บอนในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### 1. อุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่นำมาใช้ในการตรวจทางเคมีไฟฟ้า ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย เครื่องไฟแทนซ์อสเดก รุ่น EA 161, e-Corder รุ่น 210 (บริษัท eDAQ, Australia) ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า

คือข้าไฟฟ้าทำงาน (working electrode) ชนิดกลาสซีคาร์บอน (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร), ข้าไฟฟ้าอ้างอิงชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรต์ ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) และข้าไฟฟ้าช่วย (auxiliary electrode) ชนิดครุพแพลทินัม (Pt) (บริษัท CH Instruments, USA.) มิเตอร์วัดอัตราการไหลของแก๊ส รุ่น RK 1200 (flow meter, 0-100 มิลลิลิตรต่อนาที, บริษัท Kofloc; Japan)

## 2. สารเคมี

เอนไซม์แลคเคส (Laccase, EC 1.10.3.2) จาก Trametes Versicolor 22.4U/mg (Sigma-Aldrich) ควรบอนนนาในทิวบ์ (Carbon nanotubes; CNT, บริสุทธิ์ 95%), (NanoLab), ไดเมธิลฟอร์มามิโน่ (DMF), (Fluka) ไคลโตชาน (Chitosan; CS, medium molecular weight, 75-85% deacetylated) (Sigma-Aldrich), โภวินชีรัมอัลบูมีน (Bovine Serum Albumin; BSA, non acetylated), (Sigma-Aldrich), ชิเกรตบัฟเฟอร์ เตรียมจากชิติกแอชิตโมโนไซเดตและไธเดียมชิเกรต

## 3. การเตรียมสารเคมี

สารละลายแลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยซึ่งเอนไซม์แลคเคส 4 มิลลิกรัม ใส่ในขวดขนาด 2 มิลลิลิตร ปีเปตสารละลาย 0.1 ไมลาร์ ชิเกรตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด นำสารละลายไปเขย่าด้วย vertex mixer ประมาณ 5 นาที

สารละลายโภวินชีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ปีเปตโภวินชีรัมอัลบูมีนมา 100 ไมลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงจุดด้วยน้ำ

สารละลายควรบอนนาในทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยพัฒนาจากวิธีของ J. Wang และ M. Musameh (Wang & Musameh, 2004) โดยซึ่งควรบอนนาในทิวบ์ 3.0 มิลลิกรัม ใส่ในขวดขนาด 5 มิลลิลิตร ปีเปตสารละลาย ไดเมธิลฟอร์มามายด์ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลายไคลโตชานความเข้มข้น 1% เตรียมโดยพัฒนา จากวิธีของ T. Tangkuaram และคณะ (Tangkuaram, et al., 2007) โดยซึ่งไคลโตชาน 0.10 กรัม ใส่ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ปีเปตกรดอะซิติกความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวด นำไปกวนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สารละลายของวัสดุเชิงประกอบควรบอนนาในทิวบ์-ไคลโตชาน เตรียมโดยปีเปตสารละลายควรบอนนาในทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายไคลโตชานความเข้มข้น 1% มาอย่างละ 500 ไมลิลิตร ใส่ในขวดขนาด 2 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vertex mixer ประมาณ 5 นาที

**หมายเหตุ** น้ำที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารเคมี เป็นน้ำประจุจากไออกอน

## 4. การเตรียมข้าไฟฟ้า

ก่อนนำข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปดัดแปลงเป็นข้าไฟฟ้า ชนิดต่างๆ จะนำข้าไฟฟ้ามาทำความสะอาด โดยขัดผิวน้ำของข้าไฟฟ้าด้วยผงอะลูมิเนียมกับผ้าสักหลาด โดยใช้ผงอะลูมิเนียมขนาด 1.0, 0.3 และ 0.05 ไมครอน ตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำก้อน นำไป sonicate ในน้ำเป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

### 4.1 ข้าไฟฟ้า GC/laccase

หยดสารละลายเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมลิลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยเอนไซม์แลคเคส (GC/laccase)

### 4.2 ข้าไฟฟ้า GC/CNT

หยดสารละลายการ์บอนนาในทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร บนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมลิลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้า ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยการ์บอนนาในทิวบ์ (GC/CNT)

### 4.3 ข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS

หยดสารละลายของวัสดุเชิงประกอบควรบอนนาในทิวบ์-ไคลโตชาน บนข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมลิลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ข้าไฟฟ้า ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยวัสดุเชิงประกอบควรบอนนาในทิวบ์-ไคลโตชาน (GC/CNT-CS)

## 5. การตรวจเอนไซม์แลคเคสและสารละลายโภวินชีรัมอัลบูมีน บนข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS

นำข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 4.3 มาตรึง เอ็นไซม์โดยการหยดเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมลิลิตรทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และหยดสารละลายโภวินชีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 ไมลิลิตร ทึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยวัสดุเชิงประกอบควรบอนนาในทิวบ์-ไคลโตชาน เอ็นไซม์แลคเคส และโภวินชีรัมอัลบูมีน (GC/CNT-CS/laccase/BSA)

## 6. การตรวจวัดปริมาณออกซิเจน

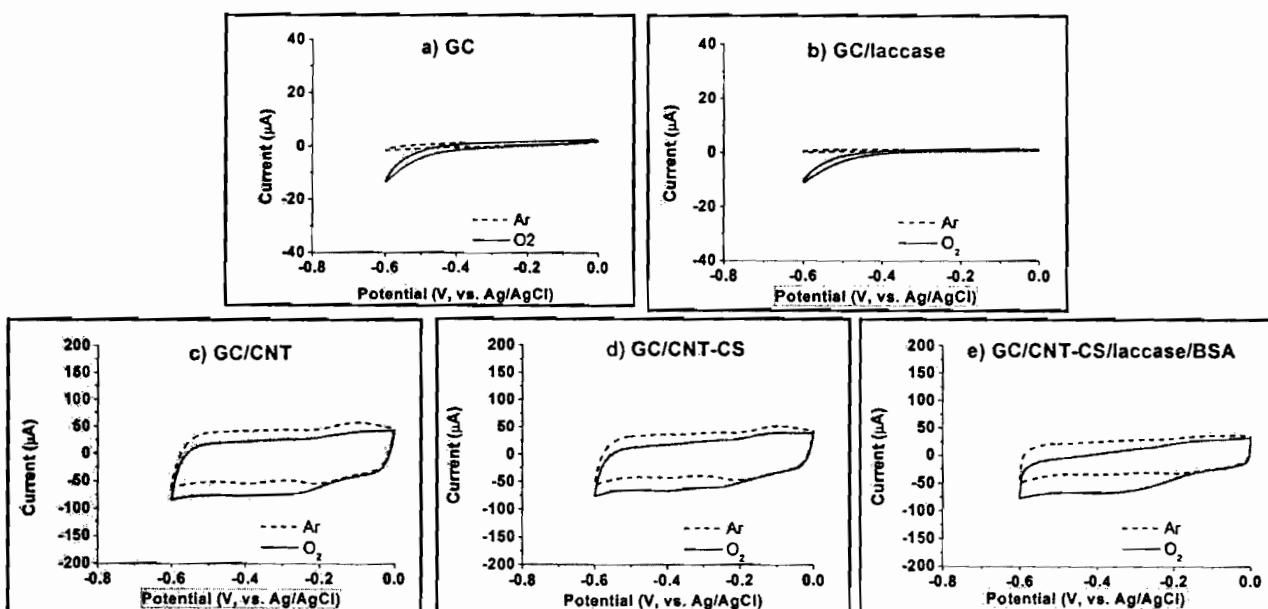
ศึกษาปฏิกิริยาตักขันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิก ไวแทลเมทรี (cyclic voltmetry) โดยใช้เครื่องโพเทนชิโอดีฟ และระบบ 3 ข้าไฟฟ้า ใช้ข้าไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) หรือ ข้าไฟฟ้าโอลเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมา เป็นข้าไฟฟ้าทำงาน โดยการให้

ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0.0 ถึง -0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ให้แก่ ขั้วไฟฟ้าทำงาน ในสารละลายน้ำของซิเทրดบัพเพอร์ความเข้มข้น 0.1 มอลาร์ พีเอช 5.0 บริมานตร 10 มิลลิลิตร

การทดลองในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน จะนำสารละลายน้ำของซิเทรดบัพเพอร์บริมานตร 10 มิลลิลิตรที่อิ่มตัวด้วยแก๊สออกซิเจน (Ar) มาทำการวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวโนแอมเปรเมทริกภายใต้บรรยากาศแก๊สออกซิเจน ส่วนในสภาวะที่มีออกซิเจนจะนำสารละลายน้ำของซิเทรดบัพเพอร์บริมานตร 10 มิลลิลิตร ที่อิ่มตัวด้วยแก๊สออกซิเจน มาทำการทดลองภายใต้อัตราการไหลของออกซิเจน 40 มิลลิลิตรต่อนาที

### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล การศึกษาห้องคปประกอบที่เหมาะสมของไบโอดีเซนเซอร์

การศึกษาห้องคปประกอบที่เหมาะสมของไบโอดีเซนเซอร์ โดยใช้แลคเคนในการทำให้ dioxygen ( $O_2$ ) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ ( $H_2O$ ) จะศึกษาการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้าห้องคป 5 ชนิด (a-e) ได้แก่ a: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC), b: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยสารละลายน้ำไขมันแลคเคน (GC/laccase), c: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยสารละลายน้ำไขมันในพิวน์ (GC/CNT), d: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนพิวน์-ไคโตชาแนล (GC/CNT-CS) และ e: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนพิวน์-ไคโตชาแนล เอนไขมันแลคเคน และไบวินซีรัมอัลบูมีน (GC/CNT-CS/laccase/ BSA) ผลการทดลองดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ไซคลิกโวโนแอมเพรมของ (a) ขั้วไฟฟ้า GC ในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน (เส้นขาว) และในสภาวะที่มีออกซิเจน (เส้นเทา), (b) ขั้วไฟฟ้า GC/laccase, (c) ขั้วไฟฟ้า GC/CNT, (d) ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS และ (e) ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ในสารละลายน้ำของซิเทรดบัพเพอร์ความเข้มข้น 0.1 มอลาร์ พีเอช 5.0 (อัตราการไหลของออกซิเจนหนึ่งสารละลายน้ำเป็น 40 มิลลิลิตรต่อนาที)

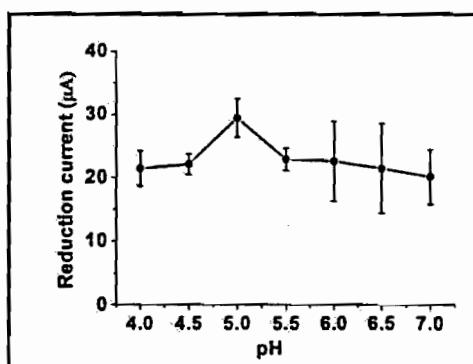
พบว่าปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจนเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าสูงกว่า -0.6 V เมื่อใช้ GC และ GC/laccase เป็นขั้วไฟฟ้า แต่เมื่อใช้ขั้ว GC/CNT, ขั้ว GC/CNT-CS และ ขั้ว GC/CNT-CS/laccase/BSA เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานปฏิกิริยาเรดักชันเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.3 ถึง -0.4 V จากผลการทดลอง (ภาพที่ 1 c, d และ e) พบว่าค่ากระแสพื้น (background current; B) ของขั้วไฟฟ้า

GC/CNT สูงที่สุดตามด้วย GC/CNT-CS และขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ตามลำดับ เมื่อพิจารณาที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA พบว่าให้สัญญาณ (Signal; S) จากค่ากระแสเรดักชันของออกซิเจนมีlobด้วยค่ากระแสพื้น (S/B) ที่มีค่ามากที่สุด และคงว่ามีสภาพไวสูงที่สุด และให้ค่าศักย์ที่ยอดพีค (Ep) ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 V แสดงว่าปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจน

ถูกเร่งด้วยประสิทธิภาพสูงที่สุด หันนี้เนื่องจากสมบัติของการบอนนาโนทิวบ์ที่มีพื้นที่ผิวสูงและนำไฟฟ้าได้ดี และสมบัติที่เข้ากันได้ดีกับสารชีวภาพของไคโടิชานจึงทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ได้ดี และส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ อีกทั้งยังสนับสนุนด้วยใบวินชีรันอัลบูมีนที่ช่วยให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานมากขึ้น ส่งผลให้ค่ากระแสเพิ่มมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่เตรียมได้มีลักษณะทางกายภาพที่เสถียร คือเมื่อถังด้วยน้ำกลั่นก่อนทำการวัดจะไม่ทำให้เกิดการหลุดร่อนของสารละลายที่นำมาตัดแต่งที่ผิวน้ำของข้าวไฟฟ้า

การศึกษาหาพิสัยของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบ浑ุนที่เหมาะสม

ข้าวไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA จะถูกนำไปตรวจด้วยปฏิกิริยาเรตักชันของออกซิเจนในสารละลายซิเทրบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 มอลาร์ ที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ ผลการทดลองดังภาพที่ 2 ค่ากระแสเพิ่มขึ้นในรูปเป็นค่าเฉลี่ยจาก ข้าวไฟฟ้าที่เตรียมขึ้น 3 ข้าวไฟฟ้า ส่วนแทนความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวัด



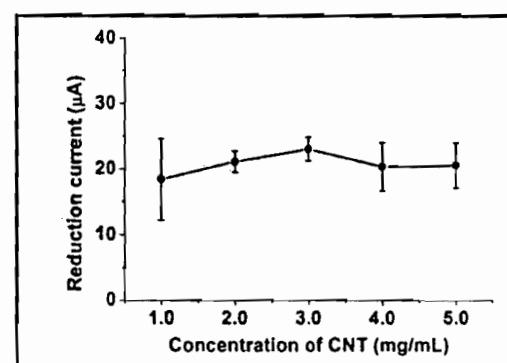
ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรตักชันของออกซิเจน กับค่าพีเอช ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ 0.1 มอลาร์ ซิเทรบัฟเฟอร์

พบว่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่พีเอช 5.0 ให้ค่ากระแสสูงที่สุด และพบว่า เอนไซม์แลคเคสทำงานได้ดีในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ พีเอช 5.0 สอดคล้องกับผลการทดลองของ B. Haghghi (Haghghi, et al., 2003) และ M. Portaccio (Portaccio, et al., 2006) ซึ่งใช้เอนไซม์แลคเคสในการพัฒนาไปโอลเซนเซอร์สำหรับด้วยการประกลบพีโนลิก (phenolic compounds) และพบว่าเอนไซม์แลคเคสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.0

เมื่อเพิ่มพีเอชของสารละลายให้สูงขึ้นค่ากระแสเพิ่มลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ S. K. Lee และคณะ และ R. Santucci และคณะ (Lee et al., 2002; Santucci et al., 1998) ซึ่งพบว่า ในขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยาเรตักชันของออกซิเจนไปเป็นน้ำของแลคเคส การเกิดเรตักชันของออกซิเจนที่ตำแหน่ง T2 และ T3 ไช้ตระกูลและไซยาโนสามารถยับยั้งการเข้าไปจับของออกซิเจน กับคอเปอร์ที่ตำแหน่ง T2 และ T3 ของเอนไซม์แลคเคสได้ ทำให้แลคเคสสูญเสียสมบัติการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ค่ากระแสจึงลดลง เมื่อพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกพีเอช 5.0 เป็นพีเอชของสารละลาย อิเล็กโทรไลต์เกือบ浑ุนที่เหมาะสม การศึกษาปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสมในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบควรบอนนาโนทิวบ์-ไคโடิชานคอมโพสิต

ในการศึกษาหาระยะห่างของออกซิเจนในทิวบ์ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบควรบอนนาโนทิวบ์-ไคโtodian จึงเตรียมไปโอลเซนเซอร์ GC/CNT-CS/laccase/BSA โดยใช้สารละลายของควรบอนนาโนทิวบ์ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไคโโดชานความเข้มข้น 1.0% ผลของการปริมาณควรบอนนาโนทิวบ์ต่อการตรวจด้วยปฏิกิริยาเรตักชันของออกซิเจนแสดงดังภาพที่ 3

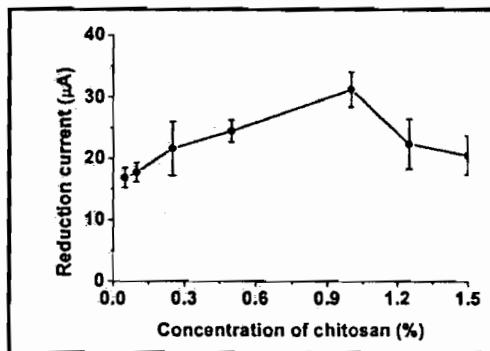


ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรตักชันของออกซิเจนกับความเข้มข้นของควรบอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกลบควรบอนนาโนทิวบ์-ไคโโดชาน

จากการทดลอง เมื่อปริมาณของควรบอนนาโนทิวบ์เพิ่มขึ้นจาก 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่ากระแสเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการบอนนาโนทิวบ์ซึ่งเป็นสารที่มีพื้นที่ผิวสูงและมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี เมื่อมีปริมาณของ

การบอนนานในทิวบ์มากขึ้นจึงทำให้สามารถตระเรียงเอนไซม์ได้มากขึ้น ค่ากราฟที่ได้จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าปริมาณของการบอนนานในทิวบ์ มีมากเกินไปกลับทำให้ค่ากราฟลดลง ซึ่งเป็นผลจากการนำไฟฟ้า ได้ดีของสารบอนนานในทิวบ์ ทำให้ค่ากราฟแพลง (background; B) มีขนาดใหญ่ขึ้น สัญญาณ (Signal; S) จากค่ากราฟเสรีดักชันของ ออกซิเจนเมื่อลบด้วยค่ากราฟแพลง (S/B) จึงมีค่าลดลง ดังนั้นจึง เลือกปริมาณการบอนนานในทิวบ์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ค่า กราฟที่สูงที่สุดใช้ในการทดลองต่อไป การศึกษาปริมาณไคโตชาณที่เหมาะสมในเมทริกซ์ของวัสดุเชิง ประกอบการบอนนานในทิวบ์-ไคโตชาณคอมโพสิต

ในการศึกษาหาปริมาณของไคโตชาณที่เหมาะสมใน เมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบการบอนนานในทิวบ์-ไคโตชาณ ใช้ปริมาณของไคโตชาณเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.25 และ 1.5% ในการบอนนานในทิวบ์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4

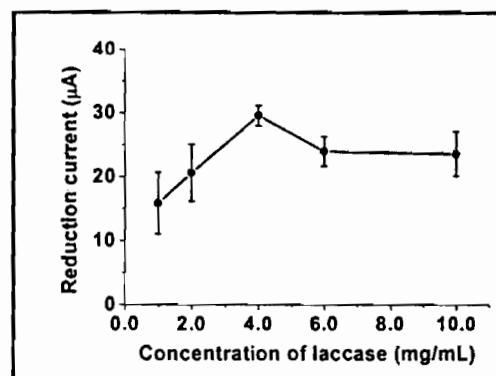


ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากราฟจากปฏิกิริยาเรดักชัน ของออกซิเจน กับความเข้มข้นของไคโตชาณในเมทริกซ์ ของวัสดุเชิงประกอบการบอนนานในทิวบ์-ไคโตชาณ

พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไคโตชาณเพิ่มมากขึ้นค่า กราฟที่ได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากสมบัติที่เข้ากันได้ดีของไคโตชาณ กับสารชีวภาพ จึงช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แลคเคลส ค่ากราฟที่ได้จึงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นมากกว่า 1.0% พบว่าค่ากราฟเริ่มลดลง เนื่องจากถ้ามีปริมาณไคโตชาณมากขึ้น จะมีความหนืดเพิ่มขึ้นและมีความสามารถในการนำไฟฟ้าลดลง ปริมาณไคโตชาณที่มากขึ้นกว่า 1.0% ทำให้ประสิทธิภาพในการ ทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงเลือก 1.0% ไคโตชาณซึ่งให้ค่า กราฟที่สูงที่สุดเป็นค่าที่เหมาะสม การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์แลคเคลส

เมื่อได้อัตราส่วนของเมทริกซ์วัสดุเชิงประกอบการบอน

นในทิวบ์-ไคโตชาณที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการศึกษาผลของปริมาณ เอนไซม์แลคเคลส ความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 5



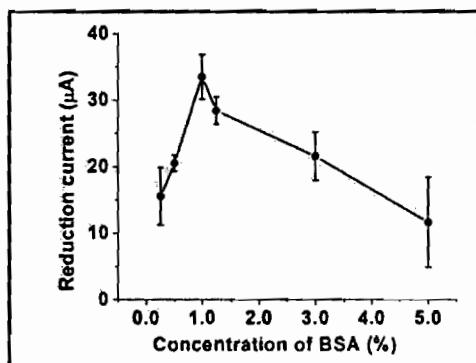
ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากราฟจากปฏิกิริยาเรดักชัน ของออกซิเจน กับความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคลสที่ใช้ ในการเตรียมข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA

จากการทดลองในภาพที่ 5 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ เอนไซม์แลคเคลสจาก 1-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ค่ากราฟ เรดักชันของออกซิเจนที่สูงขึ้น เนื่องจากปริมาณเอนไซม์สูงขึ้น ช่วยเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น จึงเพิ่มความสามารถในการตรวจสูงขึ้น ค่ากราฟที่ได้จึงสูงขึ้น โดยปริมาณเอนไซม์ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่ากราฟที่มากที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ สูงขึ้นมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่ากราฟจะได้น้อยลง ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องจากพื้นที่ผิวในการตระเรียงเอนไซม์แลคเคลสในเมทริกซ์ วัสดุเชิงประกอบมีปริมาณจำกัด ดังนั้นปริมาณที่เติมมากเกินพอก ของเอนไซม์แลคเคลสจึงไม่มีผลต่อค่ากราฟ หรืออาจเกิดเนื่องมาจากการ ปริมาณเอนไซม์ที่เติมเพิ่มมากเกินพอก ส่งผลให้เกิดการตันทาง การถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ แลคเคลสที่ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการทดลองต่อไป การศึกษาผลของปริมาณสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีน

การศึกษาปริมาณสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีน จะใช้ ความเข้มข้นของสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีน 0.25, 0.5, 1.0, 1.25, 3 และ 5% ผลของปริมาณสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีนต่อข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ต่อค่ากราฟเรดักชันของออกซิเจน แสดงดังภาพที่ 6

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายใบวีนชีรัมอัลบูมีน จาก 0.25 จนถึง 1.0% จะได้ค่ากราฟที่เพิ่มขึ้น (เพิ่มขึ้นจากเดิมถึง ประมาณ 120%) โดยค่าความเข้มข้นที่ 1.0% ให้ค่ากราฟสูงที่สุด

แสดงว่าสารละลายในบีวีซีรัมอัลบูมีนมีส่วนช่วยในการทำงานของเอนไซม์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ J. Kulys (*Kulys et al. 2002*) ซึ่งใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methyl syringates และพบว่าในบีวีซีรัมอัลบูมีนสามารถป้องกันการเกิด inactivation ของเอนไซม์แอลกอฮอล์



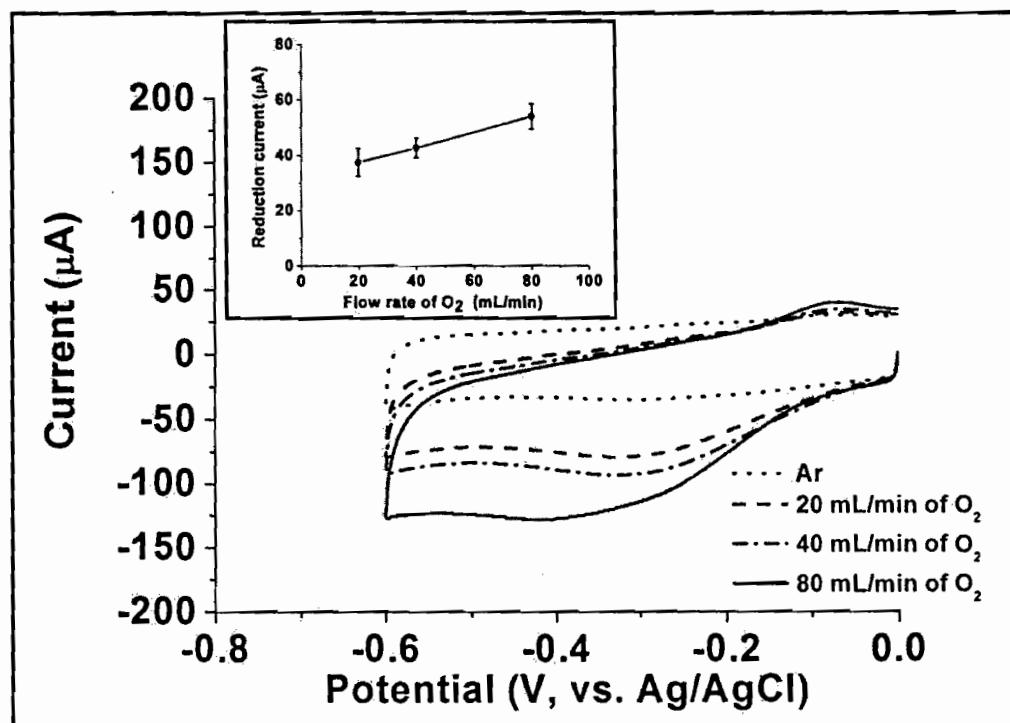
ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจนกับความเข้มข้นของสารละลายในบีวีซีรัมอัลบูมีนที่ใช้ในการเตรียมไปโอลเซนเซอร์

จากการทดลองเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากกว่า 1.0% ค่ากระแสที่ได้กลับลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากปริมาณของ

ในบีวีซีรัมอัลบูมีนที่มีมากเกินไปทำให้เกิดการขัดขวางการถ่ายเท อิเล็กตรอนได้ ค่ากระแสเหล่านี้ได้จึงลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1% ในบีวีซีรัมอัลบูมีนในการดัดแปลงข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ต่อปริมาณแก๊สออกซิเจน

จากการทดลองในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าองค์ประกอบต่างๆ ที่เหมาะสมในการเตรียมข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA คือใช้สารละลายของคริบอนนาโนทิวป์ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1.0% นำมาหยดบนข้าไฟฟ้ากลาสเซียร์บอน 20 ไมโครลิตร ทึ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาตึงเงินไขมีโดยการหยด เอนไซม์แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทึ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และหยดสารละลายในบีวีซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทึ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA

เมื่อนำข้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA มาศึกษา การตอบสนองต่อปริมาณแก๊สออกซิเจน โดยในการทดลองจะควบคุมอัตราการไหลของออกซิเจนเหนือระดับสารละลายที่ 20, 40 และ 80 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาเรดักชันของออกซิเจนกับอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจน

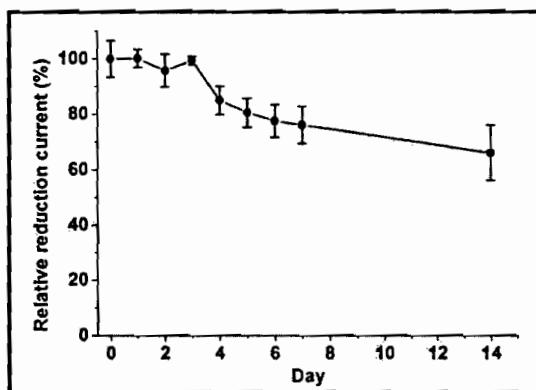
ค่ากระแทกชันของออกซิเจนจะสัมพันธ์กับอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นแบบเป็นเส้นตรง ( $r^2 = 0.9996$ , ค่าความชันของสมการเส้นตรงเป็น 0.279) ที่ชี้ว่าของอัตราการไหลที่ทำการทดลอง 20-80 มิลลิลิตรต่อนาที ค่ากระแทกที่ได้จากการวัดช้าๆ มีความเที่ยง (precision) ดีมากคือให้ค่า %RSD เท่ากับ 3.89 ( $n = 5$ )

ผลการทดลองจากเทคนิคไซคลิกโโนแหนเมนทรีแสดงให้เห็นว่า ช้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่พัฒนาขึ้นตอบสนองต่อปริมาณออกซิเจน สามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจนและอาจจะนำมาระบุกต์ให้เป็นตัวตรวจวัดในการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนในระบบที่มีการไหลด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรมทรี เพื่อพัฒนาให้เป็นระบบวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สะดวก รวดเร็ว และใช้สารบริ�านน้อย ต่อไป

#### ศึกษาความเสถียรของใบโอเซนเชอร์

ศึกษาความเสถียรของช้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA โดยการเตรียมช้าไฟฟ้า 3 ช้า และนำมาระดับค่ากระแทกจากปฏิกริยา ริดชันของออกซิเจน หลังจากเตรียมช้าไฟฟ้าไว้เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 14 วัน

จากภาพที่ 8 พบว่าช้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA มีความเสถียร โดยค่ากระแทกชันของออกซิเจนที่ได้จากการวัด เมื่อเตรียมได้ใหม่ๆ หลังจากเตรียมใบโอเซนเชอร์ไว้ 1, 2 และ 3 วัน มีค่าที่ค่อนข้างคงที่และใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้น (~100%) และเริ่มลดลงเมื่อวัดในวันที่ 4 โดยวัดค่ากระแทกได้ประมาณ 85% และเมื่อทิ้งไว้ 7 วันค่ากระแทกลดลงเหลือประมาณ 76% และลดลงเหลือประมาณ 70% เมื่อทิ้งไว้ 14 วัน



ภาพที่ 8 ความเสถียรของช้าไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่ระยะเวลาต่างๆ ในการเก็บรักษา (เก็บที่อุณหภูมิ 4°C)

เมื่อเปรียบเทียบกับความเสถียรของช้าไฟฟ้า จากงานวิจัยของ H. L. Pang (Pang, et al., 2010) ชึ้นศึกษาช้าไฟฟ้า 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 กลาสซีكار์บอนที่ดัดแปลงสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์และเอนไซม์แลคเคนส์ (GC/CNT/laccase) และช้าไฟฟ้าชนิดที่ 2 ช้าไฟฟ้ากลาสซีكار์บอนที่ดัดแปลงสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีหมุนฟังก์ชันเป็น 1-aminopyrene (CNT-AP) และนำมาตรึงเอนไซม์แลคเคนส์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวช่วย (GC/CNT-AP/laccase) ซึ่งพบว่าเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน ค่ากระแทกที่ได้จากการวัดช้าไฟฟ้าชนิดที่ 1 จะลดลงเหลือประมาณ 69.3% และในช้าไฟฟ้าชนิดที่ 2 เหลือประมาณ 85.3% ช้าไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ซึ่งต้องเอนไซม์ในเมทริกของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณที่มีเบนซีรัมอัลบูมีนจึงมีความเสถียรดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงเอนไซม์ในคาร์บอนนาโนทิวบ์ (ช้าไฟฟ้าชนิดที่ 1 GC/CNT/laccase) และมีความเสถียรน้อยกว่าช้าไฟฟ้าชนิดที่ 2 (GC/CNT-AP/laccase) เล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบวิธีการในการเตรียมช้าไฟฟ้าซึ่งในช้าไฟฟ้าชนิดที่ 2 ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมคาร์บอนนาโนทิวบ์ให้มีหมุนฟังก์ชันเป็น 1-aminopyrene (CNT-AP) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน ช้าไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสะดวก และง่ายในการเตรียมมากกว่า

ช้าไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรดี สามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจน และอาจจะนำมาระบุกต์ให้เป็นใบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้

#### สรุปผลการวิจัย

ใบโอเซนเชอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยการตรึงเอนไซม์แลคเคนส์ ไว้ในเมทริกของวัสดุซึ่งประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณ ทำให้ได้ใบโอเซนเชอร์ที่มีสภาพไว มีความจำเพาะเจาะจง และมีความเสถียรที่ดี เนื่องจากวัสดุซึ่งประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณมีความสามารถเข้ากับสารชีวโมเลกุล (biocompatibility) สามารถซ่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการตรึงเอนไซม์ให้สูงขึ้น และนำไฟฟ้าได้ดี เอนไซม์แลคเคนส์ถูกครึ่งที่พื้นผิวของช้าไฟฟ้า ชนิดกลาสซีكار์บอนบนวัสดุซึ่งประกอบของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตชาณและสารละลายใบวีนซีรัมอัลบูมีน ทำให้สามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจน และอาจจะสามารถนำมาระบุกต์ให้เป็นใบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันแห่งชาติ, สำนักงบประมาณผ่านดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยและทุนการศึกษา

## เอกสารอ้างอิง

- ไสภา กลินจันทร์. (2001) ใบโอเซนเซอร์กับการประยุกต์ใช้. *The Journal of KMITNB.*, 11, 62-64.
- Fernández-Sánchez, C., Tzanov T., Gübitz, G. M., & Paulo, A. C. (2002). Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. *Bioelectrochemistry*, 58, 149-156.
- Gong, K., Yan, Y., Zhang, M., Su, L., Xiong, S., & Mao, L. (2005). Electrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: A review. *Analytical Sciences*, 21, 1383-1393.
- Haghghi, B., Gorton, L., Ruzgas, T. & Jonsson, L.J. (2003). Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Tamestes vesicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 487, 3-14.
- Iijima, S., & Ichihashi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 363, 603-605.
- Kaempgen, M., Lebert, M., Roth, S., Soehn, M., & Nicoloso, N. (2008). Fuel cells based on multifunctional carbon nanotube networks. *Journal of Power Sources*, 180, 755-759.
- Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., & Minteer, S. D. (2006). Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization. *Journal of Membrane Science*, 282, 276-283.
- Kulys, J., Krikstopaitis, K., Ziemys, Arturas., & Schneider, P. (2002). Laccase-catalyzed oxidation of syringates in presence of albumins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatics*, 18, 99-108.
- Lee, S. K., George, S. D., Antholine, W. E., Hedman, B., Hodgson, K. O., & Solomon, E. I. (2002). Nature of the intermediate formed in the reduction of  $O_2$  to  $H_2O$  at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of American Chemical Society*, 124, 6180-6193.
- Pang, H. L., Liu, J., Hu, D., Zhang, X.H., & Chen J.H. (2010). Immobilization of laccase onto 1-aminopyrene functionalized carbon nanotubes and their electrocatalytic activity for oxygen reduction. *Electrochimica Acta*, 55, 6611-6616.
- Popov, V.N., (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 43, 61-102.
- Portaccio, M., Di Martino, S., Durante, D., De Luca, P., Lepore, M., Bencivenga, U., Rossi, S., De Maio, A., & Mita, D.G. (2006). Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41, 97-102.
- Rasooly, A. & Herold, K. E. (Eds) (2009). Biosensors and biodetection methods and protocols, (pp.v-ix), New York, Humana Press.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Santucci, R., Ferri, T., Morpurgo, L., Savini, I., & Avigliano, L. (1998). Unmediated heterogenous electron transfer reaction of ascorbate oxidase and laccase at gold electrode. *Biochemistry Journal*, 332, 611-615.
- Solomon, E. I., Baldwin, M. J., & Lowery, M. D. (1992). Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity, *Chemical Reviews*, 92, 521-542.
- Stolarczyk, K., Nazaruk, E., Rogalski, J., & Bilewicz, R. (2008). Nanostructured carbon electrodes for laccase-catalyzed oxygen reduction without added mediators. *Electrochimica Acta*, 53, 3983-3990.

- Tan, Y., Deng, W., Ge, B., Xie, Q., Huang, J., & Yao, S. (2009). Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2225-2231.
- Tangkuaram, T., Wang, J., Rodriguez, M. C., Laocharoensuk, R., & Veerasai, W. (2007). Highly stable amplified low-potential electrocatalytic detection of NAD<sup>+</sup> at azure-chitosan modified carbon electrodes. *Sensors and Actuators B*, 30, 277-281.
- Wang, J. & Musameh, M. (2004). Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified-electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 511, 33-36.
- Zheng, W., Zhou, H.M., Zheng, Y.F., & Wang, N. (2008). A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell. *Chemical Physics Letters*, 457, 381-385.

## Editors-in-Chief's

- Assefa M. Mellesse (Bermuda Sensors)
- Florida International University, USA
- W. Rudolf Seitz (Chemical Sensors)
- University of New Hampshire, USA
- Alexander Star (Biosensors)
- University of Pittsburgh, USA
- Tim Wark (Sensor Networks)
- CSIRO ICT Centre, Australia

## Editorial Board

**Biosensors:** Rezaul K. Beg, Loïc J. Blum, Patricia A. Brodenick, Geun Sig Cha, Yé Fang, Miklos Gratzl, Martin Hegner, Kuo Chuan Ho, I-Ming Hsing, Nicole Jaffrezic-Renault, Raz Jelinek, Huangxian Ju, Evgeny Katz, Michael Keusgen, Laszlo B. Kish, Heinz-Bernhard Kraatz, Laura Tatsuo Kubota, Paul E. Laibinis, George G. Malliaras, Mike McShane, Igor Medintz, Chad A. Mirkin, Jay Nadeau, Robert O'Neill, D. Marshall Porterfield, Stephen Quate, Michael W. Reitsky, Helmut Ringsdorf, Judith Rishpon, S. Scott Saavedra, Michael J. Schinding, Joseph Wang, Bayden Wood and Luigi Zeni.  
**Chemical Sensors:** Milan M. Antonijevic, Patricia A. Brodenick, Gary D. Christian, Richard G. Compton, Peter J. Cragg, Robert F. Curl, Reza Dabestani, Dermot Dabestani, Franz Dickerl, J. Justin Gooding, Vindu K. Gupta, Peter C. Hauser, Martin Hegner, D. Brynn Hibbert, Clifford K. Ho, Nicole Jaffrezic Renault, Evgeny Katz, Ki-Hyun Kim, René Kizek, Spas D. Kolev, Heinz-Bernhard Kraatz, Jan Labuda, Vladimir M. Mirsky, Ralf-J. Moos, Vlادимиро Papangelakis, Wenfeng Peng, Gary R. Pickrell, Yoon-Bo Shim, Ursula E. Spicher-Keller, Leonid I. Trakhenberg, Yoshiro Umezawa, Joseph Wang, Bayden Wood, Tatsuo Yoshinobu, Xueji Zhang and Da-Ming Zhu.

**Physical Sensors:** Khalil Arshak, Bihong Chen, Brunetto Giovanni Brunetti, Edoardo Charbon, Caterina Ciminielli, Melanie W. Cole, Philippe Fauchet, Peter C. Hauser, Martin Hegner, Wilmar Hernandez, Didier Keymeulen, Stefano Marani, Roland Moser, Bradley Nelson, Claude Nicollier, Gonzalo Pajares Martínsanz, Luca Pezzati, Gary R. Pickrell, Markus W. Signst, Mahlyn Smith, Andras Z. Szeni, Manuela Vieira, Xile Wang and Feng Xia; **Remote Sensors:** Michael A. Chapman, Ge Chen, James H. Chumsdie, Jiang Dong, Jason K. Levy, Jonathan Li, Claude Nicollier, Radislav A. Potyrailo, Dale A. Quattrochi, Daniele Riccio Raad A. Saleh, Alastair M. S. Smith, C. Neal Stewart Jr., Cheila Kara S. Subramanian, Hans Timmerman, Wolfgang Wagner, Toby N. Carlson and Qihao Weng.  
**Sensor Networks:** Mohamed F. Younis, Feng Xia, Ana M. Bernardo and Boon-Chong Seet

# Sensors

## Call for Papers

www.mdpi.com

### Facts about this MDPI Community [1]

#### Open Access Journal

- 70 staff at your disposal
- 4,000 academic editors
- 15,000 articles published
- 26,000 most alert subscribers
- 60,000 unique authors
- 150,000 academic peer-reviewers
- 600,000 monthly PDF views
- 2,400,000 monthly abstract views

MDPI AG

Postfach

CH-4005 Basel

Switzerland

Tel. +41 61 683 7734  
Fax +41 61 302 8918

Sensors is an independent open access journal published by MDPI

[www.mdpi.com](http://www.mdpi.com)

See [www.mdpi.com/about/contact/](http://www.mdpi.com/about/contact/) for a full list of offices and contact information. MDPI AG is a company registered in Basel, Switzerland, No. CH-270.3.014.343, whose registered office is at Kandererstrasse 25, CH-4057 Basel, Switzerland.



## Call for Papers

Dear Colleagues,

You are invited to contribute a long research article or a comprehensive review for consideration and publication in *Sensors* (ISSN 1424-8220). *Sensors* is the leading international, peer-reviewed open access journal on the science and technology of sensors and biosensors.

*Sensors* is covered by leading indexing services, including the Science Citation Index Expanded (Web of Science), Chemical Abstracts, INSPEC, Scopus and CAB Abstracts. The most recent Impact Factor is 1.771 for the year 2010.

Manuscripts prepared in Microsoft Word or LaTeX can be submitted to the Editorial Office online at [www.mdpi.com](http://www.mdpi.com). Detailed instructions for authors are also available online: [www.mdpi.com/journal/sensors/instructions/](http://www.mdpi.com/journal/sensors/instructions/)

*Sensors* is published in open access format—research articles, reviews and other content is released on the Internet immediately after acceptance. The scientific community and the general public can unlimitedly access the content for free as soon as it is published.

As an open access journal, *Sensors* is supported by the authors or their institutes by payment of article processing charges (APC) for accepted papers. More information is available at: [www.mdpi.com/about/apc/](http://www.mdpi.com/about/apc/)

We would be pleased to soon welcome you as one of our authors.

*Sensors* Editorial Office  
E-Mail: [sensors@mdpi.com](mailto:sensors@mdpi.com)  
[www.mdpi.com/journal/sensors/](http://www.mdpi.com/journal/sensors/)

## Aims & Scope

*Sensors* provides an advanced forum for the science and technology of sensors and biosensors. It publishes reviews (including comprehensive reviews on complete sensors products), regular research papers and short notes.

Our aim is to encourage scientists to publish their experimental and theoretical results in as much detail as possible. There is no restriction on the length of the papers. The full experimental details must be provided so that the results can be reproduced.

The scope of Sensors includes:

- chemical, physical and biosensors
- electrical and thermal-based sensors
- mass-sensitive and fiber-optic sensors
- gas sensors
- sensor applications for food industry, medicine, pharmacy, environmental monitoring, etc.
- sensor devices, sensor arrays
- analytical methods, modeling and software for sensors
- sensor technology and new sensor principles

*Sensors* regularly publishes special issues on relevant and timely topics. Be sure to check our website for an updated list of special issues: [www.mdpi.com/journal/sensors/special/](http://www.mdpi.com/journal/sensors/special/)

On an annual basis the *Sensors* Best Paper Award recognizes outstanding papers that meet the aims, scope, and high standards of the *Sensor*s journal.

You can find a list of this year's award winners here:  
<http://www.mdpi.com/1424-8220/12/1/127/>

## Open Access. What Does It Really Mean?

Open access is mainly a response to what is known as the serials crisis: yearly increasing journal subscription prices, which make subscription-based journals increasingly difficult to afford.

Many university libraries around the world have had to cancel existing subscriptions, or are unable to keep up with subscribing to new journals, because the cost of publication has risen disproportionately to their budgets.

With open access publishing, the cost of peer-review and production of an article is borne by the institute of the author by payment of a one-time flat fee. Conversely, readers and their institutions are no longer charged for accessing the journals they need.

For researchers, open access brings the convenience of immediate access to the literature that they need—no matter for which university or company they work, or whether they just want to read a paper in their spare time at home.

For authors, open access means a much wider circle of readers due to the easy access to their research papers. The interested general public is also able to access research works, giving higher transparency to the outcome of taxpayer money spent on research.

*Article*

## Electrocatalytic Oxidation of Ascorbic Acid Using a Poly(aniline-*co*-*m*-ferrocenylaniline) Modified Glassy Carbon Electrode

Sanoe Chairam <sup>1,\*</sup>, Worawit Sriraksa <sup>1</sup>, Maliwan Amatatongchai <sup>1</sup> and Ekasith Somsook <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Centre for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand;  
E-Mails: lolekcity@hotmail.com (W.S.); m\_amatatongchai@yahoo.com (M.A.)

<sup>2</sup> NANOCAST Laboratory, Centre for Catalysis, Department of Chemistry and Centre for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand;  
E-Mail: nanocast@live.com (E.S.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: chairam019@yahoo.com;  
Tel.: +6-645-353-400 ext. 4137; Fax: +6-645-288-379.

Received: 10 August 2011; in revised form: 19 September 2011 / Accepted: 24 October 2011 /

Published: 26 October 2011

**Abstract:** A poly(aniline-*co*-*m*-ferrocenylaniline) was successfully synthesized on a glassy carbon electrode (GCE) by electrochemical copolymerization using a scan potential range from −0.3 to +0.9 V (vs. Ag/AgCl) in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> containing 30% acetonitrile (ACN), 0.1 M aniline (Ani) and 0.005 M *m*-ferrocenylaniline (*m*-FcAni). The field emission scanning electron microscope (FESEM) and electrochemical methods were used to characterize the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) modified electrode. The poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE exhibited excellent electrocatalytic oxidation of ascorbic acid (AA) in citrate buffer solution (CBS, pH 5.0). The anodic peak potential of AA was shifted from +0.55 V at the bare GCE to +0.25 V at the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE with higher current responses than those seen on the bare GCE. The scan number at the 10th cycle was selected as the maximum scan cycle in electrochemical polymerization. The limit of detection (LOD) was estimated to be 2.0 μM based on the signal-to-noise ratio (S/N = 3). The amperometric responses demonstrated an excellent selectivity for AA determination over glucose (Glu) and dopamine (DA).

**Keywords:** electrochemical copolymerization; poly(aniline-*co*-*m*-ferrocenylaniline); electrocatalytic oxidation; ascorbic acid (AA)

## 1. Introduction

L-Ascorbic acid (AA, vitamin C) is the major antioxidant found in many plants. As known, AA is an essential nutrient that has been widely used on a large scale as an antioxidant agent in foods, beverages and pharmaceutical applications, due to its participation in several human metabolic reactions [1]. The analytical determination of AA has been reported by many methodologies, such as enzymatic methods [2], iodometric titration using 2,6-dichlorophenol-indophenol as indicator [3], spectroscopy [4], chromatography [5], fluorimetry [6] and electrochemistry [7,8]. Due to their quick response, high sensitivity, low detection limit and simple use, electrochemical methods are currently of much interest for AA determination by the electrocatalytic oxidation reaction on conventional electrodes. Though AA is an important antioxidant compound, it is difficult to determine by direct oxidation on conventional electrodes because of interfering species such as dopamine (DA) and glucose (Glu) [8,9]. Thus, the development of electrodes for determination of AA in the presence of many interfering species has recently attracted much attention in the field of electroanalytical chemistry.

Electrodeposition of the conducting polymer film at the surface of an electrode is a modern approach that has been utilized extensively in a field of electrochemistry to modify electrodes for determination of AA [10-18]. Consequently, applications of modified electrodes in electrocatalysis and sensors have been enriched by the specific properties of conducting polymers. These are e.g., polypyrrole, polyaniline and polythiophene. Their molecules contain conjugated systems which are the reason for electron mobility in the molecule. Among conductive electroactive polymers, polyaniline (PAni) [10-13] and its derivatives [19] have been the most intensively prepared and also studied due to their unique properties, which are also favorable for their potential applications, such as chemical sensors and biosensors. However the electrochemical activity and stability of PAni are generally affected by a variety of solution conditions, such as electrolytes, solvents and pH. For example, Mu [20,21] reported that PAni by itself reveals excellent redox functions only in acidic media, pH < 3, and this feature limits its broad use. Thus, the copolymerization of aniline with ring-substituted aniline derivatives has been studied in order to modify the desired properties of polyanilines. A different type of conductance exists in the redox polymers, where redox centres are inserted into the polymer. PAni containing many groups including alkyl (-R), alkoxy (-OR), hydroxyl (-OH), amino (-NH<sub>2</sub>) or halogens (-X) and the position of substituents is expected to lead to significantly different chemical and physical properties from the parent polymer.

The modified electrodes for chemical sensors are generally fabricated by incorporating various compounds such as biomolecular [22], organic [17] and organotransition-metal compounds [20,23-26], either by physical or covalent attachment to the polymeric structure, in order to create novel electrochemical properties. In the field of electrochemistry, ferrocene (Fc) [20,23] and its derivatives [25,26] have been widely incorporated into polymeric materials, due to their ability to display the high redox behavior of the ferrocene/ferricinium (Fc/Fc<sup>+</sup>) couple in organic and aqueous solvents, including ionic liquids. Ferrocene can be easily oxidized and reduced reversibly. Due to their

chemical versatility with high thermal stability, ferrocene moieties have been employed in a variety of applications [27–30], but are the most commonly used as the electrochemical active species for chemically modified electrodes (CMEs) [31]. The main problem of ferrocene is its tendency to be washed out of the matrix gradually [22,32]. In addition, ferrocene may be toxic and pollute to environment, if used on a large scale in the synthetic process for preparation of modified electrodes. Thus, it would be useful if the ferrocene could also be covalently bonded to the matrix, which is used to modify the conventional electrodes in order to investigate novel properties as mentioned above. Thus, in the present work, a poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE electrode was electrochemically synthesized by using cyclic voltammetry. To explore its potential applications, the prepared electrode was used as a chemical sensor for the electrocatalytic oxidation of AA.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Chemicals and Solutions

Aniline (Ani), L-ascorbic acid (AA), ethanol (EtOH), acetonitrile (ACN), sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ), sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloric acid (HCl) were purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals used in this study were of AR grade and used as received, except for the aniline, which was purified by double distillation under reduced pressure prior to use, and stored at 4 °C in refrigerator when not in use. All aqueous solutions were freshly prepared using de-ionized (DI) water ( $R \geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) purified with a Nanopore ultrapure water system. A 1,000 ppm stock standard AA solution was prepared freshly each day. The citrate buffer solution (CBS) (pH 5.0) was prepared by mixing 0.1 M trisodium citrate and 0.1 M citric acid.

### 2.2. Synthesis of *m*-FcAni

The *m*-FcAni monomer was synthesized from *m*-nitroaniline by following a method described in detail elsewhere [33,34]. After the solvent was removed, the crude product was absorbed onto silica and then purified by column chromatography with gradient elution (hexane-ethyl acetate) to afford the ferrocene derivative. A yellow-orange crystalline solid was obtained after drying under reduced pressure at room temperature.

### 2.3. Electrochemical Copolymerization of Poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)

The GCE was polished carefully with alumina ( $Al_2O_3$ ) slurry (1.0, 0.3 and 0.05  $\mu\text{m}$ , respectively) using a soft polishing cloth, then thoroughly rinsed several times with DI water. After that, the GCE was sonicated in DI water for 10 min to remove alumina adsorbed on the electrode surface. The GCE was cleaned by potential cycling between –1.0 V and +1.0 V (vs. Ag/AgCl) at 50  $\text{mV s}^{-1}$  in 0.1 M  $H_2SO_4$  until a stable clean GCE cyclic voltammogram (CV) was obtained. The poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) was successfully copolymerized electrochemically on the GCE surface using a scan potential ranging from –0.3 V to +0.9 V (vs. Ag/AgCl) in 0.5 M  $H_2SO_4$  containing 30% ACN, 0.1 M Ani and 0.005 M *m*-FcAni. A thin film of poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) coated on the GCE was thus obtained. Then, the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE was washed with 0.1 M  $H_2SO_4$ . EtOH and DI water to remove unreacted

monomers from the electrode surface, and dried in air at room temperature (RT, 25 °C) for 1 h. The poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE was kept in 0.1 M CBS (pH 5.0) at 4 °C in the fridge when not in use.

#### 2.4. Instruments and Measurement Set Up

##### Cyclic Voltammetry

All cyclic voltammetric and amperometric experiments were performed using an AUTOLAB (PGSTAT-12) electrochemical analyzer (Metrohm, Switzerland) controlled by the GPES 4.9 software. A conventional three-electrode system was used throughout. The working electrode was the bare GCE ( $\Phi = 3.0$  mm) or the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE. All potentials were reported *versus* Ag/AgCl (sat. 3.0 M KCl) reference electrode. A platinum (Pt) wire was employed as the counter electrode. The reaction cell volume of 10 cm<sup>3</sup> was used for all electrochemical measurements at RT. Measurements were carried out in 0.1 M CBS (pH 5.0) used as supporting-electrolyte solution. The pH of buffer solutions was monitored by using a 713 pH meter (Metrohm, Switzerland).

##### Hydrodynamic Voltammetry

Amperometric measurements at the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE were carried out at the potential of +0.25 V (vs. Ag/AgCl). The amperometric response of AA was shown in the amperogram. The current steps were associated with successive additions of 20  $\mu$ L of 0.1 M AA standard solution into a stirred batch system using a 10 mL volume glass cell.

##### Electron Microscopy

The SEM images were recorded employing a JEOL JSM-5910 field emission scanning electron microscope (FESEM) by accelerating at a voltage of 15.0 kV. The surface of the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE was analyzed by mounting the sample onto a double-sided carbon tape, and then gold sputter coating to minimize charging prior to SEM imaging.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Characteristics of Poly(*Ani-co-m-FcAni*)

The potential was ranged from −0.3 V to +0.9 V (vs. Ag/AgCl) at a scan rate of 50 mV s<sup>−1</sup>. This condition was also used to investigate the electrochemistry of aniline and its derivatives in an acid medium. Figure 1(a) shows the CVs of 0.1 M Ani and 0.005 M *m*-FcAni in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> containing 30% ACN. From the 1st-cycle to the 4th-cycle, a couple of reversible redox peaks ( $E_{p,a} = +0.35$  V and  $E_{p,c} = +0.27$  V) were observed as the iron center of the ferrocene units interconvert between the Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> states [29,31,35]. The inductive and steric effects of the ferrocene moieties make the monomer less reactive and difficult for the polymerization reaction. As the cycling process continued, two pairs of redox peaks on CVs located at +0.21/+0.09 V and +0.73/+0.67 V were observed from the 4th-cycle to the 10th-cycle. The peak currents increased gradually with increasing scan number, indicating an autocatalytic polymerization which causes the polyaniline film growth as the electrolysis proceeds [36]. After rinsing the working electrode with 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, EtOH and DI water, respectively,

a green-brown thin film was seen on the GCE surface, indicating that the poly(*Ani-co-m-FcAni*) was successfully copolymerized electrochemically.

**Figure 1.** (a) The film growth of the poly(*Ani-co-m-FcAni*) during electrolysis of 0.1 M Ani, and 0.005 M *m*-FcAni in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> containing 30% ACN: (1) 1st cycle and (10) 10th cycle at the scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup>. (b) The CVs of the poly(*Ani-co-m-FcAni*) modified electrode at different pH at 3, 4, 5, 6, 7 and 8 at a scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup>.

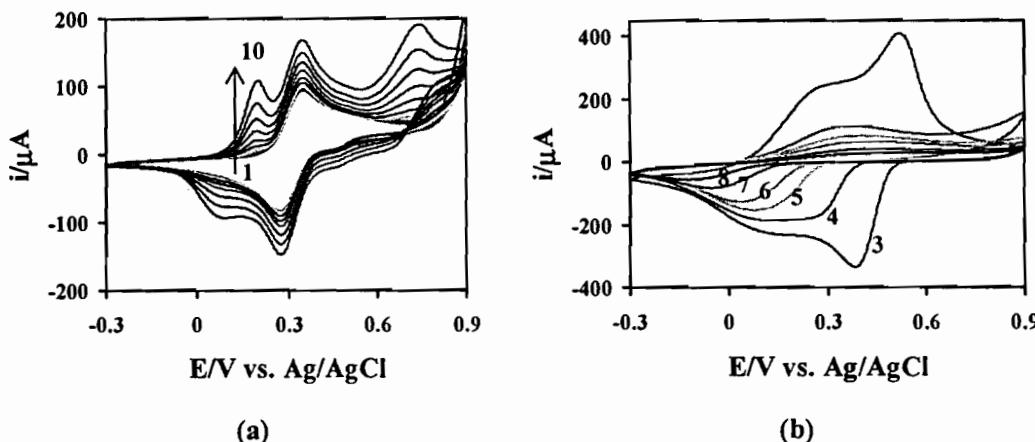
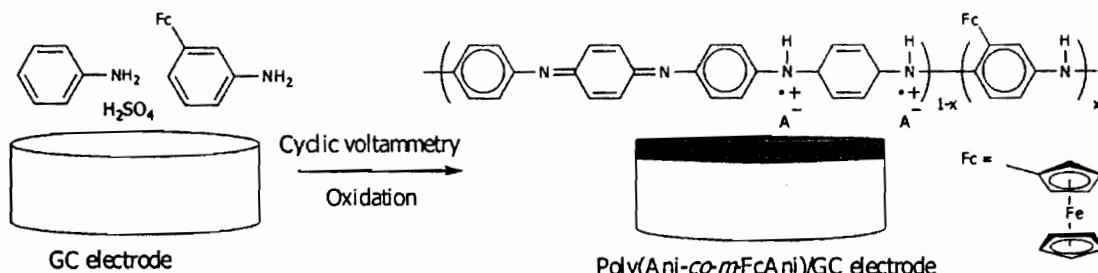


Figure 1(b) shows the responses of the poly(*Ani-co-m-FcAni*) modified electrode at different pH values. Strong anode and cathode peaks were observed in low pH solutions (pH < 4), indicating an excellent redox activity under acidic conditions. With increasing pH values, the redox peaks moved closer. This redox process leads to the dependence on the pH of solutions, the reactions and the polymer states [37]. In solutions of pH greater than 4, the poly(*Ani-co-m-FcAni*) nearly loses its electrochemical activity entirely, which corresponds to the leucoemeraldine/pernigraniline reaction. The electrochemical behavior of the poly(*Ani-co-m-FcAni*), according to the cyclic voltammogram, was similar to that the pure polyaniline and its derivatives in different solutions [19,20,38]. The electrochemical copolymerization of the conducting poly(*Ani-co-m-FcAni*) film modified GCE is illustrated in Scheme 1.

**Scheme 1.** The electrochemical copolymerization of the conducting poly(*Ani-co-m-FcAni*) film modified GCE.



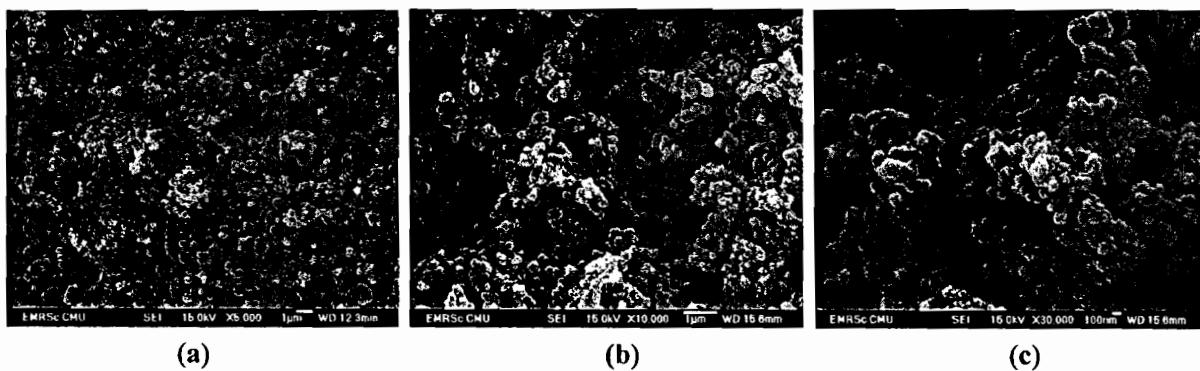
where  $x$  ( $0 \leq x \leq 1$ ) relates to the substitution stoichiometry of *m*-FcAni unit in poly(*Ani-co-m-FcAni*), a ferrocenyl group is labeled as -Fc and A<sup>-</sup> is referred to HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> as a dopant to poly(*Ani-co-m-FcAni*) backbone.

Based on our results, the proposed mechanism was initiated by the formation and reactions of cation radicals and dimeric species. The *m*-FcAni monomer was oxidized to generate the ferricinium species of *m*-FcAni<sup>+</sup>. The formation of the radical cation generated from *m*-FcAni by electro-oxidation on the GCE surface was considered as the rate-determining step. This was followed by coupling of radicals, mainly *N*- and *para*-forms, and elimination of a proton to give the dimer which then undergoes oxidation on the electrode surface along with aniline to give oligomers, resulting in the chain propagation. Finally, the radical cation of the oligomer reacts further with the radical cation of aniline to elongate the polymer chain, creating finally a dense, adhesive film at the electrode surface.

### *3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis*

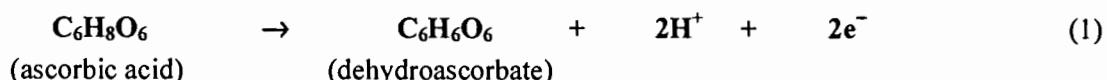
The surface morphology was investigated by using a field emission scanning electron microscope (FESEM). Figure 2 showed the typical FESEM surface morphology of the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) with different magnifications. Figure 2(a) shows that the surface of the as-prepared poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) was a three-dimensional network. This feature is common in the polyaniline family prepared in the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> medium [19,38]. Figure 2(b,c) shows the high-magnification FESEM views of small nanostructured granules with diameters ranging from ~100–300 nm. These nanostructures tend to agglomerate in the high porosity interconnected network. The electrochemically synthesized poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) film with nanostructures on GCE would significantly activate the electrode surface and accelerate the electron transfer, and had a high surface area as an ideal electrode material favoring a high performance for electrocatalytic oxidation of AA, as discussed below.

**Figure 2.** FESEM images of the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) film modified GC electrode with different magnifications at 5 kx (a), 10 kx (b), and high magnification at 30 kx (c).



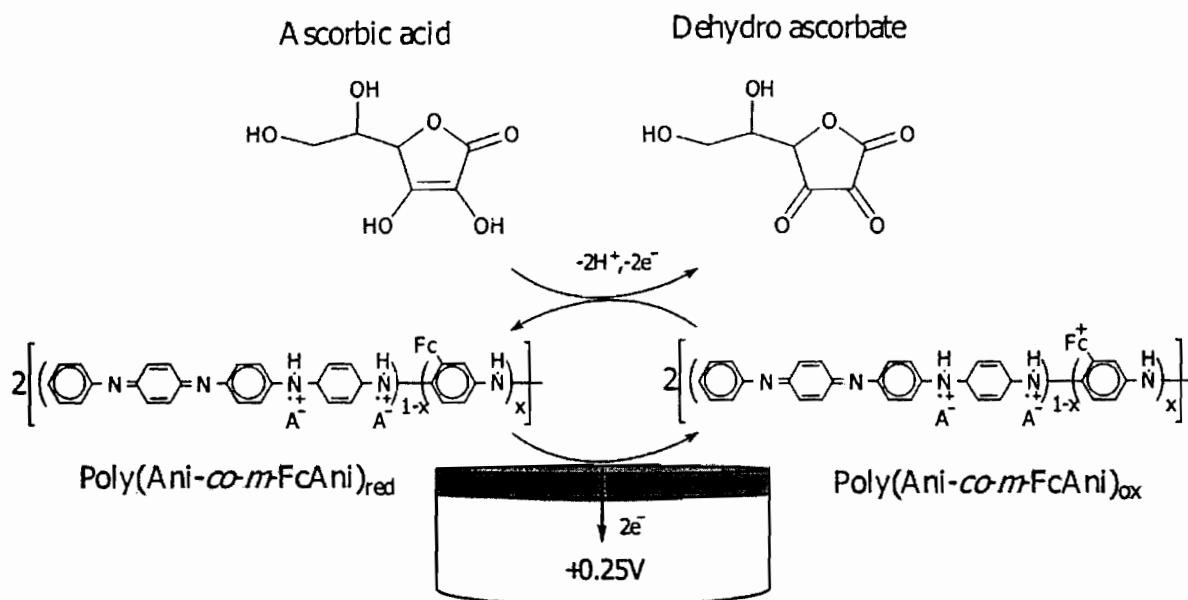
### 3.3. Electrocatalytic Oxidation of AA

The cyclic voltammetric characterization was performed in order to study the electrochemical behavior of the bare GC and poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE towards AA oxidation in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0). The overall reaction of ascorbic acid oxidation can be expressed by the following reaction:



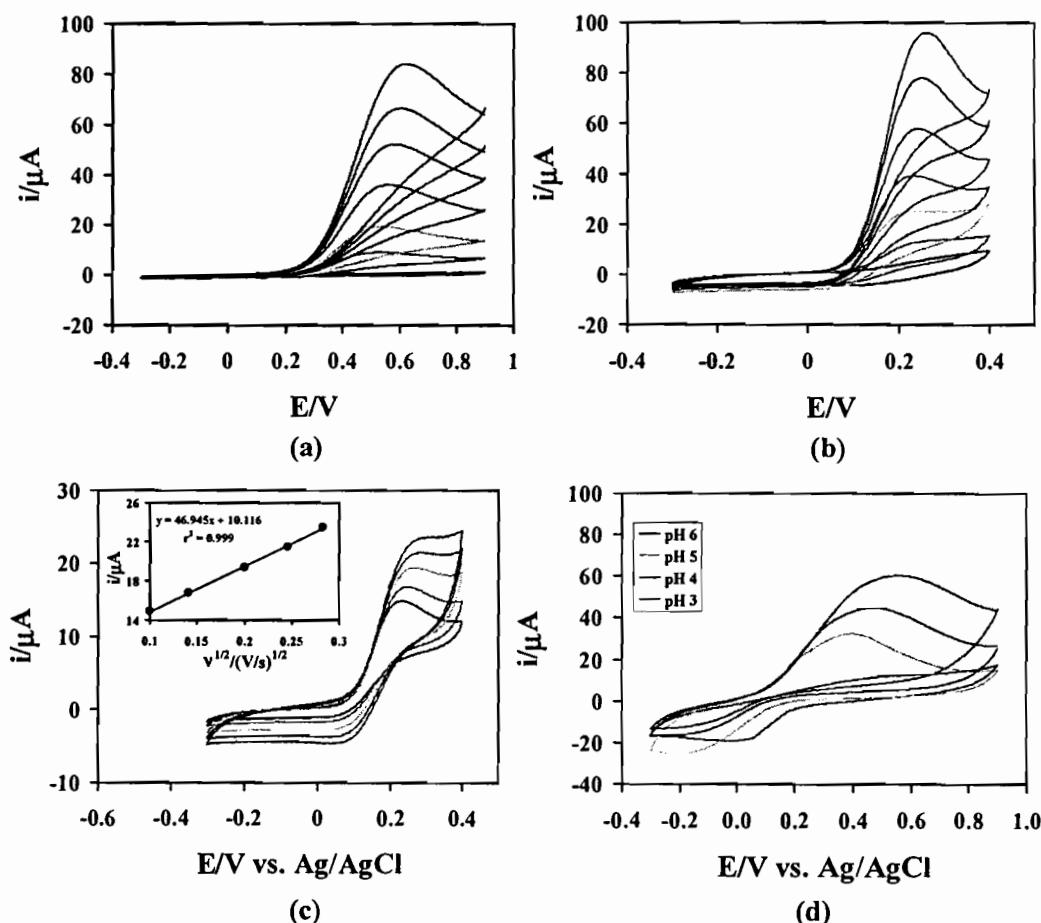
A proposed mechanism for the electrocatalytic oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbate at poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE is seen in Scheme 2.

**Scheme 2.** A proposed mechanism for the electrocatalytic oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbate at the poly(*Ani-co-m-FcAni*) film modified GCE.



The oxidation of AA at the unmodified GCE typically requires undesirably high working potentials ( $\geq +0.5$  V vs. Ag/AgCl). To compare the AA oxidation at both unmodified and modified electrodes. CVs were recorded at a bare GC and poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCEs. Figure 3(a) shows that the anodic peak potentials ( $E_{p,a}$ ) of AA at the bare GCE were located at about +0.55 V (vs. Ag/AgCl) in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0). Electrochemical oxidation of AA on the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE was investigated under the same conditions. Figure 3(b) shows that the  $E_{p,a}$  of AA at the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE was located at about +0.25 V (vs. Ag/AgCl). The anodic peak currents increased with increasing the concentration of AA. Only oxidation peaks were observed at both of bare and the GCE-modified electrode in the CVs. The results from Figure 3(a,b) shows clearly that the GCE modified with poly(*Ani-co-m-FcAni*) film gave a much lower AA peak potential than the unmodified GCE, due to its participation in the AA oxidation reaction. Compared with the unmodified GCE under the same conditions, the higher currents for the oxidation of AA at the modified GCE were attributed to the presence of poly(*Ani-co-m-FcAni*) on the surface of electrode. These currents were higher than that on the bare GCE, and the oxidation potential of AA at the poly(*Ani-co-m-FcAni*) film modified GCE was also lower about 0.3 V than that on the bare GCE in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0). Thus, these experimental results confirmed that the modified GCE with poly(*Ani-co-m-FcAni*) film effectively catalyzed the oxidation of AA, and was expected to provide a better electrocatalysis for AA oxidation than the bare GCE.

**Figure 3.** The CVs of AA at (a) the bare GCE and at (b) the poly(Ani-co-*m*-FcAni)/GCE in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) at scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup> in the presence of AA at concentrations: 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10.0 mM (vs. Ag/AgCl). (c) CVs with various potential scan rates in the presence of 2.0 mM AA in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) at the poly(Ani-co-*m*-FcAni)/GCE. Inset shows the relationship between the oxidation current and the square root of the scan rate with linear regression, and (d) CVs of 4.0 mM AA at the poly(Ani-co-*m*-FcAni)/GCE at different pH buffer solutions.



To study the effect of scan rate on electrocatalytic properties towards AA oxidation. CVs were recorded at the poly(Ani-co-*m*-FcAni)/GCE at different scan rates in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) as shown in Figure 3(c). As can be seen, the increase in potential scan rate induced a corresponding increase in peak current and resulted in a shift to more positive values for the electrocatalytic oxidation of AA. The shift of the peak potential was observed as an irreversible electrochemical reaction and a kinetic limitation in the reaction between the redox sites of poly(Ani-co-*m*-FcAni) and AA. This indicates that the electrocatalytic oxidation at poly(Ani-co-*m*-FcAni) modified GCE was a surface-controlled electrochemical reaction and diffusion-controlled electrode process of AA. The peak current varies linearly with the square root of the scan rate. The linear equation between peak currents and the square root of the scan rate is presented as follows:  $I_{AA} (\mu\text{A}) = 46.9450v (\text{V/s})^{1/2} + 10.1160$  with a linear relative correlation coefficient of 0.999, indicating that regression line is very well fitted with

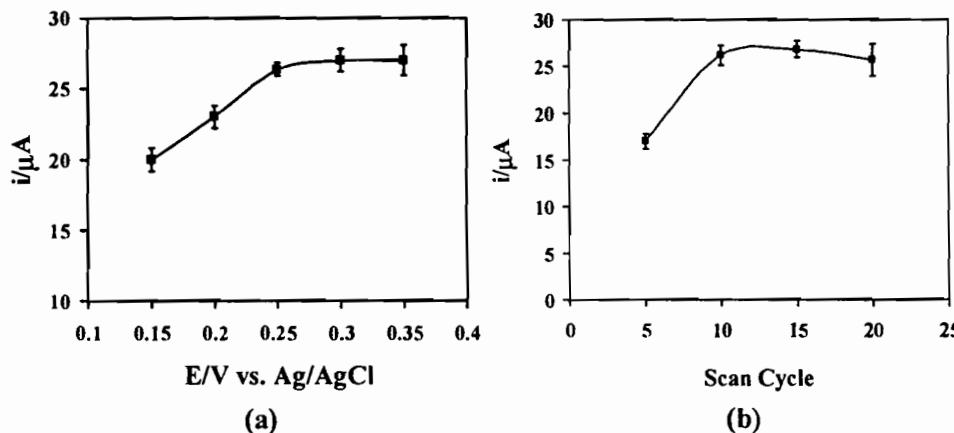
experimental data. Thus, these results demonstrated that the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE can be used for the determination of AA.

The effect of pH to the electrocatalytic oxidation of AA at the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE was investigated with different pH buffer solutions containing 4.0 mM AA using cyclic voltammetry as shown in Figure 3(d). The peak current from the electrocatalytic oxidation of AA in acid solution was higher than that in basic solution. Due to the instability of AA in basic solution, the catalytic current decreased at higher pH. The peak potentials shifted towards negative potential with increasing solution pH between 3 and 6. According to the results obtained from CVs at various pH values, the pH 5 was chosen as the best for the supporting solution for the further investigation.

### 3.4. Effect of the Applied Potential and Scan Cycle

In order to optimize the experimental conditions for measurement of AA oxidation at the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE, the effect of the applied potential and scan cycle used for synthesis of the poly(*Ani-co-m-FcAni*) was investigated. Figure 4(a) shows the effect of applied potential at the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE for electrocatalytic oxidation of AA. It has been clearly shown that the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE can catalyze AA by applying different potentials in the range from +0.15 to +0.35 V to the working electrode while immersed in the presence of 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) containing 2.0 mM AA. As can be seen, the signals obtained were very reproducible. At the higher potential applied, an easier AA oxidation process occurred; however, increasing applied potential typically increases the background current responses from the poly(*Ani-co-m-FcAni*) film [12]. Thus, the most appropriate potential of +0.25 V was selected as the applied potential for further studies of AA electrocatalytic oxidation.

**Figure 4.** The optimization of the applied potential (a) and scan number (b) for electrocatalytic oxidation of AA at the poly(*Ani-co-m-FcAni*)/GCE in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) at scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup> ( $n = 3$ ).



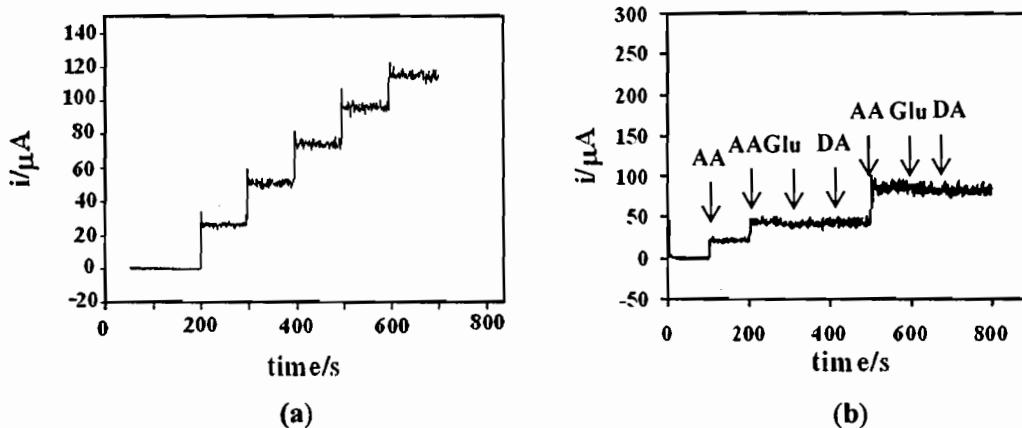
Cyclic voltammetry is a simple and rapid technique for controlling the thickness of the polymer films. By altering the scan number in electrochemical polymerization, poly(*Ani-co-m-FcAni*) films of different thickness were obtained. The electrochemical polymerization of poly(*Ani-co-m-FcAni*) at the electrode surface was examined for different numbers by cycling in the range from 5 to 20 scan cycles.

Figure 4(b) shows the current of 2.0 mM AA in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) when using GCE-modified with different scan cycles for the synthesized of poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCEs. As can be seen, the lowest oxidation current was observed at the 5th-scan cycle. The oxidation current increased upon increasing the scan cycle from 5 to 10 and reached a plateau after that. For the 15th and 20th scan numbers, no enhancement appeared. It could be assumed that a thicker poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) film was obtained, resulting a lower catalytic performance [12]. Therefore, the scan number at 10th cycle was selected as an optimum scan cycle in electrochemical polymerization of poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) modified GCE for further detailed studies.

### 3.5. Amperometric Measurement

Figure 5(a) displays the typical amperometric response of the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE to AA. The amperometric study was carried out through the successive addition of AA into a continuously stirred batch system of 0.1 M citrate buffer (pH 5.0). At the applied potential of +0.25 V (vs. Ag/AgCl), the oxidative current increased with increasing concentrations of AA. A linear relationship between oxidation current and concentration of AA was observed in the range from  $0.05 \times 10^{-3}$  to  $5.7 \times 10^{-3}$  M. Linear calibration was obtained, with a coefficient of 0.997, demonstrating the good relationship between oxidation current and concentration. The limit of detection (LOD) was estimated to be 2.0  $\mu$ M based on the signal-to-noise ratio ( $S/N = 3$ ). These experimental results indicated that the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE has potential application as a chemical sensor for the determination of AA.

**Figure 5.** (a) Typical amperometric *i-t* curve of poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE to successive additions of 0.1 mM AA into a stirred system of 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) at +0.25 V. (b) Amperometric response for interferences recorded using poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE upon successive additions of 0.1 mM AA, 1.0 mM DA and 1.0 mM Glu.



In biological and soft drink samples, glucose (Glu) and dopamine (DA) are strong interferents that are electrochemically oxidized at almost the same potential as AA. Figure 5(b) shows the amperometric responses for AA, Glu and DA at the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE. The successive additions of the same concentration of 0.1 mM AA, 1.0 mM DA and 1.0 mM Glu were investigated by applying potential at +0.25 V (vs. Ag/AgCl). It can be seen obviously that additional signals to the current response of AA were not observed due to the successive additions of Glu and DA. Thus, this

modified electrode could be applied as the chemical sensor for a practical determination of AA in the presence of Glu and DA. Other electrochemical experiments were then carried out to study the effects of foreign species such as glucose, fructose, sucrose, galactose and sodium chloride. Each interference study was carried out at the applied potential of +0.25 V (vs. Ag/AgCl) in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) containing 0.1 mM AA. The amperometric measurements can tolerate 200-fold excesses of three interfering species, namely glucose, fructose and sucrose, 240-fold of sodium chloride, and 300 fold of galactose.

#### 4. Conclusions

In conclusion, a chemically modified GCE based on poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) was successfully prepared by electrochemical copolymerization in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> containing 30% ACN, 0.1 M Ani and 0.005 M *m*-FcAni. FESEM images showed that the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni) film was deposited on the surface of GCE. From electrochemical experiments, the CVs showed that the  $E_{pa}$  of AA was shifted from +0.55 V at bare GCE to +0.25 V at the poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE with a greatly enhanced current response. The 10th cycle scan number was selected as an optimum one in the electrochemical polymerization. The amperometric responses demonstrated an excellent selectivity for AA determination over Glu and DA. Thus, this poly(Ani-*co*-*m*-FcAni)/GCE could be applied as an amperometric sensor for the selective detection of AA in biological and soft drink samples.

#### Acknowledgments

The financial support from Research, Development and Engineering (RD&E) fund through the National Nanotechnology Center (NANOTEC), the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) (Project No. NN-B-22-FN3-15-52-16), the National Research Council of Thailand (NRCT, No. 2554A, 11702005), the Centre for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research University Initiative, the Thailand Research Fund (TRF, No. MRG5480037) and Faculty of Science, Ubon Ratchathani University (UBU) are gratefully acknowledged.

#### References

1. Zhang, L.; Wang, Z.; Xia, Y.; Kai, G.; Chen, W.; Tang, K. Metabolic engineering of plant L-ascorbic acid biosynthesis: Recent trends and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2007**, *27*, 173-182.
2. Zhu, M.; Huang, X.-M.; Shen, H.-X.; Li, R. Biomimic of peroxidase and enzymatic assay for ascorbic acid. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *334*, 303-307.
3. Svehla, G.; Koltai, L.; Erdey, L. The use of 2,6-dichlorophenol-indophenol as indicator in iodometric titrations with ascorbic acid. *Anal. Chim. Acta* **1963**, *29*, 442-447.
4. Chan, H.S.O.; Ng, S.C.; Seow, S.H. Polybithiophene-modified electrode: Spectrophotometric detection of ascorbic acid. *Synth. Met.* **1994**, *66*, 177-183.

5. Tai, A.; Gohda, E. Determination of ascorbic acid and its related compounds in foods and beverages by hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2007**, *853*, 214-220.
6. Wu, X.; Diao, Y.; Sun, C.; Yang, J.; Wang, Y.; Sun, S. Fluorimetric determination of ascorbic acid with *o*-phenylenediamine. *Talanta* **2003**, *59*, 95-99.
7. Gao, Z.; Chen, B.; Zi, M. Electrochemistry of ascorbic acid at polypyrrole/dodecyl sulphate film-coated electrodes and its application. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *365*, 197-205.
8. Ragupathy, D.; Gopalan, A.I.; Lee, K.-P. Electrocatalytic oxidation and determination of ascorbic acid in the presence of dopamine at multiwalled carbon nanotube-silica network-gold nanoparticles based nanohybrid modified electrode. *Sens. Actuat. B* **2010**, *143*, 696-703.
9. Zhao, Y.; Gao, Y.; Zhan, D.; Liu, H.; Zhao, Q.; Kou, Y.; Shao, Y.; Li, M.; Zhuang, Q.; Zhu, Z. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode. *Talanta* **2005**, *66*, 51-57.
10. Bhadra, S.; Khastgir, D.; Singha, N.K.; Lee, J.H. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 783-810.
11. Malinauskas, A.; Garjonyte, R.; Mazeikiene, R.; Jureviciute, I. Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated polymer modified electrodes for electroanalytical applications: A review. *Talanta* **2004**, *64*, 121-129.
12. Ambrosi, A.; Morrin, A.; Smyth, M.R.; Killard, A.J. The application of conducting polymer nanoparticle electrodes to the sensing of ascorbic acid. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *609*, 37-43.
13. Zhang, L.; Zhang, C.; Lian, J. Electrochemical synthesis of polyaniline nano-networks on *p*-aminobenzene sulfonic acid functionalized glassy carbon electrode: Its use for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 690-695.
14. Kalimuthu, P.; John, S.A. Modification of electrodes with nanostructured functionalized thiadiazole polymer film and its application to the determination of ascorbic acid. *Electrochim. Acta* **2009**, *55*, 183-189.
15. Kalimuthu, P.; John, S.A. Simultaneous determination of epinephrine, uric acid and xanthine in the presence of ascorbic acid using an ultrathin polymer film of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol modified electrode. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *647*, 97-103.
16. Ashok Kumar, S.; Cheng, H.-W.; Chen, S.-M. Electroanalysis of ascorbic acid (vitamin C) using nano-ZnO/poly(luminol) hybrid film modified electrode. *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 364-370.
17. Kumar, S.A.; Lo, P.-H.; Chen, S.-M. Electrochemical selective determination of ascorbic acid at redox active polymer modified electrode derived from direct blue 71. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 518-523.
18. Kumar, S.A.; Wang, S.-F.; Yang, T.C.K.; Yeh, C.-T. Acid yellow 9 as a dispersing agent for carbon nanotubes: Preparation of redox polymer-carbon nanotube composite film and its sensing application towards ascorbic acid and dopamine. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2592-2597.
19. Mu, S. Synthesis and electronic properties of poly(aniline-*co*-2-amino-4-hydroxybenzenesulfonic acid). *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6344-6349.
20. Mu, S.; Kan, J. The electrocatalytic oxidation of ascorbic acid on polyaniline film synthesized in the presence of ferrocenesulfonic acid. *Synth. Met.* **2002**, *132*, 29-33.

21. Wang, H.; Mu, S. Bioelectrochemical response of the polyaniline ascorbate oxidase electrode. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *436*, 43-48.
22. Cosnier, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 443-456.
23. Guorong, Z.; Xiaolei, W.; Xingwang, S.; Tianling, S.  $\beta$ -Cyclodextrin-ferrocene inclusion complex modified carbon paste electrode for amperometric determination of ascorbic acid. *Talanta* **2000**, *51*, 1019-1025.
24. Favero, G.; Campanella, L.; D'Annibale, A.; Ferri, T. Preparation and characterization of a chemically modified electrode based on ferrocene-tethered  $\beta$ -cyclodextrin self assembled monolayers. *Microchem. J.* **2004**, *76*, 77-84.
25. Fernández, L.; Carrero, H. Electrochemical evaluation of ferrocene carboxylic acids confined on surfactant-clay modified glassy carbon electrodes: Oxidation of ascorbic acid and uric acid. *Electrochim. Acta* **2005**, *50*, 1233-1240.
26. Pournaghi-Azar, M.H.; Ojani, R. Catalytic oxidation of ascorbic acid by some ferrocene derivative mediators at the glassy carbon electrode. Application to the voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine in the same sample. *Talanta* **1995**, *42*, 1839-1848.
27. Sunsin, A.; Wisutsri, N.; Suriyarak, S.; Teanchai, R.; Jindabot, S.; Chaicharoenwimolkul, L.; Somsook, E. Effect of ferrocene moieties on the copper-based atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *113*, 3766-3773.
28. Zhao, G.-C.; Xu, M.-Q.; Zhang, Q. A novel hydrogen peroxide sensor based on the redox of ferrocene on room temperature ionic liquid film. *Electrochim. Commun.* **2008**, *10*, 1924-1926.
29. Matsumiya, M.; Terazono, M.; Tokuraku, K. Temperature dependence of kinetics and diffusion coefficients for ferrocene/ferricinium in ammonium-imide ionic liquids. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 1178-1183.
30. Chaicharoenwimolkul, L.; Munmai, A.; Chairam, S.; Tewasekson, U.; Sapudom, S.; Lakliang, Y.; Somsook, E. Effect of stabilizing ligands bearing ferrocene moieties on the gold nanoparticle-catalyzed reactions of arylboronic acids. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 7299-7302.
31. Geiger, W.E. Organometallic electrochemistry: Origins, development, and future. *Organometallics* **2007**, *26*, 5738-5765.
32. Bond, A.M.; McLennan, E.A.; Stojanovic, R.S.; Thomas, F.G. Assessment of conditions under which the oxidation of ferrocene can be used as a standard voltammetric reference process in aqueous media. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2853-2860.
33. Kurihara, M.; Hirooka, A.; Kume, S.; Sugimoto, M.; Nishihara, H. Redox-conjugated reversible isomerization of ferrocenylazobenzene with a single green light. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8800-8801.
34. Sakamoto, A.; Hirooka, A.; Namiki, K.; Kurihara, M.; Murata, M.; Sugimoto, M.; Nishihara, H. Photon-, electron-, and proton-induced isomerization behavior of ferrocenylazobenzenes. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7547-7558.
35. Cassidy, J.; O'Gorman, J.; Ronane, M.; Howard, E. Note on the voltammetry of ferrocene carboxylate in aqueous solution. *Electrochim. Commun.* **1999**, *1*, 69-71.
36. Kobayashi, T.; Yoneyama, H.; Tamura, H. Electrochemical reactions concerned with electrochromism of polyaniline film-coated electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *177*, 281-291.

37. Zhang, J.; Shan, D.; Mu, S. A promising copolymer of aniline and m-aminophenol: Chemical preparation, novel electric properties and characterization. *Polymer* **2007**, *48*, 1269–1275.
38. Zhang, L.; Lian, J. Electrochemical synthesis of copolymer of aniline and *o*-aminophenol and its use to the electrocatalytic oxidation of ascorbic acid. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *611*, 51–59.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## นำเสนอในงานประชุม

### ระดับชาติ

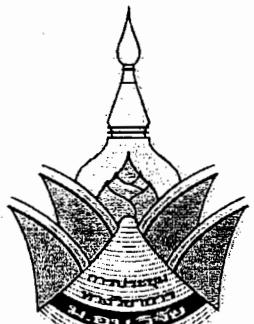
1. ยุวกร เสนศรี, เสนอ ชัยรัมย์ และ นพลิวรรณ อุมาธงไชย “การพัฒนาไบโอเคนท์เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพด้วยเอนไซม์แลคเคส” การประชุมวิชาการ มอ.บ.วิจัย ครั้งที่ 4, 9-10 สิงหาคม 2553 (อุบลราชธานี, ประเทศไทย).
2. Y. Snsri, S. Chairam, D. Nacapricha and M. Amatatongchai “Development of biosensor based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite for laccase-catalyzed oxygen reduction” 36<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT36) 26 - 28 October 2010 (Bangkok, Thailand).

### ระดับนานาชาติ

1. M. Amatatongchai, J. Phanthuwat and D. Nacapricha “Development of glucose biosensor based on glucose oxidase entrapped in the matrix of carbon nanotube/chitosan modified glassy carbon electrode” 16<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2010) including related techniques 25-30 April 2010 (Pattaya, Thailand).



งานวิจัยเพื่อสร้างสรรค์นวัตกรรมตามแนวทางปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง  
RESEARCH FOR INNOVATION ALONG THE PHILOSOPHY OF SUFFICIENCY ECONOMY



### บทคัดย่อ (Abstracts)

## การประชุมวิชาการ มอ.บ.วิจัย ครั้งที่ 4 The 4<sup>th</sup> Ubon Ratchathani University Research Conference

9 - 10 สิงหาคม 2553  
โรงแรมล้ายทอง จังหวัดอุบลราชธานี  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

## การพัฒนาใบโอแคโทดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเซลล์เชือเพลิงชีวภาพด้วยเอนไซม์แลคเคส

ยุวกร เสนศรี เสนอ ชัยรัตน์ และ มะลิวรรณ อุนตรังไชย  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

*E-mail: yuwakom.sensri@gmail.com*

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเสนอการพัฒนาสภาพไว้และจำเพาะเจาะจงของคาร์บอนนาโนทิวบ์-แลคเคส-ไคโตซาน อาศัยหลักทางใบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจการริดกัชชของออกซิเจน พื้นผิวของข้าไฟฟ้าชนิดกลาเซียร์ที่บอนไมดิฟายด์ด้วยนาโนคอมโพสิตของคาร์บอนนาโนทิวบ์และเอนไซม์แลคเคสในไคโตซานเพื่อสามารถประยุกต์ใช้เป็นใบโอแคโทดในเซลล์เชือเพลิงชีวภาพ ผลการทดลองด้วยเทคนิคไชคลิกโอลแทมเมทรีที่ข้าไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น ในสารละลายน 0.1 M citrate buffer pH 5.0 ที่ใช้เป็นสารละลายนิโอเล็กโทรไลต์เกือบ浑 ข้าไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นข้าไฟฟ้าอ้างอิง และ Pt เป็นข้าไฟฟ้าช่วย พบร่วมกับปะกอนของคอมโพสิตที่เหมาะสมที่ให้ประสิทธิภาพในการวัดที่ดี คือข้าไฟฟ้าชนิดกลาเซียร์ที่ไมดิฟายด์ด้วยสารละลายนสมระห่วงคาร์บอนนาโนทิวบ์ (CNT) ในสารละลายนไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) กับสารละลายนิโอเล็กโทรไลต์ (CS) และเอนไซม์แลคเคส (GC/CNT(DMF)+CS/Laccase) ออกซิเจนเกิดริดกัชชที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 V โดยให้ค่าศักย์กระแสที่ยอดพีค 52.1  $\mu$ A สัญญาณที่ได้ที่สภาวะดังกล่าวมี สภาพไวในการวิเคราะห์สูง และมีความเสถียรในการตรวจวัด สามารถนำมาระบบพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในงานต่อไปได้

**คำสำคัญ:** ใบโอแคโทด แลคเคส ไคโตซาน คาร์บอนนาโนทิวบ์ ออกซิเจนริดกัชช

**Development of a laccase-based biocathode for fuel cell application**

Yuwakorn Sensri Sanoe Chairam and Maliwan Amatatorngchai

*Chemistry Department, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Thailand*

*E-mail: yuwakorn.sensri@gmail.com*

**Abstract**

This work presents the development of a sensitive and selective carbon nanotube (CNT)-laccase-chitosan based biosensor for detection of oxygen reduction. The surface of glassy carbon (GC) electrode was modified with nano-composites of CNT and laccase in the matrix of chitosan and could apply as a biocathode in biofuel cell. Electrochemical reduction of oxygen was studied at the developed biosensor using cyclic voltammetry (CV). The biosensor, GC/CNT(DMF)+CS/laccase, was used as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode. CV of oxygen were conducted in a 0.1 M citrate buffer pH 5.0. The reduction waves from cyclic voltammogram were observed at -0.35 V with the  $i_{p,c}$  of 52.1  $\mu$ A. Potential use of the biosensor and application in bio-fuel will be discussed.

**Keywords:** biocathode, laccase, chitosan, carbon nanotube, oxygen reduction

**Acknowledgements**

Financial support from the National Research Council of Thailand and the Center for Innovation in Chemistry: Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH-CIC) are gratefully acknowledged.



# Abstracts

THE 36<sup>th</sup> CONGRESS  
on SCIENCE and TECHNOLOGY  
of THAILAND (STT 36)

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์  
และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 36 (วทท 36)

*Towards a Better Society through Science and Technology*

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อสังคมที่ดีขึ้น



October 26 - 28, 2010

Venue: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC) Bangkok, Thailand.  
26 - 28 ตุลาคม 2553 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพฯ

[www.stt36.scisoc.or.th](http://www.stt36.scisoc.or.th)

the lichen after transplanted (at 95% confidence limit), whereas the amounts of lecanoric acid and atranorin were not significantly different after transplantation.

**C1\_C0071: Development of biosensor based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite for laccase-catalyzed oxygen reduction**

Yuwakorn Sensri<sup>1,\*</sup>, Sanoe Chairam<sup>1</sup>, Duangjai Nacapricha<sup>2</sup>, Maliwan Amatatongchai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani, 34190, Thailand

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok, 10400, Thailand

\*e-mail: yuwakorn.sensri@gmail.com

**Abstract:** The carbon nanotubes-chitosan (CNT-CS) composite provides a suitable biosensing matrix due to its high stability, good biocompatibility, and good conductivity. Development of a sensitive and selective biosensor was proposed by entrapping laccase enzyme into the composite film for detection of oxygen reduction. The nano-composite of CNT-CS could be conveniently cast on the glassy carbon (GC) electrode surfaces. With the aid of CS and bovine serum albumin (BSA), laccase was then immobilized on the nanostructure film to form an oxygen sensor and could apply as biocathodes in biofuel cell. Electrochemical reduction of oxygen was studied at the developed biosensor using cyclic voltammetry (CV). The biosensor, GC/CNT-CS/laccase/BSA, was used as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode. Cyclic voltammograms of oxygen were measured in a 0.1 M citrate buffer pH 5.0. The reduction wave was observed at -0.35 V (oxygen flow rate equals to 40 mL/min in 10 mL of citrate buffer). Stability and the possible application of the biosensor in bio-fuel will be discussed.

**C1\_C0072: Factorial design optimization of eugenol extraction from holy basil by subcritical water**

Kanittha Dararuang, Orapin Chienthavorn

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

\*e-mail: fsciopc@ku.ac.th, nuna\_comingsoon@hotmail.com

**Abstract:** Subcritical water extraction (SWE) of an active compound (eugenol) from the holy basil (*Ocimum Sanctum L.*) was achieved. The extraction was studied at a temperature between 160-220°C and a static time between 30-120 min by using 4<sup>2</sup>-full factorial design from Minitab software. Effects of temperature and static time were investigated. Fresh leaves were best extracted at 180°C for 60 min and the dried leaves were achieved at a higher temperature of 200°C at a longer time (120 min). Separation of eugenol was carried out by using a gas chromatograph with flame ionization detector (GC-FID). Eugenol content in the aqueous extract in the fresh leaves (4.11%) was higher than those in the dried leaves (1.70%).

**C1\_C0074: Modification of QuEChERS method for aflatoxins residues analysis in rice**

Kunaporn Sanguankaew, Natchanun Leepipatpiboon\*

Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

\*e-mail: natchanun.l@chula.ac.th

**Abstract:** A new non-immunoassay based extraction method for aflatoxins B1, B2, G1, and G2 was developed for aflatoxins screening in rice. The associated technique combined modified QuEChERS method with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry by generating pseudo molecular ions via electrospray ionization in ES+ mode and monitoring by MRM (Multiple Reaction Monitoring) analysis. Aflatoxins were isolated on Acquity UPLC BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm) with 0.5% formic acid in 5 mM ammonium formate/acetonitrile by gradient elution in 11 minutes. Modified QuEChERS method employed acetonitrile for solvent extraction. Cleanup was done by dispersive combination of PSA, C18, and neutral alumina. Method performance was evaluated as percent recovery from 0.01-0.1 mg/L, acceptable linearity with all R<sup>2</sup> values better than 0.99 were observed. Percent recovery ranged from 85 to 103 with within-day and between-day precisions at three concentration levels (low, mid, high) showed %RSD values better than 7.4 (n=10). Method's limits of detection range from 0.5-1.0 µg/kg. The proficiency testing was performed with Z-score 0.6. This method is rapid and robust, and fit to replace expensive import immunoaffinity columns and reagents commonly employed in routine analyses of aflatoxins.

**C1\_C0075: Simultaneous quantitative determination of total methyl ester, linoleic methyl ester and water in palm oil biodiesel by near infrared spectroscopic analysis**

C1



2010 PATTAYA THAILAND

The 16<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis;  
Including Related Techniques

25 - 30 April 2010  
Pattaya, Thailand



MAHIDOL  
UNIVERSITY  
*Wisdom of the Land*



PERCH-CIC



## Development of glucose biosensor based on glucose oxidase entrapped in the matrix of carbon nanotube/chitosan modified glassy carbon electrode

Maliwan Amatatongchai<sup>1,2</sup>, Jureerat Phanthuwat<sup>1</sup> and Duangjai Nacapricha<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand.*

<sup>2</sup>*Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs).*

<sup>3</sup>*Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.*

Tel: +66-45-433110 ext 4126; Fax: +66-45-288-379; e-mail: amaliwan@gmail.com

### Abstract

This work presents the development of a sensitive and selective carbon nanotube (CNT)-glucose oxidase (GOx)-chitosan based biosensor for detection of glucose. The surface of glassy carbon (GC) electrode was modified with nanocomposites of CNT and GOx in the matrix of chitosan and used as glucose biosensor. Electrochemical oxidation of glucose was studied at the developed biosensor using cyclic voltammetry (CV). The biosensor was used as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode. CV of glucose was conducted in a 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 containing 0.5 mM of ferrocene carboxaldehyde (FCA) as the mediator. The oxidation waves from cyclic voltammograms were observed at 460 mV at the biosensor. The results from amperometry indicated that CNT-GOx-chitosan based biosensor enable very sensitive and stable amperometric measurements of glucose. The results were used to construct a simple amperometric detector for determination of glucose as applied to flow injection analysis (FIA). Potential use of this method and application for glucose detection in flow injection analysis (FIA) will be discussed.

**Keywords:** Glucose sensor; carbon nanotube; chitosan; amperometry; flow injection

### Acknowledgements

Financial supports from the National Research Council of Thailand and the Center for Innovation in Chemistry: Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH-CIC) are gratefully acknowledged.

### References

- [1] Y. Liu, M. Wang, F. Zhao, Z. Xu, S. Dong, Biosens. Bioelectron. 21 (2005) 984.
- [2] G.D. Liu, Y. H. Lin, Electrochim. Commun. 8 (2006) 251.



## การนำองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยไปใช้ประโยชน์

โครงการวิจัยนี้สามารถเอื้อให้มีการผลิตมหาบัณฑิต ทางด้านเคมี จำนวน 2 คน องค์ความรู้จากการวิจัยสามารถนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดเป็นสารนิพนธ์สำหรับนักศึกษาหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเคมี จำนวน 2 เรื่อง

1. Development of laccase based biosensor for fuel cell and antioxidants assay applications
2. Development of amperometric biosensors for glucose detection