

## การตรวจวัดกรดแอสคอร์บิก ในระบบที่มีการรบกวนสัญญาณจากโดพามีน และกรดยูริก โดยใช้ แกรฟีนออกไซด์และกรดอะมิโนซีรีน

### Detection of Ascorbic acid in the Interference of Dopamine and Uric acid using Graphene Oxide and Amino Serine

พัทธนันท์ อึ้งคณิตานนท์<sup>1</sup> สราวุธ ชื่นคำ<sup>2</sup> วชระ เลี้ยวเรียน<sup>1,3,4</sup> และ ปิยะพงษ์ อะสะนิธิ<sup>1,3,4\*</sup>

Pattanan Oungkanitanon<sup>1</sup> Sarawut Cheunkar<sup>2</sup> Watchara Liewrian<sup>1,3,4</sup> and Piyapong Asanithi<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10140

<sup>2</sup>คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10150

<sup>3</sup>ศูนย์ความเป็นเลิศด้านฟิสิกส์ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา 328 ถ. ศรีอยุธยา

<sup>4</sup>ศูนย์วิทยาศาสตร์เชิงทฤษฎีและการคำนวณ อาคารปฏิบัติการวิทยาศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า  
ธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10140

<sup>1</sup>Faculty of Science, Department of Physics, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140

<sup>2</sup>School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140

<sup>3</sup>ThEP Center, Commission of Higher Education, 328 Si Ayuthaya Rd.

<sup>4</sup>Theoretical and Computational Science Center (TaCS), Science Laboratory Building, Faculty of Science, King  
Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140

\*E-mail: piyapong.asa@mail.kmutt.ac.th

Received: 06 Jan, 2020

Revised: 23 Feb, 2021

Accepted: 26 Mar, 2021

#### บทคัดย่อ

กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, AA) เป็นสารอาหารที่จำเป็นซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อร่างกายมนุษย์ โดยทั่วไปในพลาสมาของมนุษย์ AA จะอยู่ร่วมกับโดพามีน (dopamine, DA) และกรดยูริก (uric acid, UA) ศักย์เคมีไฟฟ้าของ AA DA และ UA มักจะซ้อนทับกันและไม่สามารถแยกแยะได้ จึงเป็นไปได้ที่จะสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของ AA ได้อย่างแม่นยำในสารละลายที่มี DA และ UA งานวิจัยนี้จึงประยุกต์ใช้กรดอะมิโนซีรีน (serine, SER) และแกรฟีนออกไซด์ (graphene oxide, GO) สำหรับตรวจวัด AA ในขณะที่มีสัญญาณรบกวนของสารละลายผสม DA และ UA โดยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี โดยใช้อิเล็กโทรด GO/SPE เตรียมได้จากนำ GO เคลือบลงบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode, WE) ของขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed electrodes, SPE) ต่อมาเคลือบผิวหน้า GO/SPE ด้วย SER โดยการทำให้เคลือบโวลแทมเมตรีของ GO/SPE ในสารละลาย SER จำนวน 10 รอบเพื่อให้ได้ SER-GO/SPE สมบัติทางกายภาพและทางเคมีไฟฟ้าของ GO/SPE และ SER-GO/SPE ถูกวิเคราะห์ด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด และเทคนิคอิเล็กโตรเคมีคอลลิเมตชันสเปกโตรสโกปี ตามลำดับ ผลโวลแทมเมตรีพบว่า SER-GO/SPE สามารถแยกสัญญาณศักย์ไฟฟ้าปฏิกิริยาออกซิเดชันของ AA DA และ UA ออกจากกันอย่างชัดเจนที่ตำแหน่ง 50.57 mV, 365.73 mV, และ 524.55 mV ตามลำดับ และค่าช่วงความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear range) ของการตรวจวัด AA ที่อยู่ในสารละลาย DA (50  $\mu$ M) และ UA (50  $\mu$ M) อยู่ในช่วง 0.08 mM - 90 mM ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) มีค่า 0.021 mM เทคนิคนี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับการตรวจหากรดแอสคอร์บิกในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การวินิจฉัยทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร

**คำสำคัญ:** แกรฟีนออกไซด์ กรดแอสคอร์บิก กรดอะมิโนซีรีน เคมีไฟฟ้า

#### Abstract

Ascorbic acid (AA) is an essential nutrient playing an important role in human body. In human plasma, AA generally coexists with dopamine (DA) and uric acid (UA) and their electrochemical potentials are typically superposed and indistinguishable. So, it is impossible to detect AA precisely in the solution contained DA and UA. In this research, serine (SER) and graphene oxide (GO) were used for detecting AA in the interference of DA and UA

through differential pulse voltammetry. The GO/SPE was prepared by coating GO on the working electrode (WE) of a screen-printed electrode (SPE). The GO/SPE was then modified with SER using cyclic voltammetry of GO/SPE in SER solution for ten cycles to obtain SER-GO/SPE. Physical and electrochemical properties of GO/SPE and SER-GO/SPE were analyzed by scanning electron microscopy and electrochemical impedance spectroscopy. The voltammetry results showed that SER-GO/SPE was able to separate the oxidation peak potentials of AA, DA and UA into three well-defined peaks at 50.57 mV, 365.73 mV and 524.55 mV, respectively. The calibration curve of AA detection in the presence of DA (50  $\mu$ M) and UA (50  $\mu$ M) was in a range of 0.08 - 90 mM and the limit of detection (LOD) was 0.021 mM. The proposed technique may be useful for the detection of ascorbic acid in various fields, including medical diagnostic and food industry.

**Keywords:** Amino serine, Ascorbic acid, Electrochemistry, Graphene oxide

## 1. บทนำ

กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, AA) หรือวิตามินซี (vitamin C) เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายของมนุษย์ เนื่องจากร่างกายไม่สามารถผลิตได้เอง [1,2] จึงต้องได้รับจากการรับประทานผักและผลไม้ เช่น ส้ม มะเขือเทศ แตงโม องุ่น อโวคาโด เป็นต้น วิตามินซีมีส่วนช่วยในการส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ การรักษาบาดแผล สร้างกระดูกและฟัน สร้างระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญอีกด้วย ด้วยเหตุนี้ภาวะการขาดหรือผิดปกติของระดับวิตามินซีในกระแสเลือดจึงเป็นสาเหตุให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคเลือดออกตามไรฟัน โรคลักปิดลักเปิด ร่างกายอ่อนเพลีย และอาการหลอดเลือดฝอยขาดความยืดหยุ่นไม่แข็งแรง ซึ่งโดยทั่วไปปริมาณของวิตามินซี ในพลาสมา เซลล์เม็ดเลือดแดง และน้ำลาย ควรอยู่ในช่วงประมาณ 1.70-11.36 mM [3]

โดยทั่วไปสามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินซีได้หลายวิธี โดยวิธีที่ง่ายและต้นทุนต่ำ ได้แก่ การไทเทรต (titration) อย่างไรก็ตามการไทเทรตเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่อาจมีปัญหาเรื่องความแม่นยำ (accuracy) ในการตรวจวัด สำหรับวิธีการที่ให้ความแม่นยำสูงในการตรวจวัด ได้แก่ เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) [4], เทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography) [5], เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) [6] เป็นต้น ถึงแม้ว่าเทคนิคเหล่านี้จะให้ผลการตรวจวัดที่ถูกต้องและแม่นยำ แต่มีข้อเสียคือการเตรียมตัวอย่างมีความซับซ้อน เครื่องมือและอุปกรณ์มักมีราคาแพง เนื่องจากวิตามินซีเป็นสารที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงทำให้ในหลายปีที่ผ่านมา มีงานวิจัยจำนวนมากพยายามพัฒนาวิธีตรวจวัดวิตามินซีโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (electrochemistry) เพราะเป็นเทคนิคที่ให้ความแม่นยำสูง

ช่วยลดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง ลดต้นทุนการวิเคราะห์ และสามารถเลือกความเข้มข้นของสารได้ในช่วงกว้าง [7] อีกทั้งยังสามารถพัฒนาให้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดแบบพกพาได้ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจวัดปริมาณวิตามินซีด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้ายังมีความท้าทายเนื่องจากสัญญาณศักย์ไฟฟ้าออกซิเดชันของวิตามินซีมักซ้อนทับกับสัญญาณของสารอื่น ๆ ที่ปะปนอยู่ในพลาสมา หรือของเหลวในร่างกาย เช่น โดพามีน (dopamine, DA) และ กรดยูริก (uric acid, UA) ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นที่ศึกษา และพัฒนาวัสดุเคลือบผิวขั้วไฟฟ้าเพื่อให้สามารถแยกสัญญาณการตรวจวัดวิตามินซีออกจากสารรบกวนตัวอื่น ๆ [7]

ที่ผ่านมาบทความวิจัยจำนวนมากรายงานการใช้วัสดุคาร์บอนประเภทต่าง ๆ สำหรับเคลือบผิวขั้วไฟฟ้า เพราะคาร์บอนมีช่วงศักย์ไฟฟ้าที่กว้าง และไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่น ๆ ได้ง่าย ในบรรดาวัสดุคาร์บอนทั้งหลาย แกรฟีน (graphene) และรีดิวซ์แกรฟีน (reduced graphene oxide) ได้รับความสนใจในการนำมาปรับปรุงผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าจำนวนมาก แต่แกรฟีนออกไซด์ (graphene oxide, GO) ซึ่งมีสมบัติทางไฟฟ้าและทางเคมีต่างไปจากแกรฟีน และรีดิวซ์แกรฟีนออกไซด์ ยังมีการศึกษาไม่มากนัก [8], [9] ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจนำแกรฟีนออกไซด์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดกรดแอสคอร์บิก ในสภาวะที่มีสัญญาณรบกวนของโดพามีนและกรดยูริก

แกรฟีนออกไซด์ เป็นแกรฟีนที่มีหมู่ฟังก์ชันทางเคมี [10] เช่น อีพอกซี (epoxy) ไฮดรอกซิล (hydroxyl) คาร์บอนิล (carbonyl) และคาร์บอกซิลิก (carboxylic) อยู่บริเวณขอบและบนแผ่นแกรฟีน ดังแสดงใน Figure 1(A) เมื่อเคลือบแกรฟีนออกไซด์บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน จะทำให้ขั้วไฟฟ้ามีผิวหน้าแบบชอบน้ำ (hydrophilic surface) และยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว (surface area) ที่จำเป็นต่อการเพิ่ม

ประสิทธิภาพในการตรวจวัดให้สูงขึ้น ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่า การเคลือบผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยแกรฟีนออกไซด์และวัสดุอื่นที่เกี่ยวข้อง ช่วยเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิดได้ เช่น Gözde และคณะ [11] ทำการเคลือบอนุภาคเงินนาโน ลงบนขั้วไฟฟ้าชนิดแกรฟีนออกไซด์ (GO) และศึกษาพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปของสัญญาณเคมีไฟฟ้าในสารละลายผสม AA, DA, UA และ ทริพโตเฟน (tryptophan, Trp) ในคราวเดียวกัน ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกสัญญาณ AA, DA, UA และ Trp ได้ Du และคณะ [12] ศึกษาความสามารถในการตรวจวัด AA, DA และ UA โดยทำการปลูกแกรฟีนที่มีลักษณะคล้ายดอกไม้ (graphene flower) ลงบนขั้วไฟฟ้าทำงานที่เป็นคาร์บอนไฟเบอร์ และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี สามารถสังเกตเห็นสัญญาณของ AA, DA และ UA ในสารตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะ (urine) และน้ำเหลือง (serum) ได้เป็นอย่างดี Sun, L.C. และคณะ [13] ศึกษาความสามารถในการตรวจวัด AA, DA และ UA ของวัสดุประกอบบิวดิซแกรฟีนออกไซด์ (reduced graphene oxide, rGO)/อนุภาคแพลทินัม (platinum, Pt) ขนาดนาโนเคลือบลงบนพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าทำงานและทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่า rGO/Pt สามารถตรวจวัด AA, DA และ UA ได้เป็นอย่างดี Feng, S. และคณะ [14] ศึกษาความสามารถในการตรวจวัด AA, DA และ UA โดยใช้แกรฟีนแอโรเจลที่ถูกเจือด้วยหมูไนโตรเจน (nitrogen-doped graphene aerogel) พบว่าสามารถตรวจวัดสัญญาณเคมีไฟฟ้าของ AA, DA และ UA ได้ในขณะเดียวกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้วัสดุแกรฟีนหรือวัสดุประกอบของแกรฟีนสามารถตรวจวัด AA, DA และ UA ได้

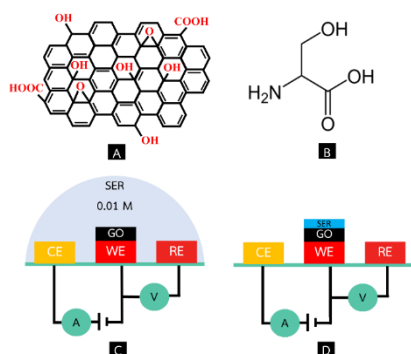
นอกจากนี้ ยังพบว่าการปรับสภาพผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงานด้วยสารชีวโมเลกุล (biomolecule) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสัญญาณปฏิกิริยาออกซิเดชันของ AA, DA และ UA ได้ เช่น Rahman และคณะ [15] เตรียมฟิล์มพอลิเมอร์ poly(thionine) จากกรดอะมิโน L-tyrosine บนขั้วไฟฟ้าทำงานโดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่าสามารถตรวจวัด AA, DA และ UA ได้ในเวลาเดียวกัน และการปรับสภาพผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยสารชีวโมเลกุลยังช่วยเพิ่มความเร็วในการตรวจวัด Chitravathi, S. และคณะ [16] ได้ทำการปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงาน โดยใช้ L-serine เคลือบบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงานสำหรับตรวจวัด AA และ DA ผลการทดลองพบว่า L-serine ทำให้ศักย์ไฟฟ้าเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ AA และ DA สามารถแยกจากกันได้

งานวิจัยนี้ ศึกษาความสามารถในการตรวจวัด AA ในระบบที่มีสารรบกวนจาก DA และ UA ซึ่งเป็นการศึกษาพัฒนาต่อยอดจากการศึกษาของ Chitravathi และคณะ [16] โดยมีการเคลือบแกรฟีนออกไซด์ลงบนขั้วไฟฟ้าทำงานก่อนและหลังจากนั้นเคลือบ L-serine บนแกรฟีนออกไซด์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยเพิ่มผลกระทบของ UA เข้าไปในระบบ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนพิมพ์สกรีน (screen printed carbon electrode, SPE) ลักษณะทางกายภาพของขั้วไฟฟ้าหลังจากการเคลือบแล้วจะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) และ เทคนิคอิมพีแดนซ์สเปกโตรสโคปีเชิงเคมีไฟฟ้า electrochemical impedance spectroscopy, EIS) และศึกษาความสามารถในการตรวจวัดและแยกแยะสารแต่ละชนิดด้วยเทคนิคไซคลิก โวลแทมเมตรี (cyclic voltammetry, CV) และเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ โวลแทมเมตรี (differential pulse voltammetry, DPV)

## 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM, Nova Nano SEM450) กำหนดให้ค่าศักย์ไฟฟ้าสำหรับเร่งลำอิเล็กตรอน (accelerating voltage) ที่ 5 กิโลโวลต์ เครื่องมือวัดทางเคมีไฟฟ้า potentiostat รุ่น versa stat 4 (Princeton Applied Research) เพื่อใช้ศึกษาสัญญาณไฟฟ้าเคมีด้วยเทคนิค cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) และ electrochemical impedance spectroscopy (EIS) ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นชนิดคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed carbon electrodes: SPE, Quasense) ประกอบไปด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode, WE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode, CE) และ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode, RE) ชนิดเงิน/เงินคลอไรด์ (Ag/AgCl) (Figure 1(C) และ (D))



**Figure 1** (A) Chemical structure with functional groups of GO. (B) Chemical structure of amino serine. (C) Preparation of SER modified GO-coated WE (SER-GO/SPE) using cyclic voltammetry. (D) the SER on the GO-coated at WE of SPE after 10 cycles of cyclic voltammetry.

## 2.2 การสังเคราะห์ Graphene Oxide (GO)

แกรฟีนออกไซด์สังเคราะห์โดยใช้วิธีของฮัมเมอร์ (Hummers' method) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้ เริ่มจาก นำผงแกรไฟต์ 1 กรัม และโซเดียมไนเตรต 0.5 กรัม (99%, Ajax Finechem) ผสมกับกรดซัลฟิวริกปริมาณ 23 มิลลิลิตร (95%, Qrec) ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และเติมโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (99%, Ajax Finechem) จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน และปรับอุณหภูมิ 98 °C จนสีของส่วนผสมกลายเป็นสีน้ำตาล เจือจางด้วยน้ำและ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% และล้างด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริกและน้ำจะได้สารแขวนลอยแกรฟีนออกไซด์ค่า pH 6 สำหรับนำไปใช้งาน [17]

## 2.3 การเตรียม Graphene Oxide (GO) ลงบนขั้วไฟฟ้าทำงานของ SPE (GO/SPE)

การเคลือบขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) ทำโดยหยดสารละลายแกรฟีนออกไซด์ ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาณ 2  $\mu$ L ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงาน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 °C ทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน ทำซ้ำทุกขั้นตอนข้างต้น ทั้งหมด 4 รอบ เพื่อให้มีความหนาของแกรฟีนออกไซด์ที่เท่ากันในแต่ละครั้งของการทดลอง และจะได้ GO/SPE สำหรับการนำไปใช้งานในลำดับถัดไป

## 2.4 ขั้นตอนการเตรียมกรดอะมิโนซีรีนเพื่อเคลือบลงบน GO/SPE

สารละลายกรดอะมิโนซีรีนที่ใช้ในการเคลือบผิวขั้วไฟฟ้ามีความเข้มข้น 0.01 M ซึ่งเตรียมโดยละลายกรดอะมิโนซีรีนในบัฟเฟอร์ PBS ที่มีค่า pH 7.4 หลังจากนั้นหยด

สารละลายกรดอะมิโนซีรีน 200  $\mu$ L ลงบนขั้ว GO/SPE ดังแสดงใน Figure 1(C) หลังจากนั้นใช้เทคนิค CV ป้อนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -1 ถึง 1 โวลต์ ที่ scan rate 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที (mV/s) เป็นจำนวน 10 รอบ ซึ่งจะเรียกขั้วไฟฟ้าในขั้นตอนนี้ว่า SER-GO/SPE

สำหรับการเตรียม SER/SPE ใน Figure 3 และ 4 นั้นเตรียมโดยหยดสารละลายกรดอะมิโนซีรีน (ความเข้มข้น 0.01 M, ปริมาตร 200  $\mu$ L) ลงบน SPE หลังจากนั้นใช้เทคนิค CV ป้อนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -1 ถึง 1 โวลต์ ที่ scan rate 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที (mV/s) เป็นจำนวน 10 รอบ

## 2.5 ขั้นตอนการเตรียมกรดแอสคอร์บิก (AA) โดพามีน (DA) และ กรดยูริก (UA)

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของวิตามินซีบนขั้วไฟฟ้าที่ถูกเคลือบด้วยสารชนิดต่าง ๆ จะถูกศึกษาในสารละลายผสมที่มี AA ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.08 mM ถึง 90 mM DA และ UA ที่ความเข้มข้นคงที่ 50  $\mu$ M ใน PBS ที่ค่า pH 7.4

## 3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 3.1 การศึกษาลักษณะพื้นผิวของ GO/SPE, SER/SPE และ SER-GO/SPE

Figure 2 แสดงภาพพื้นผิวที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของขั้วไฟฟ้าทำงานที่เคลือบด้วยแกรฟีนออกไซด์ (GO/SPE) กรดอะมิโนซีรีน (SER/SPE) และกรดอะมิโนซีรีนบนแกรฟีนออกไซด์ (SER-GO/SPE) โดยผิวหน้าของ GO/SPE (Figure 2(A)) ถูกปกคลุมด้วย GO ที่มีลักษณะเป็นแผ่นซ้อนทับกัน [18] Figure 2(B) แสดงกรดอะมิโนซีรีนที่อยู่บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงาน SER/SPE ผิวหน้ามีลักษณะขรุขระและมีลักษณะคล้ายกับฟิล์มบางของกรดอะมิโนซีรีนเคลือบบนขั้วไฟฟ้า Figure 2(C) แสดงภาพของ GO/SPE หลังจากเคลือบผิวขั้วไฟฟ้าด้วยกรดอะมิโนซีรีน (SER-GO/SPE) พบว่าลักษณะผิวหน้ามีลักษณะขรุขระ พื้นผิวไม่สม่ำเสมอ โดยบริเวณที่มีความสว่างอาจเนื่องจากการสะสมของประจุบนผิว (charging effect)

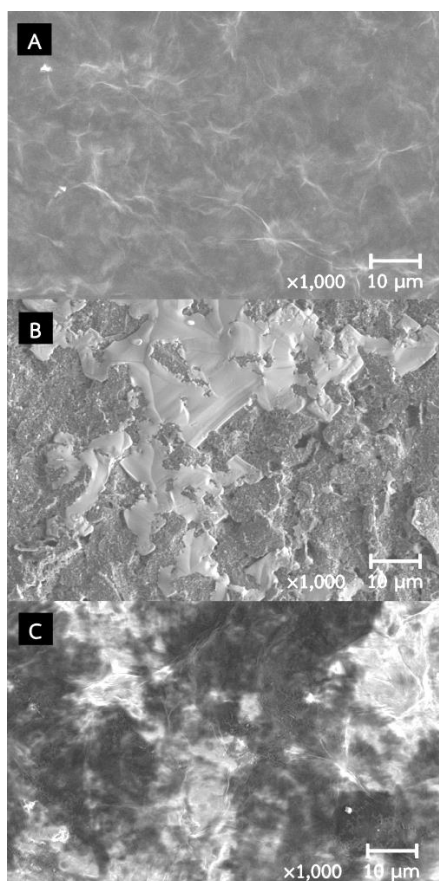


Figure 2 SEM images of (A) GO/SPE, (B) SER/SPE and (C) SER-GO/SPE

### 3.2 การศึกษาสภาพความต้านทานการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (charge transfer resistance) เมื่อเคลือบกรดอะมิโนซีรีนบน GO / SPE ด้วยเทคนิค electrochemical impedance spectroscopy (EIS)

ความต้านทานการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (charge transfer resistance,  $R_{ct}$ ) ของขั้วไฟฟ้าที่ถูกเคลือบผิวหน้าด้วยกรดอะมิโนซีรีนด้วยเทคนิค CV จำนวน 10 รอบ (SER-GO/SPE) เปรียบเทียบกับ GO/SPE ที่ไม่ได้เคลือบกรดอะมิโนซีรีน (GO/SPE) และกรดอะมิโนซีรีนเคลือบบนขั้วไฟฟ้าทำงาน (SER/ SPE) ศึกษาด้วยเทคนิค electrochemical impedance spectroscopy (EIS) แสดงดัง Figure 3

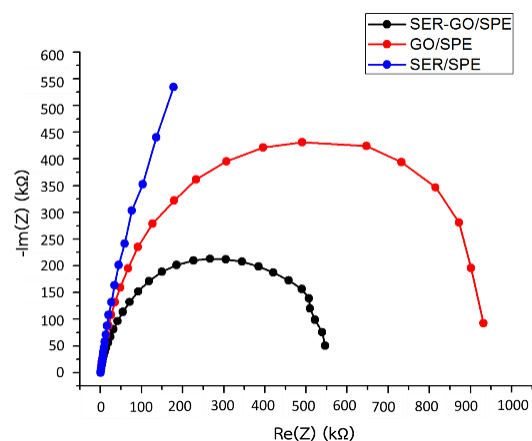


Figure 3 Nyquist plot of SER- GO/ SPE, GO/SPE and SER/SPE in PBS solution (pH 7.4)

จาก Figure 3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ความสามารถในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของ SER-GO/SPE, GO/SPE, และ SER/SPE ในสารละลาย PBS ด้วยเทคนิค EIS ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอิมพีแดนซ์ส่วนจริง (real impedance) และอิมพีแดนซ์ส่วนจินตภาพ (imaginary impedance) พบว่าค่า  $R_{ct}$  ของ SER-GO/SPE และ GO/SPE มีค่าเท่ากับ 540.80 kΩ และ 984.90 kΩ ตามลำดับ และ SER/SPE ไม่แสดงลักษณะเส้นโค้งครึ่งวงกลม (semi-circle) บ่งชี้ให้เห็นว่ามีสภาพความต้านทานต่ำ [19]

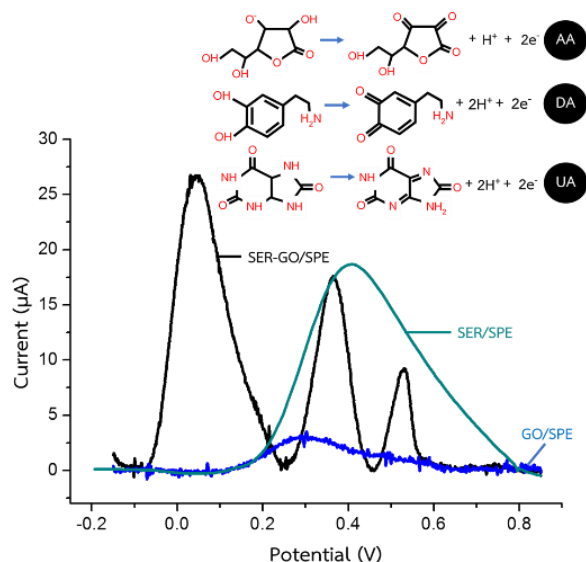
อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบระหว่าง SER-GO/SPE และ GO/SPE แล้วจะพบว่ากรดอะมิโนซีรีนบน GO/SPE โดยการทำให้ CV จำนวน 10 รอบ ส่งผลให้ SER-GO/SPE มีสภาพการถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่สูงขึ้น เมื่อเทียบกับ GO/SPE ที่มีสภาพการนำไฟฟ้าที่ต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุล SER มีความเป็นขั้วจึงนำไปสู่เกิดการเจือ (dope) เซมิคอนดักเตอร์และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับเฟอร์มี (fermi level) [20-22] ในโครงสร้างอิเล็กทรอนิกส์ของแกรไฟีนออกไซด์ทำให้ความหนาแน่นของอนุภาคพาหะมีค่าสูงขึ้น ส่งผลให้การนำไฟฟ้าของ SER-GO/SPE ดีขึ้น

### 3.3 ศึกษาความสามารถในการตรวจวัด AA ในระบบที่มีการรบกวนสัญญาณจาก DA และ UA ในสารละลาย PBS ที่มีค่า pH 7.4

#### 3.3.1 เปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวัด AA, DA และ UA ของ SER/SPE, GO/SPE และ SER-GO/SPE

ในการทดลองนี้ เทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลเพอร์เรนท์เฟสโวลแทมเมตรี (differential pulse voltammetry, DPV)

ถูกใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของ SER/SPE, GO/SPE และ SER-GO/SPE ต่อความสามารถในการตรวจวัดและการแยกสัญญาณจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ AA, DA และ UA โดยใช้สารละลายผสมที่มี AA ค่าความเข้มข้น 10 mM ในระบบที่มีการรบกวนสัญญาณจาก DA (50  $\mu$ M) และ UA (50  $\mu$ M) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS, pH 7.4)



**Figure 4** DPV results of SER- GO/SPE, SER/SPE and GO/SPE in the mixtures contained 10- mM AA, 50- $\mu$ M DA and 50- $\mu$ M UA in PBS (pH 7.4)

ผลการทดลอง (Figure 4) พบว่าชีวไฟฟ้าที่ถูกเคลือบด้วย GO/SPE และ SER/SPE ไม่สามารถแยกสัญญาณศักย์ไฟฟ้าของ AA, DA และ UA ออกจากกันได้ ในขณะที่ SER-GO/SPE สามารถแยกศักย์ไฟฟ้าของสารทั้ง 3 ตัวออกจากกันอย่างชัดเจน โดยตำแหน่งศักย์ไฟฟ้าของ AA, DA และ UA อยู่ที่ค่า ประมาณ 50.57 mV, 365.73 mV, และ 524.55 mV ตามลำดับ [23] และมีช่วงศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่าง AA-DA, DA-UA และ AA-UA คือ  $\Delta E_{pa}$  AA-DA มีค่า 311.00 mV  $\Delta E_{pa}$  DA-UA มีค่า 162.80 mV และ  $\Delta E_{pa}$  AA-UA มีค่า 473.80 mV นอกจากนี้ยังพบว่าค่ากระแสไฟฟ้าออกซิเดชันของ SER-GO/SPE มีค่าสูงกว่า GO/SPE แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มกรดอะมิโนซีรีนเข้าไปสามารถช่วยเพิ่มสัญญาณเคมีไฟฟ้าได้ และ SER-GO/SPE ให้ค่ากระแสไฟฟ้าปฏิกิริยาออกซิเดชันของ AA, DA และ UA ประมาณ 26.50 17.34 และ 8.97  $\mu$ A ตามลำดับ ดังนั้นการเคลือบชีวไฟฟ้าด้วยกรดอะมิโนซีรีนด้วยเทคนิค CV จำนวน

10 รอบสามารถเพิ่มความสามารถของชีวไฟฟ้าในการตรวจวัดและแยกแยะสารแต่ละชนิดได้

นอกจากนี้ยังพบอีกว่า หากทำการเคลือบกรดอะมิโนซีรีนลงบน GO/SPE ด้วยจำนวนรอบของการทำ CV มากกว่า 10 รอบ เช่น 15 และ 20 รอบ ก็ยังสามารถวัดค่ากระแสไฟฟ้าออกซิเดชันได้ แต่จะทำให้ความสามารถในการแยกแยะสัญญาณของทั้ง 3 สาร มีค่าลดลง เช่น ระยะห่างของค่าศักย์ไฟฟ้า ( $\Delta E_{pa}$ ) ของแต่ละสัญญาณมีค่าลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเคลือบกรดอะมิโนซีรีนบน GO/SPE มากกว่า 10 รอบอาจจะทำให้ชั้นเคลือบกรดอะมิโนซีรีนหนาขึ้นส่งผลกระทบต่อสภาพการถ่ายโอนอิเล็กตรอน เช่น ทำให้มีการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนระหว่างสารโมเลกุลกับชีวไฟฟ้าน้อยลง ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้จำนวนรอบในการเคลือบกรดอะมิโนซีรีนลงบน GO/SER จำนวน 10 รอบ ซึ่งเป็นเงื่อนไขที่ดีที่สุดในการทดลองสำหรับศึกษาในลำดับถัดไป

3.3.2 ศึกษาการตรวจวัด AA ที่ค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ในระบบที่มีการรบกวนสัญญาณจากโดพามีน DA 50  $\mu$ M และ UA 50  $\mu$ M โดยใช้ SER-GO/SPE

การทดลองใช้สารละลายผสมของ AA, DA และ UA โดยกำหนดความเข้มข้นของ AA มีค่าเปลี่ยนไป ส่วนค่าความเข้มข้นของ DA และ UA มีค่าคงที่ ซึ่งค่าความเข้มข้นของ AA ที่ใช้สาริตินี้มีค่าความเข้มข้น 0.08-90 mM ส่วนความเข้มข้นของ DA กับ UA จะมีความเข้มข้นคงที่ 50  $\mu$ M โดยใช้ เทคนิค DPV ค่า scan rate 50 mV/s ในการวิเคราะห์ความสามารถในการตรวจวัด แสดงดัง Figure 5 และ Figure 6 แสดงค่าความเข้มข้นของ AA ที่ใช้สาริตินในช่วงความเข้มข้น 0.08-10 mM ความเข้มข้นของ DA กับ UA จะมีความเข้มข้นคงที่ 50  $\mu$ M

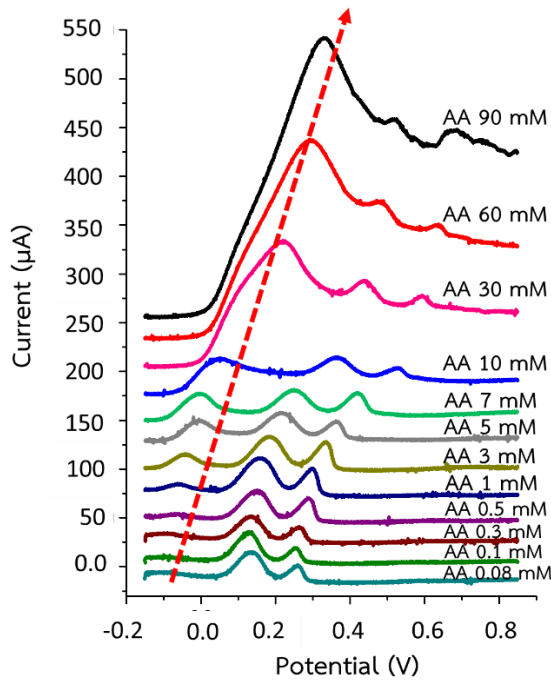


Figure 5 DPV results of AA detection from 0.08 - 90 mM in the 50-μM DA and 50-μM UA in PBS (pH 7.4).

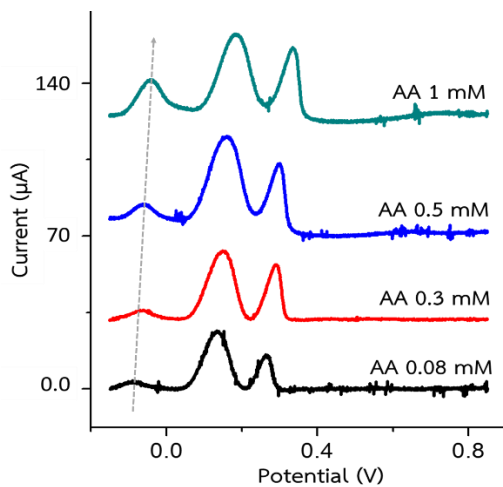


Figure 6 DPV results of AA detection from 0.08 - 1 mM in the 50-μM DA and 50-μM UA in PBS (pH 7.4).

จากการวิเคราะห์ตำแหน่งความต่างศักย์ของ AA, DA และ UA พบว่า SER-GO/SPE สามารถแยกสัญญาณของสารสามชนิดได้ เรียงจากศักย์ไฟฟ้าต่ำไปสูง ซึ่งคือ AA, DA และ UA ตามลำดับ โดยค่าศักย์ไฟฟ้าของสัญญาณออกซิเดชันของ AA, DA และ UA มีค่าเลื่อนเข้าสู่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่สูงขึ้นเมื่อค่าความเข้มข้นของ AA เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากอัตราการถ่ายเทอิเล็กตรอนของระบบมีค่าลดลงในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น [9], [12]

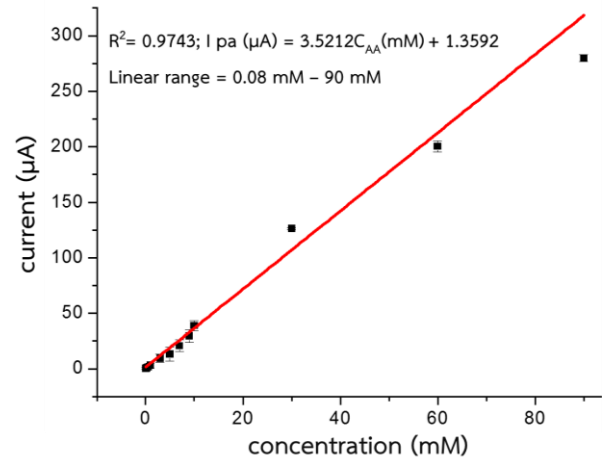


Figure 7 Calibration curve of AA detection in the contamination of DA and UA

ค่าสัญญาณกระแสไฟฟ้าออกซิเดชันของ AA มีค่าเพิ่มขึ้นตามค่าความเข้มข้นของ AA โดยสามารถตรวจวัดสัญญาณได้ตั้งแต่ 0.08 mM ไปจนถึง 90 mM Figure 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ AA และสัญญาณกระแสไฟฟ้าออกซิเดชัน ( $I_{pa}$ ) ของ AA ซึ่งมีลักษณะแบบเชิงเส้น  $I_{pa} (\mu A) = 3.5212C_{AA}(mM) + 1.3592$  โดยค่า correlation coefficient มีค่า  $R^2 = 0.9743$  และค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) มีค่า 0.021 mM

#### 4. สรุปผลการวิจัย

การใช้แกรฟีนออกไซด์และกรดอะมิโนซีรีนเคลือบลงบนผิวหน้าของขั้วทำงานไฟฟ้าของ SPE ข้างต้นแสดงให้เห็นว่า มีศักยภาพในการตรวจวัด AA ในสารละลายผสม DA และ UA ได้เป็นอย่างดี ซึ่งการเคลือบกรดอะมิโนซีรีนบนขั้วไฟฟ้า GO/SPE ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี จำนวน 10 รอบ จะทำให้ได้ค่ากระแสไฟฟ้าออกซิเดชันของสารที่ต้องการตรวจวัดได้สูงขึ้น ช่วยเพิ่มความสามารถในการการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของระบบได้เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันเคมีของกรดอะมิโนซีรีนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ AA, DA และ UA ทำให้ AA, DA และ UA เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่แตกต่างกัน จึงทำให้สามารถแยกสัญญาณออกซิเดชันของทั้ง 3 สารได้ในสารละลาย PBS (pH 7.4) ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ของ AA มีค่า 0.021 mM ดังนั้น การปรับปรุงผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงานของ SPE ด้วยกรดอะมิโนซีรีนและแกรฟีนออกไซด์ อาจนำไปสู่การพัฒนาการตรวจวัดสารละลายวิตามินซี ในอาหารหรือในร่างกายได้ หรือแม้กระทั่งพัฒนาองค์ความรู้เพื่อใช้ในการตรวจวัดสารหลายชนิดในขณะที่การตรวจวัดแค่ครั้งเดียวได้



## 5. กิตติกรรมประกาศ

ทุนบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, ทุนวิจัยสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และแผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

## 6. References

- [1] Burns, J. 1957. Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. **Nature**. 180(4585): 553.
- [2] Carr, A.C. and Maggini, S. 2017. Vitamin C and Immune Function. **Nutrients**. 9(11): 1211.
- [3] Jacob, R.A. and Sotoudeh, G. 2002. Vitamin C function and status in chronic disease. **Nutrition in Clinical Care**. 5: 66-74.
- [4] Tang, Y. and Wu, M. 2005. A quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis. **Talanta**. 65(3): 794-798.
- [5] Kim, Y. and Kim, M. 2016. HPLC-UV method for the simultaneous determinations of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in human plasma. **Translational and Clinical Pharmacology**. 24(1): 37-42.
- [6] Chen, Z., Chen, B. and Yao, S. 2006. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. **Analytica Chimica Acta**. 569(1-2): 169-175.
- [7] Aryal, K.P. and Jeong, H.K. 2019. Carbon Nanofiber Modified with Reduced Graphite Oxide for Detection of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid. **Chemical Physics Letters**. 739: 136969.
- [8] Edwards, R.S. and Coleman, K.S. 2013. Graphene synthesis: relationship to applications. **Nanoscale**. 5: 38-51.
- [9] Nair, R.R. and et al. 2008. Fine structure constant defines visual transparency of graphene. **Science**. 320(5881): 1308-1308.
- [10] Aliyev, E. and et al. 2011. Structural characterization of graphene oxide: surface functional groups and fractionated oxidative debris. **Nanomaterials**. 9(8): 1180.
- [11] Tiğ, G.A. 2017. Development of electrochemical sensor for detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and L-tryptophan based on Ag nanoparticles and poly( L- arginine) - graphene oxide composite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 807: 19-28.
- [12] Du, J., Yue, R. and Ren, F. 2014. Novel graphene flowers modified carbon fibers for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Biosensors and bioelectronics**. 53: 220-224.
- [13] Sun, C.L. and et al. 2011. The simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using graphene/size-selected Pt nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**. 26(8):3450-3455.
- [14] Feng, S. and et al. 2021. Holey nitrogen-doped graphene aerogel for simultaneously electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Talanta**. 224:121851.
- [15] Rahman, Md.M. and et al. 2017. Highly sensitive and simultaneous detection of dopamine and uric acid at graphene nanoplatelet-modified fluorine-doped tin oxide electrode in the presence of ascorbic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 792: 54-60.
- [16] Chitravathi, S. and et al. 2011. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid using poly ( L- serine) modified carbon paste electrode. **Journal of Molecular Liquids**. 160(3): 193-199.
- [17] Prongmanee, W., Alam, I. and Asanithi, P. 2019. Hydroxyapatite/Graphene oxide composite for electrochemical detection of L -Tryptophan. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 102: 415-423.



- [18] Zhang, D. and et al. 2017. Electrodeposited reduced graphene oxide incorporating polymerization of L- lysine on electrode surface and its application in simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Materials Science and Engineering**. 70: 241–249.
- [19] Premathilake, D. and et al. 2017. Electric double layer capacitors for ac filtering made from vertically oriented graphene nanosheets on aluminum. **Carbon**. 111: 231-237.
- [20] Prasert, K. and Sutthibutpong, T. 2020. Effects of L- serine amino acid functionalization on electronic properties of a graphene plane in comparison with oxygen functionalization. **Journal of Molecular Modeling**. 26.
- [21] Wang, X. and et al. 2009. N-doping of graphene through electrothermal reactions with ammonia. **Science**. 324(5928): 768– 771.
- [22] Schedin, F. and et al. 2007. Detection of Individual Gas Molecules Adsorbed on Graphene. **Nature Materials**. 6: 652-655.
- [23] Fu, L. and et al. 2018. Defects regulating of graphene ink for electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Talanta**. 180:248-253.