การเพิ่มสัญญาณการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ โดยวิธีการเกาะติดทางไฟฟ้าของรูทีเนียมบนขั้วแพลตินัม

Enhancement of Biosensor Response by Electrodeposition of Ruthenium on a Platinum Electrode

โสภา กลิ่นจันทร์*

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้เป็นการปรับปรุงความไว (sensitivity) ของกลูโคสเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีการเกาะติดทางไฟฟ้า (electrodeposition) ของอนุภาครูทีเนียมบนผิวหน้าของขั้วแพลตินัม โดยการป้อนค่าศักย์ไฟฟ้าที่คงที่ -0.4 V เป็นเวลา 10 นาทีให้แก่ขั้วแพลตินัมเทียบกับขั้ว Ag/AgCl ที่จุ่มอยู่ในสารละลายของรูทีเนียม 5 mg/ml อิเล็กโทรดที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์เพื่อสร้างเป็นกลูโคสเซนเซอร์ โดยทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสไว้ภายในฟิล์มโพลีเมอร์ของโพลีฟีนิลีนไดเอมีน (PPD) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลีเมอไรเซชัน รูทีเนียมที่ติดอยู่บนผิวหน้าของแพลตินัมอิเล็กโทรดส่งผลให้อิเล็กโทรดที่ได้ให้สัญญาณตอบสนองที่เป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดที่ไม่ได้ติดรูทีเนียม อิเล็กโทรดที่ได้นี้ให้ความไวในการตรวจวัด 1.4 μA/mM (ขนาดของสัญญาณจะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 55.6% สำหรับอิเล็กโทรดที่เกาะติดด้วยรูทีเนียม) และให้สัญญาณตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสในช่วง 0-14 mM ปริมาณของสารละลายรูทีเนียมและระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบทางไฟฟ้าก็ได้มีการศึกษาในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ยังได้มีการปรับปรุงความคงตัวของอิเล็กโทรด โดยอาศัยสารกลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมประสานเอนไซม์

Abstract

The purpose of this work was to improve the sensitivity of a glucose sensor for determination of glucose concentration by electrodeposition of platinum electrode in 5 mg/ml ruthenium solution in 0.1 M KCl at a constant potential of -0.4 V vs Ag/AgCl for 10 minutes, and then this electrode was used in the construction of a glucose sensor by immobilization enzyme glucose oxidase (GOD) in polymer films of polyphenylenediamine (PPD) with the electropolymerization technique. The ruthenium coating provides an increased current response from the oxidation of hydrogen peroxide, as compared with a bare platinum electrode. The sensitivity of this electrode is 1.4 μA/mM (the response was about 55.6% higher for glucose when the electrode was loaded with ruthenium). Response to glucose was linear in the range of 0-14 mM. The amount of ruthenium solution and deposition times were investigated. Stability of this enzyme electrode could be improved by glutaraldehyde as a cross-linking agent binding to enzyme in polymerized film.

1. บทนำ

แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ หรือเซนเซอร์ที่มีการตรึงสารชีวภาพบนทรานส์ดิวเซอร์ชนิดขั้วของแข็ง เช่น ขั้วแพลตินัม (Pt) ขั้วทอง (Au) หรือขั้วคาร์บอน เป็นต้น เซนเซอร์ชนิดนี้ใช้ในการตรวจวัดปริมาณของสารตัวอย่างโดยอาศัยการวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันที่ผิวหน้าของขั้วอิเล็กโทรด เมื่อมีการป้อนค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมให้แก่ขั้วอิเล็กโทรด ซึ่งการวัดปริมาณของสารตัวอย่างด้วยวิธีแอมเพอโรเมตริก

* ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

มักจะประสบกับปัญหาในการวัดคือ สารแทรกสอด (interferences) บางชนิดที่รวมอยู่ในสารละลายที่ต้องการตรวจวัดหรือวิเคราะห์อาจจะสามารถเกิดการออกซิไดส์ได้ภายใต้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนทำให้ค่าที่วัดได้ไม่ถูกต้อง ในการปรับปรุงแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์สามารถทำได้โดยใช้วิธีการตรึง (immobilization)ที่เหมาะสมในการตรึงสารชีวภาพบนขั้วอิเล็กโทรดหรือ ทรานส์ดิวเซอร์ [1-2] หรือใช้วิธีการปรับปรุงผิวหน้าของอิเล็กโทรดเพื่อเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอิเล็กโทรดในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนระหว่างชั้นของสารชีวภาพกับทรานส์ดิวเซอร์ [3-5]

ไบโอเซนเซอร์ที่มีการพัฒนาขึ้นมาเป็นส่วนมากคือกลูโคสไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งในการวัดน้ำตาลกลูโคสจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมีไฟฟ้าของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสต่อน้ำตาลกลูโคส) ที่ผิวหน้าของขั้วอิเล็กโทรด และการเกิดออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยตรงที่ผิวหน้าของขั้วอิเล็กโทรดนั้นจะเกิดขึ้นได้ยาก ต้องใช้ศักย์ไฟฟ้าสูงถึง +0.9 V สำหรับขั้วอิเล็กโทรดคาร์บอนเทียบกับขั้วอิเล็กโทรดคาโลเมลอิ่มตัว SCE (saturated calomel electrode) และประมาณ +0.8 V สำหรับอิเล็กโทรดแพลตินัม [6] จึงได้มีการปรับปรุงผิวหน้าของอิเล็กโทรด เช่น อาศัยสารมีเดียเตอร์ (mediator) [7-8] เพื่อช่วยในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนระหว่างบริเวณเร่งของเอนไซม์กับผิวหน้าของอิเล็กโทรดและช่วยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนมีค่าลดลง นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการใช้ฟิล์มของโลหะเคลือบบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดด้วยวิธีการเกาะติดทางไฟฟ้าเพื่อช่วยเพิ่มสัญญาณการตอบสนองของเซนเซอร์ เช่น การเคลือบด้วยแพลตินัมบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดต่างๆ อาทิเช่น อิเล็กโทรดคาร์บอนชนิด RVC (reticulated vitrious carbon) [9] อิเล็กโทรดแกลสซี-คาร์บอน (glassy carbon) [10] และอิเล็กโทรดแพลตินัม [11] เป็นต้น การเคลือบด้วยอนุภาคของโลหะบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดจะได้ผิวหน้าที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา (catalytic surface) โดยฟิล์มของโลหะจะทำหน้าที่เสมือนเป็นบริเวณเร่ง (catalytic sites) สำหรับการเกิดออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นได้ที่ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำลง และการเคลือบด้วยฟิล์มของโลหะยังเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของอิเล็กโทรดมีผลให้สัญญาณของกระแสที่วัดได้เพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งช่วงการตอบสนองเชิงเส้น (linear range) ของอิเล็กโทรดต่อปริมาณของสารที่ต้องการวัดวิเคราะห์จะกว้างขึ้นด้วย

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการเคลือบด้วยรูทีเนียมบนขั้วอิเล็กโทรดแพลตินัม (Pt/Ru) และอิเล็กโทรดที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการเตรียมเป็นกลูโคสไบโอเซนเซอร์โดยการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส GOD (glucose oxidase) ภายในฟิล์มโพลีเมอร์ของ poly (1,3-DAB) หรือโพลีฟีนิลีนไดอะมีน PPD (polyphenylenediamine) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลีเมอไรเซชัน อิเล็กโทรดที่ได้นี้ (Pt/Ru/PPD/GOD) จะถูกนำไปตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลกลูโคส เปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดที่ไม่ได้ผ่านการรูทีไนซ์ (Pt/PPD/GOD) โดยทำการเปรียบเทียบในแง่ของสัญญาณการตอบสนองที่ตรวจวัดได้ นอกจากนี้ยังได้มีการปรับปรุงในแง่ของความคงตัวของอิเล็กโทรดโดยอาศัยสารกลูตารัลดีไฮด์ทำหน้าที่เชื่อมประสานเอนไซม์ภายในฟิล์มโพลีเมอร์

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์

เครื่อง Potentiostat/Galvanostat (AUTOLAB PGSTAT10) และระบบ 3 ขั้วอิเล็กโทรด คือขั้วอิเล็กโทรดแพลตินัม (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm) ทำหน้าที่เป็นขั้วทำงาน (working electrode) ขั้วอิเล็ก โทรดอ้างอิง Ag/AgCl และขั้วอิเล็กโทรดเคาท์เตอร์ (counter electrode) เป็นเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ถูกนำมาใช้ในระบบทางเคมีไฟฟ้าในงานวิจัยนี้

2.2 สารเคมี

2.2.1 เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส GOD (glucose oxidase, E.C. 1.1.3.4) จาก Aspergillus niger 200,000 units/g solid จาก Sigma

2.2.2 1,3-ไดอะมิโนเบนซีน (1,3-diaminobenzene) หรือ 1,3-DAB จาก Fluka

2.2.3 กลูตารัลดีไฮด์ จาก Fluka

2.2.4 $RuCl_3$ จาก Fluka

2.3 ทดลองเคลือบรูทีเนียมบนผิวหน้าของขั้วแพลตินัมด้วยวิธีการเกาะติดทางไฟฟ้า

ก่อนทำการเคลือบด้วยรูทีเนียม อิเล็กโทรดแพลตินัมจะถูกนำมาขัดด้วยผงขัดอะลูมินาแล้วล้างด้วย

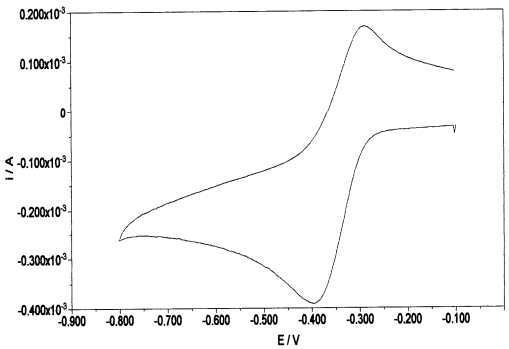
น้ำกลั่น และกำจัดอนุภาคที่อาจจะยังหลงเหลืออยู่บนผิวหน้าของขั้วแพลตินัมด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี CV (cyclic voltammetry) โดยการป้อนค่าศักย์ไฟฟ้าในช่วง -1.5 V และ +1.5 V เป็นเวลา 10 นาที ให้แก่ขั้วแพลตินัม ในสารละลายของกรดซัลฟูริก 1.0 M (ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง) แล้วล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากอิออน จากนั้นนำขั้วแพลตินัมมาทำการเคลือบผิวหน้าด้วย รูทีเนียมโดยวิธีการเกาะติดทางไฟฟ้า ด้วยการป้อนค่า ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -0.4 V ให้แก่ขั้วแพลตินัมที่จุ่มอยู่ใน สารละลายของรูทีเนียมปริมาณ 2.5-10 mg/ml ใน สารละลายของ 0.1 M KCl เป็นระยะเวลา 5-30 นาที ภายหลังการเคลือบเสร็จสิ้นแล้วล้างอิเล็กโทรดที่ได้ (Pt/Ru) ด้วยน้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากอิออน และแช่ อิเล็กโทรดไว้ใน 0.1 M ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ก่อนนำมาทำการตรึงเอนไซม์ต่อไป

2.4 ตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนขั้วอิเล็กโทรด Pt/Ru

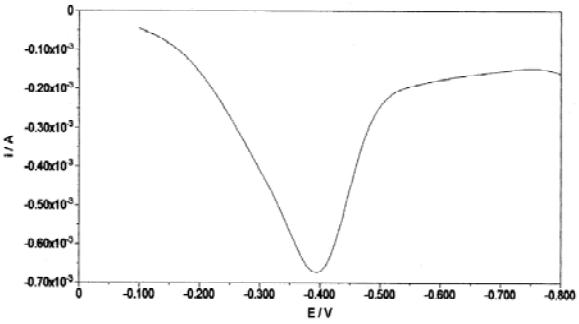
อิเล็กโทรดที่ได้ทำการเคลือบด้วยรูทีเนียมแล้ว ถูกนำมาตรึงเอนไซม์โดยการกักเอนไซม์ไว้ในฟิล์มโพลีเมอร์ของ PPD ด้วยวิธีอิเล็กโตรโพลีเมอไรเซชั่น (electro-polymerization) โดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าคงที่เท่ากับ +0.65 V ให้แก่ขั้วอิเล็กโทรด Pt/Ru ที่จุ่มอยู่ในสารละลายของ 30 mM 1,3-DAB และ 25 units/ml ของเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดส ในสารละลายของ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นเวลา 3 นาที ในสภาวะที่ ปราศจากแสงและออกซิเจน [1] แล้วล้างอิเล็กโทรดด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำอิเล็กโทรดที่ได้ภายหลังตรึง เอนไซม์แล้ว (Pt/Ru/PPD/GOD) ไปวางไว้ในไออิ่มตัวของกลูตารัลดี-ไฮด์เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วย น้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากอิออน และเก็บอิเล็กโทรดไว้ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ 4°C เมื่อไม่มี การใช้งาน

2.5 การตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส

วัดปริมาณของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีแอมเพอโรเมตริก [1] โดยการป้อนศักย์ไฟฟ้า + 0.6 V ให้แก่ขั้วอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GODเทียบกับขั้วอ้างอิง Ag/AgCl ในสารละลายของ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 ml



รูปที่ 3.1 ออกซิเดชัน-รีดักชันพีคของรูทีเนียม จากการสแกนด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรีของขั้วแพลตินัมในสารละลาย 2.5 mg/ml ของสารละลายรูทีเนียมในสารละลายของ 0.1 M KCl อัตราเร็วในการสแกน 10 mV/s



รูปที่ 3.2 แสดงโวลแทมโมแกรมของรูทีเนียมด้วยขั้วแพลตินัมในสารละลายของรูทีเนียม

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

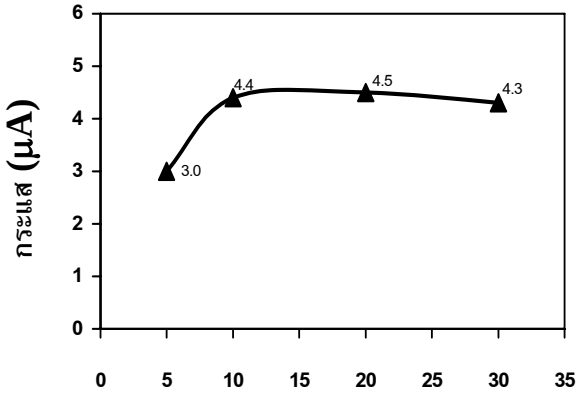
3.1 ผลจากการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารละลายรูทีเนียม

ก่อนทำการเคลือบผิวหน้าของขั้วอิเล็กโทรดแพลตินัม จะทำการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ของสารละลายรูทีเนียมโดยวิธี CV ด้วยการป้อนค่าศักย์ ไฟฟ้าในช่วง -0.8 V ถึง -0.1 V ให้แก่ขั้วแพลตินัมที่จุ่มอยู่ ในสารละลายของรูทีเนียม ให้ผลการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 3.1 และจากการศึกษาด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรีได้ โวลแทมโมแกรมดังแสดงในรูปที่ 3.2 จากโวลแทมโมแกรม ที่ได้เมื่อทำการสแกนจากค่าศักย์ไฟฟ้า -0.100 V ไปยัง -0.8 V พบว่าปฏิกิริยารีดักชันของรูทีเนียมจะเกิดขึ้นที่ค่า ศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.4 V และจากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้เมื่อ

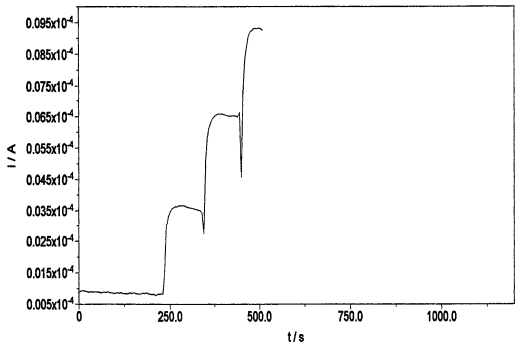
ทำการสแกน จากค่าศักย์ไฟฟ้า -0.1 V ไปยัง -0.8 V (พีคล่าง) ให้รีดักชันพีคที่ค่าศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.4 V เช่นกัน สำหรับออกซิเดชันพีค (พีคบน) จะเกิดขึ้น ที่ค่าศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.3 V (เมื่อสแกนในทิศทาง ที่กลับกันคือสแกนจากค่าศักย์ไฟฟ้า -0.8 ไปยังค่าศักย์ ไฟฟ้า -0.1 V) จากรีดักชันพีคที่ได้แสดงให้เห็นว่าเกิดการ เกาะติดของรูทีเนียมบนผิวหน้าของขั้วแพลตินัมที่ค่าศักย์
ไฟฟ้าประมาณ -0.4 V

3.2 ผลการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเกาะติดรูทีเนียมบนผิวหน้าของขั้วแพลตินัม

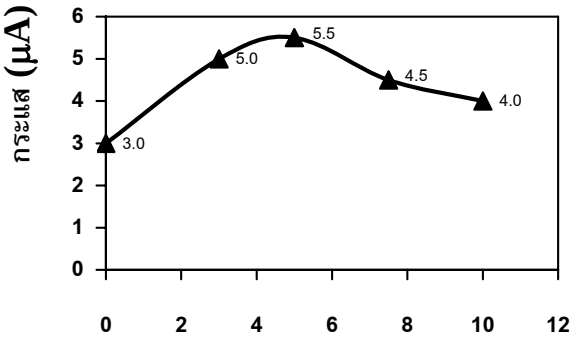
เอนไซม์อิเล็กโทรดที่ได้ผ่านการเคลือบผิวหน้าของแพลตินัมด้วยรูทีเนียมที่ระยะเวลาต่างๆ จะถูกนำไปตรวจวัดการตอบสนองของอิเล็กโทรด โดยนำไปตรวจวัด ในน้ำตาลกลูโคสให้ผลการตรวจวัดดังแสดงในรูปที่ 3.3 และลักษณะของสัญญาณการตอบสนองได้แสดงไว้ใน รูปที่ 3.4 ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเกาะติดรูทีเนียม จาก 5 นาที เป็นระยะเวลา 10 นาที กลูโคสเซนเซอร์ที่ได้ จะให้สัญญาณการตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเกาะติดรูทีเนียมบนผิวหน้าของขั้วแพลตินัมนานขึ้น จะทำให้มี การเกาะติดของรูทีเนียมเพิ่มขึ้น ดังนั้นพื้นที่ผิวเร่งของ อิเล็กโทรดจะมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มบริเวณเร่ง (catalytic site) ในการช่วยเร่ง



รูปที่ 3.3 สัญญาณการตอบสนองของ Pt/Ru/PPD/GOD ที่ได้ทำการเกาะติดด้วยรูทีเนียม (สารละลายรูทีเนียม 7.5 mg/ml) ที่ระยะเวลาต่างๆในการวัดน้ำตาลกลูโคส 4 mM



รูปที่ 3.4 ลักษณะของสัญญาณที่ได้จากการวัดน้ำตาลกลูโคสด้วยขั้วอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD โดยการฉีดน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 2 M ครั้งละ 10 μl ลงในสารละลายของ 0.1 M ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7



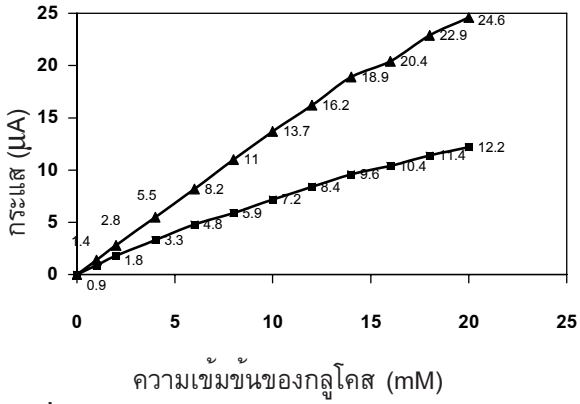
รูปที่ 3.5 สัญญาณการตอบสนองของ Pt/Ru/PPD/GOD ที่ได้ทำการเกาะติดรูทีเนียมในปริมาณต่างๆในระยะเวลา 10 นาที ในการวัดน้ำตาลกลูโคส 4 mM

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ อีกทั้งการเพิ่มพื้นที่ผิวของอิเล็กโทรดก็จะ เป็นการเพิ่มพื้นที่ในการเคลือบฟิล์มโพลีเมอร์ด้วย ซึ่งจะ ส่งผลให้มีปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเพิ่มขึ้น ทำให้ สัญญาณที่วัดได้สูงขึ้นตามไปด้วย แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลา ในการเกาะติดด้วยรูทีเนียมมากกว่า 10 นาที สัญญาณที่ วัดได้ก็ไม่ได้เพิ่มสูงขึ้นแต่อย่างใด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ปริมาณของรูทีเนียมที่มากขึ้นอาจทำให้เกิดการต้านทาน ต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ผลการศึกษาปริมาณของสารละลายรูทีเนียมที่ใช้ในการเกาะติดบนผิวหน้าของขั้วแพลตินัมจากผลการทดลองในรูปที่ 3.5 แสดงสัญญาณการ ตอบสนองของกลูโคสเซนเซอร์ที่ได้เกาะติดด้วยรูทีเนียมในปริมาณต่างๆ คือ 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/ml พบว่าเมื่อ

เพิ่มปริมาณของรูทีเนียมจาก 0 mg/ml จนถึง 5 mg/ml สัญญาณการตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสของขั้วอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น อาจเป็นเพราะว่าเมื่อปริมาณของรูทีเนียมมากขึ้น จะทำให้รูทีเนียมเกาะติดบนผิวหน้าของแพลตินัมอิเล็กโทรดมากขึ้น เป็นการเพิ่มบริเวณเร่งสำหรับการเกิดออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้สัญญาณกระแสที่วัดได้มีค่าสูงขึ้น แต่เมื่อใช้ปริมาณของรูทีเนียมมากขึ้น สัญญาณที่วัดได้จะมีค่าลดต่ำลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อปริมาณของรูทีเนียมมีมากขึ้นอาจส่งผลให้เกิดการต้านทานต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอน

3.4 ผลการศึกษาสัญญาณการตอบสนองของอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ต่อปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

จากผลการทดลองในข้อ 3.3 พบว่าอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ที่ได้ทำการเกาะติดรูทีเนียมบนผิวหน้าของแพลตินัมอิเล็กโทรด โดยการป้อนศักย์ไฟฟ้า -0.4 V ให้แก่ขั้วแพลตินัมในสารละลายของรูทีเนียมปริมาณ 5 mg/ml ในระยะเวลา 10 นาที อิเล็กโทรดที่ได้เคลือบด้วยรูทีเนียมที่สภาวะดังกล่าวนี้ให้สัญญาณตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุด เมื่อนำกลูโคสเซนเซอร์ที่มีการเกาะติดด้วยรูทีเนียม (Pt/Ru/PPD/GOD) ไปวัดน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ จะได้ค่ากระแสจากการวัดดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.6 พบว่าเอนไซม์อิเล็กโทรดที่ไม่ได้เกาะติดด้วยรูทีเนียมให้ค่ากระแสจากการวัดน้ำตาลกลูโคสต่ำกว่าอิเล็กโทรดที่ติดด้วยรูทีเนียม นอกจากนี้จะเห็นว่าการเกาะติดด้วยรูทีเนียมบนผิวหน้าของแพลตินัมก่อน



รูปที่ 3.6 สัญญาณการตอบสนองของ Pt/Ru/PPD/GOD (▲) ต่อน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นตั้งแต่ 1-20 mM เปรียบเทียบกับ Pt/PPD/GOD (■)

ตารางที่ 3.1 ผลของการเกาะติดด้วยรูทีเนียมบนขั้วแพลตินัมที่มีต่อสัญญาณกลูโคส

อิเล็กโทรด	ความชัน (μA/mM)	เปอร์เซ็นต์การเพิ่มของสัญญาณ
Pt/PPD/GOD	0.9	-
Pt/Ru/PPD/GOD	1.4	55.6

ที่จะทำการตรึงเอนไซม์นอกจากจะให้สัญญาณการตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นแล้ว อิเล็กโทรดที่ได้ยังสามารถตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย (ช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงกว้างขึ้น) ซึ่งพบว่าอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ให้การตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสอย่างเชิงเส้นในช่วง 0-14 mM และอิเล็กโทรด Pt/PPD/GOD ให้การตอบสนองต่อกลูโคสอย่างเชิงเส้นในช่วง 0-8 mM กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่มีการเกาะติดด้วยรูทีเนียมจะให้สัญญาณการตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นเป็น 55.6% จากตารางที่ 3.1 เมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดที่ไม่ได้เกาะติดด้วยรูทีเนียม ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าโลหะรูทีเนียมที่ติดอยู่บนผิวของแพลตินัมช่วยให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและน้ำตาลกลูโคส) เกิดขึ้นได้เร็วขึ้น โดยโลหะรูทีเนียมจะทำหน้าที่ช่วยส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกับอิเล็กโทรดแพลตินัม ทำให้ขนาดของสัญญาณที่วัดได้มีค่าสูงขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3.6 นอกจากนี้อิเล็กโทรดที่มีการเกาะติดด้วยรูทีเนียมยังให้การตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสในช่วงกว้างขึ้นเป็น 0-14 mM (เทียบกับอิเล็กโทรด Pt/PPD/GOD ให้การตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-8 mM) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการติดด้วยรูทีเนียมบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดจะเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการตรึงเอนไซม์ ทำให้มีปริมาณของเอนไซม์มากขึ้นจึงสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงขึ้นได้อีก

3.5 ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีต่อความคงตัวของอิเล็กโทรด

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.2 แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลต่อความคงตัวของทั้งสองอิเล็กโทรด คืออิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD และอิเล็กโทรด Pt/PPD/GOD เมื่ออิเล็กโทรดทั้งสองถูกเก็บ

ตารางที่ 3.2 ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อความคงตัวของอิเล็กโทรด

อิเล็กโทรด	กระแส, μA (ก่อนเก็บ)	กระแส, μA (หลังเก็บใน 10 mM กลูโคส 24 ชั่วโมง)
Pt/PPD/GOD	7.2	6.5
Pt/Ru/PPD/GOD	13.7	12.4

อยู่ในสารละลายของกลูโคส 10 mM และทำการป้อนค่าศักย์ไฟฟ้า +0.6 V ให้แก่ขั้วอิเล็กโทรดทั้งสองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากสภาวะดังกล่าวนี้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ถูกตรึงอยู่บนผิวหน้าของอิเล็กโทรดจะเร่งปฏิกิริยาต่อน้ำตาลกลูโคส และเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกลูโคโนแลคโตนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นอยู่ภายในสารละลายที่มีอิเล็กโทรดจุ่มอยู่ ภายหลัง 24 ชั่วโมง พบว่าสัญญาณการตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสของอิเล็กโทรดทั้งสองมีค่าลดลงประมาณ 10% แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลต่อสัญญาณการวัดกลูโคส อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าการเกาะติดด้วยรูทีเนียมบนอิเล็กโทรดก็ไม่ได้มีผลแต่อย่างใดต่อความคงตัวของอิเล็กโทรด (พบว่าอิเล็กโทรดที่เกาะติดด้วยรูทีเนียมและอิเล็กโทรดที่ไม่ได้เกาะติดรูทีเนียมให้ค่าสัญญาณการตอบสนองต่อน้ำตาลกลูโคสลดลงเท่ากันคือประมาณ 10% โดยได้รับผลมาจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่านั้น) และสัญญาณการตอบสนองของกลูโคสเซนเซอร์ต่อน้ำตาลกลูโคสจะยังคงเหลืออยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในโพลีเมอร์ของ poly(1,3-DAB) โพลีเมอร์นี้จะช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ทำให้อิเล็กโทรดยังคงมีความคงตัวสูงอยู่ แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์บางส่วนอาจถูกทำลายไปได้บ้างด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.6 ผลของกลูตารัลดีไฮด์ที่มีต่อความคงตัวของอิเล็กโทรด

เมื่อนำอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ที่เตรียมได้ไปวางไว้ในไออิ่มตัวของกลูตารัลดีไฮด์แล้วนำไปตรวจวัดในสารละลายของ 10 mM กลูโคส โดยทำการป้อนศักย์ไฟฟ้า +0.6 V แก่ขั้วอิเล็กโทรดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดสัญญาณที่ได้เปรียบเทียบกับอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ที่ไม่ใช้กลูตารัลดีไฮด์ ให้ผลการทดลองดังใน

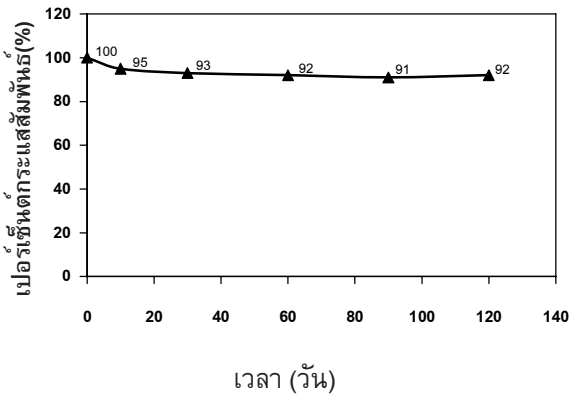
ตารางที่ 3.3 ผลของกลูตารัลดีไฮด์ต่อความคงตัวของอิเล็กโทรด (เปรียบเทียบระหว่างอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ที่มีกลูตารัลดีไฮด์และอิเล็กโทรดที่ไม่มีกลูตารัลดีไฮด์)

อิเล็กโทรด	กระแส, μA (ก่อนเก็บ)	กระแส, μA (หลังเก็บใน 10 mM กลูโคส 24 ชั่วโมง)
Pt/Ru/PPD/GOD (มีกลูตารัลดีไฮด์)	13.7	13.0
Pt/Ru/PPD/GOD (ไม่มีกลูตารัลดีไฮด์)	13.7	12.4

ตารางที่ 3.3 จะเห็นว่าอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ที่อาศัยกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้ให้สัญญาณของกระแส จากการวัดกลูโคสมีค่าลดลงประมาณ 5% (Pt/Ru/PPD/GOD ที่ไม่มีกลูตารัลดีไฮด์ให้สัญญาณการตอบสนองต่อกลูโคสลดลง 10%) แสดงให้เห็นว่าอิเล็กโทรดที่อาศัยกลูตารัลดีไฮด์จะมีความคงตัวสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลูตารัลดีไฮด์จะทำหน้าที่ช่วยยึดเอนไซม์ไว้กับฟิล์มโพลีเมอร์ทำให้เอนไซม์ติดแน่นยิ่งขึ้นบนอิเล็กโทรด

3.7 ความคงตัวของกลูโคสเซนเซอร์ที่อาศัยสารกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้

อิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ที่ใช้สารกลูตารัลดีไฮด์ทำหน้าที่เชื่อมประสานเอนไซม์ไว้ภายในฟิล์มโพลีเมอร์



รูปที่ 3.7 ความคงตัวของอิเล็กโทรด Pt/Ru/PPD/GOD ที่อาศัยกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้ที่ระยะเวลาต่างๆ ในการเก็บอิเล็กโทรดใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ 4˚C

(PPD) นั้นพบว่าภายหลังเก็บอิเล็กโทรดไว้เป็นเวลา 10 วัน ในสารละลายของ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ 4°C ให้สัญญาณการวัดน้ำตาลกลูโคสมีค่าลดลงประมาณ 5% และหลังจากเก็บอิเล็กโทรดไว้เป็นระยะเวลา 30 วัน สัญญาณที่วัดได้จะมีค่าลดลงประมาณ 10% และสัญญาณที่วัดได้จะคงที่แม้ทำการเก็บไว้เป็นเวลา 120 วัน จากผลการทดลองในรูปที่ 3.7

4. สรุป

จากการทดลองสร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสไว้ภายในฟิล์มโพลีเมอร์ของ poly(1,3-DAB) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลีเมอไรเซชัน ฟิล์มโพลีเมอร์จะทำหน้าที่กักเอนไซม์ไว้ภายในเป็นการเพิ่มความคงตัวให้แก่อิเล็กโทรดได้ในระดับหนึ่ง อีกทั้งด้วยลักษณะฟิล์มบางของโพลีเมอร์ที่เคลือบอยู่บนผิวหน้าอิเล็กโทรดก็จะส่งผลให้ใช้เวลาในการตอบสนองสั้น อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเกาะติดด้วยรูทีเนียมบนผิวหน้าของขั้วอิเล็กโทรดแพลตินัมก่อนที่จะมีการตรึงเอนไซม์จะเป็นการช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการตรึงเอนไซม์ให้สูงขึ้นได้ อีกทั้งรูทีเนียมที่ติดอยู่บนผิวอิเล็กโทรดยังช่วยในการส่งถ่ายอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์กับผิวหน้าแพลตินัมให้รวดเร็วยิ่งขึ้น ดังนั้นจะเห็นว่าอิเล็กโทรดที่มีการติดด้วยรูทีเนียมจะให้ความไว (sensitivity) ในการตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าอิเล็กโทรดที่ปราศจากรูทีเนียม และด้วยความสามารถในการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าอิเล็กโทรดได้ในปริมาณที่สูงขึ้นยังส่งผลให้ช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงต่อน้ำตาลกลูโคสกว้างขึ้นด้วย และเนื่องจากในกระบวนการตรวจวัดนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์อาจจะทำให้ฟิล์มโพลีเมอร์หรือเอนไซม์ถูกทำลายได้ในการทดลองนี้ยังได้มีการปรับปรุงในแง่ของความคงตัวของอิเล็กโทรดโดยอาศัยสารกลูตารัลดีไฮด์ทำหน้าที่เชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับฟิล์มโพลีเมอร์ทำให้เอนไซม์ถูกยึดอย่างแข็งแรงยิ่งขึ้นบนผิวหน้าของขั้วอิเล็กโทรด

เอกสารอ้างอิง

1. Klinchan, S., et al. “Construction of Sensor Chips by Electrochemi-calpolymerization Techniques for Sucrose Determination.” *The Journal of KMITNB.* 12, 1 (2002) : 12-16.
2. Sasso, S.V., et al. “Electropolymerized 1,2-Diaminobenzene as a Means To Prevent Interferences and Fouling and To Stabilize Immobilized Enzyme in Electrochemical Biosensors.” *Anal. Chem.* 62 (1990) : 111-117.
3. Reynolds, E.R. and Yacynych, A.M. “Direct Sensing Platinum Ultramicrobiosensors for Glucose.” *Biosensors & Bioelectronics.* 9 (1994) : 283-293.
4. Heider, G.H., et al. “Electrochemical Platinization of Reticulated Vitreous Carbon Electrodes To Increase Biosensor Response.” *Anal. Chem.* 62 (1990) : 1106-1110.
5. Wang, J. and Chen, Q. “Ultrathin Porous Carbon Films as Amperometric Transducers for Biocatalytic Sensors.” *Anal. Chem.* 66 (1994) : 1988-1992.
6. Ianniello, R.M. and Yacynych, A.M. *Anal. Chem.* 53 (1981) : 2090-2095.
7. Yokoyama, K., Shibasaki, T. and Murakami, Y. “Electrochemical Characterization of Enzyme Electrodes Mediated by Ferrocene-Containing Acrylamide-Acrylic Acid Copolymers.” *Denki Kagaku.* 64,12 (1996) : 1221-1227.
8. Geise, R.J., Rao, S.Y. and Yacynych, A.M. “Electropolymerized 1,3-Diaminobenzene for the Construction of a 1,1(-Dimethylferrocene Mediated Glucose Biosensor.” *Analytica Chimica Acta.* 281 (1993) : 467-473.
9. Will, F. and Iacovangelo, C.J. *Electrochem. Soc.* 131 (1984) : 590.
10. Gunasingham, H. and Tan, C. *Electroanalysis.* 1 (1989) : 223-227.
11. Ikariyama, Y., et al. *J. Electrochem. Soc.* 136 (1986) : 702-706.