

ระบบโพลีอินเจคชันสำหรับตรวจวัดกลูโคสแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า
กลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบของท่อนาโนคาร์บอนแบบผนังหลายชั้น
ที่มีหมู่อะมิโน-เฟอร์โรซีน-โพรวินซีรั่มอัลบูมิน-กลูโคสออกซิเดส

Flow Injection System for Amperometric Detection of Glucose using MWCNTs-
NH₂-FcCHO-BSA-GOx Nano-composite Modified Glassy Carbon Electrode

เอื้องพร สมพงษ์ และ มะลิวรรณ อมตรงไชย*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34190

*E-mail: amaliwan@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาโกลโคสไบโอเซนเซอร์ที่มีสภาพไวและสามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็วมาใช้เป็นตัวตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรีในระบบโพลีอินเจคชัน การเตรียมโกลโคสไบโอเซนเซอร์อาศัยการสร้างพันธะโคเวเลนต์ของเฟอร์โรซีนคาร์บอกซิลไฮด์กับท่อนาโนคาร์บอนแบบผนังหลายชั้นที่มีหมู่อะมิโนเพื่อช่วยป้องกันการหลุดออกของเฟอร์โรซีนออกจากเมทริกซ์และรักษาสสมบัติของสารนำส่งอิเล็กตรอน จากนั้นเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะถูกตรึงโดยอาศัยการเชื่อมโยงด้วยกลูตารัลไฮด์ในวัสดุเชิงประกอบท่อนาโนคาร์บอนแบบผนังหลายชั้นที่มีหมู่อะมิโน-เฟอร์โรซีน-โพรวินซีรั่มอัลบูมิน แล้วนำไปเคลือบบนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน โกลโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (GC/MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA-GOx) นำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดกลูโคสแบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบโพลีอินเจคชันที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 เป็นสารละลายตัวพา และให้ศักย์ไฟฟ้า +0.6 โวลต์ ผลการศึกษาพบว่าขั้วโกลโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้กราฟมาตรฐานที่มีการตอบสนองแบบเส้นตรงอยู่ในช่วง 2-16 มิลลิโมลาร์ ค่าความชันเท่ากับ 323 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9996 ซึ่งจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.36 มิลลิโมลาร์ (S/N=3) ค่ากระแสที่ได้จากการวัดมีความเที่ยงของการวิเคราะห์โกลโคสเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ซ้ำ 7 ครั้ง (%RSD) เท่ากับ 2.5% และสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วถึง 72 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

คำสำคัญ: โกลโคสไบโอเซนเซอร์, มัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวที่มีหมู่อะมิโน, เฟอร์โรซีน, แอมเพอร์โรเมทรี, โพลีอินเจคชันอะนาลิซิส

Abstract

In this work, a highly sensitive and rapid measurement of a glucose biosensor was developed for amperometric detection in a flow injection system. The biosensor was developed based on ferrocene carboxaldehyde (FcCHO) co-valently bound onto the NH₂-functionalized multi-walled carbon nano-tubes (MWCNTs-NH₂) to prevent ferrocene leakage from the matrix and retention of its activity as an electron mediator. Glucose oxidase (GOx) was immobilized to ferrocene-modified NH₂-functionalized multi-walled carbon nano-tubes and bovine serum albumin (MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA) composite film by using glutaraldehyde (Glu) before being coated on a glassy carbon (GC) electrode. The developed glucose biosensor (GC/MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA-GOx) was applied in the flow injection analysis system for amperometric detection of glucose using a solution of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) as a carrier and applying a potential of +0.6 V. The proposed glucose biosensor exhibited linear calibration over the range of 2-16 mM of glucose with a slope of 323 nA/mM and a correlation coefficient of 0.9996. The detection limit, based on a signal-to-noise ratio (S/N) of three, was 0.36 mM. The developed biosensor also provided good precision (%RSD=2.5) for a glucose signal (0.6 mM, n=7) with a rapid sample throughout (72 samples/h).

Keywords: Glucose biosensor, MWCNTs-NH₂, Ferrocene, Amperometry: Flow injection analysis

1. บทนำ

การวิจัยเพื่อพัฒนาวัสดุโกลโคสไปโอเซนเซอร์ให้มีความถูกต้อง แม่นยำและมีสภาพไวสูงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากปริมาณกลูโคสในปัสสาวะและเลือดสามารถบ่งชี้ถึงสภาวะของโรคเบาหวาน (diabetes) [1], [4] โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะควบคุมระดับกลูโคสในเลือดอย่างเข้มงวดซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการรักษาสสมดุลของร่างกาย ให้มีค่าอยู่ที่ประมาณ 3.6-5.8 มิลลิโมลาร์ หรือ 64.8-104.4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร [5] สมาคมโรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกาแนะนำว่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารควรอยู่ที่ระดับน้อยกว่า 10 มิลลิโมลาร์ (180 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) และระดับกลูโคสในพลาสมา ก่อนรับประทานอาหารควรอยู่ที่ระดับ 5.0-7.2 มิลลิโมลาร์ (90-130 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) [5] การวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานจะใช้เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังการอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง สูงกว่า 7.0 มิลลิโมลาร์ (126 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) การตรวจวัดปริมาณกลูโคสนอกจากจะใช้ในการตรวจและวินิจฉัยทางการแพทย์แล้ว ในขบวนการหมักและผลิตภัณฑ์อาหารปริมาณกลูโคสก็มีความสำคัญเนื่องจากสามารถใช้เป็นดัชนีในการชี้บอกคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ [4]

กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase; GOx) เป็นเอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่ได้รับความสนใจและนิยมนำมาใช้สร้างวัสดุโกลโคสไปโอเซนเซอร์เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงต่อกลูโคสสูง [6] การปรับปรุงประสิทธิภาพของโกลโคสไปโอเซนเซอร์ที่อาศัยการตรึง GOx ในสภาพแวดล้อมที่เข้ากันได้กับชีวภาพและองค์ประกอบอื่นที่ช่วยส่งเสริมการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากับ GOx เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง [4], [7] วัสดุที่นิยมนำมาใช้เป็นเมทริกซ์ (matrix) ในการปรับปรุงประสิทธิภาพของวัสดุโกลโคสไปโอเซนเซอร์ ได้แก่ วัสดุที่มีความสามารถส่งเสริมการถ่ายโอนอิเล็กตรอน เช่น คาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotube; CNTs) และเฟอร์โรซีน (ferrocene; Fc) และวัสดุที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เข้ากันได้กับเอนไซม์ เช่น โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) และไคโตซาน (chitosan; CS) [7], [12]

CNTs ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาดัดแปรขั้วไฟฟ้า เนื่องจากมีพื้นที่ผิวมาก นำไฟฟ้าได้ดี และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์ CNTs จึงกลายเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับช่วยสนับสนุนการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่าง GOx กับผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า

[3],[4], [8], [10] สำหรับการประยุกต์ใช้งาน CNTs สามารถนำมาดัดแปรให้มีคุณสมบัติที่ต้องการโดยการสร้างหมู่ฟังก์ชัน -OH, -COOH หรือ -NH₂ เพื่อปรับปรุงความสามารถในการตรึงสารทางชีวภาพ ได้แก่ โปรตีน เอนไซม์ หรือ ดีเอ็นเอ BSA เป็นโปรตีนที่มีมากในพลาสมา เป็นสารชีวภาพที่ไม่มีพิษ สามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์และช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ จึงนิยมนำมาใช้สร้างโกลโคสไปโอเซนเซอร์อย่างกว้างขวาง [13],[17]

Fc และอนุพันธ์เป็นอีควาล์วหนึ่งที่เป็นที่รู้จักกันดีและถูกนำมาใช้เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอนในการพัฒนาโกลโคสไปโอเซนเซอร์ เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีแบบผันกลับได้ และช่วยให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ ได้ [18],[19] ในการนำ Fc และอนุพันธ์มาดัดแปรขั้วไฟฟ้าโดยกระบวนการดูดซับจะทำให้ขั้วโกลโคสไปโอเซนเซอร์ที่ได้มีความเสถียรค่อนข้างต่ำ เนื่องจากแรงยึดเหนี่ยวบนผิวขั้วไฟฟ้าค่อนข้างอ่อน ทำให้ Fc หลุดออกมาในสารละลายเมื่อใช้โกลโคสไปโอเซนเซอร์อย่างต่อเนื่อง ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของโกลโคสไปโอเซนเซอร์ทำให้ได้สัญญาณค่ากระแสต่ำลงงานวิจัยนี้ได้เสนอวิธีวิเคราะห์กลูโคสด้วยกลูโคสไปโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่จะตรวจวัดรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยการนำเทคนิคโพลีเมอร์เจกชันมาช่วยร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วกลูโคสไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โกลโคสไปโอเซนเซอร์จะตรวจวัดกลูโคสโดยอาศัยการนำเฟอร์โรซีนคาร์บอกซาลิไซด์ หรือ FcCHO มาสร้างพันธะโคเวเลนต์กับ MWCNTs-NH₂ เพื่อป้องกัน Fc หลุดออกจากเมทริกซ์และรักษาแอคติวิตีทางเคมีไฟฟ้า และใช้ BSA เพื่อช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ GOx โดยอาศัยการเชื่อมโยง (cross link) ของ GOx ด้วยกลูตาไรลไฮโดรไลต์เพื่อให้เอนไซม์ถูกตรึงไว้ในวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA-GOx ก่อนนำไปเคลือบบนขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดกลูโคสในระบบโพลีเมอร์เจกชัน ทำให้ได้เทคนิควิเคราะห์กลูโคสที่มีข้อดีคือใช้สารปริมาณน้อยช่วยลดค่าใช้จ่ายและสามารถตรวจวัดได้อย่างต่อเนื่อง รวดเร็วและมีความเที่ยงสูง

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 สารเคมี

โบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA, non acetylated, 20 mg/mL ในน้ำ) จาก Sigma-Aldrich (USA), ท่อนาโนคาร์บอนแบบผนังหลายชั้นที่มีหมู่ฟังก์ชันอะมิโน (MWCNTs-NH₂, บริสุทธิ์ > 95%, เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 + 5 นาโนเมตร, ยาว 1-5 ไมครอน) จาก NanoLab inc. (USA), เอนไซม์

กลูโคสออกซิเดส (GOx type X-S จาก *Aspergillus niger*), เฟอร์โรซีนคาร์บอกซัลดีไฮด์ (Ferrocene-carboxaldehyde; FcCHO, บริสุทธิ์ 98%) กลูตาไรลดีไฮด์ (Glu, บริสุทธิ์ 50%) และ กลูโคส (β -D(+)-glucose) จาก Sigma-Aldrich, โซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ (NaCNBH_3 , บริสุทธิ์ 95%) จาก Acros organics

2.2 อุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่นำมาใช้ในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าประกอบด้วย เครื่องโพเทนชิโอสแตท รุ่น EA 161, e-corder 210 (บริษัท eDAQ, Australia) ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า คือขั้วไฟฟ้าใช้งาน (working electrode) ชนิดกลาสซีคาร์บอน (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร), ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) และขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode) ชนิดลวดแพลทินัม (Pt) (บริษัท CH Instruments, USA.)

ระบบโพลินเจกชันที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรีที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วย บั๊มรุ่น LC-10A D (บริษัท Shimadzu, Japan) สารละลายตัวพา (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์) injection valve ที่มี sample loop ขนาด 20 ไมโครลิตร (บริษัท Rheodyne, USA) thin layer flow cell ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า คือขั้วไฟฟ้าใช้งานกลูโคสไบโอเซนเซอร์ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) และขั้วไฟฟ้าช่วยชนิด stainless steel tube (บริษัท CH Instruments, USA.) และระบบตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

2.3 การสังเคราะห์วัสดุเชิงประกอบของคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่เอมีโน-เฟอร์โรซีน ($\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO}$)

$\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO}$ เตรียมโดยพัฒนามาจากวิธีของ Qiu และคณะ [3] โดยนำ MWCNTs-NH_2 30 มิลลิกรัมมา ทำให้กระจายตัว ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (รุ่น CT360D, บริษัท Scientific promotion) เป็นเวลา 30 นาที นำมาเติมสารละลาย FcCHO ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไป กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นเติม NaCNBH_3 20 มิลลิกรัมแล้วนำไปกวนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำเซนดรีฟวจ์และล้างตะกอนด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร ทั้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้วัสดุเชิงประกอบ $\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO}$

2.4 การเตรียมกลูโคสไบโอเซนเซอร์ GC/ $\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO-BSA-GOx}$

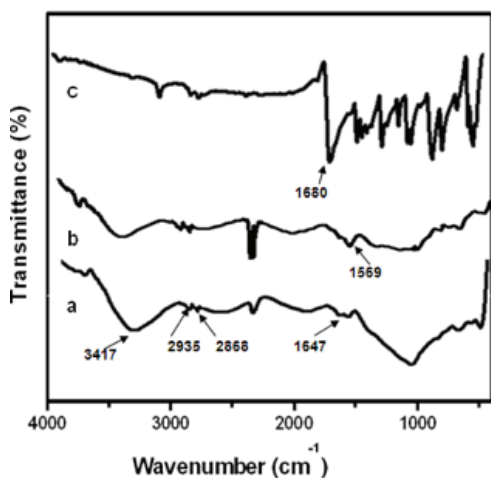
นำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนมาทำความสะอาดโดยขัดผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากับผ้าสักหลาดโดยใช้ผงอะลูมินา ขนาด 1.0, 0.3, และ 0.05 ไมครอนตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5 นาที แล้วเป่าให้แห้ง การเตรียมสารละลายตัดแปรขั้วไฟฟ้าเริ่มจากนำ GOx 7.5 มิลลิกรัม เติมน้ำในสารละลาย 1% BSA ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Glu ความเข้มข้น 2.5% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย $\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO}$ เข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปสั่นผสมด้วยเครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายสำหรับตัดแปรขั้วไฟฟ้า ($\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO-BSA-GOx}$) กลูโคสไบโอเซนเซอร์เตรียมได้โดยเปิดสารละลายสำหรับตัดแปรขั้วไฟฟ้า ปริมาตร 40 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่ทำความสะอาดแล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จะได้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ (GC/ $\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO-BSA-GOx}$)

3 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 คุณลักษณะของ $\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO}$

รูปที่ 1 แสดง FTIR สเปกตรัม ของ MWCNTs-NH_2 (กราฟ a), $\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO}$ (กราฟ b) และ FcCHO (กราฟ c) จาก กราฟ a ในรูปที่ 1 พีคที่ $3,417\text{ cm}^{-1}$ เป็นลักษณะการสั่นแบบยืด-หด (stretching) ของหมู่ N-H และการสั่นแบบกรรไกรในระนาบ (In-plane scissoring vibration) ที่ $1,647\text{ cm}^{-1}$ จากหมู่เอมีนปฐมภูมิ (primary amine) ส่วนพีคที่ $2,868, 2,935\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการสั่นแบบยืด-หด ของ C-H ใน FTIR สเปกตรัมของ FcCHO (กราฟ c) พีคที่ $1,680\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการสั่นของ C=O จากหมู่อัลดีไฮด์ FTIR สเปกตรัม (กราฟ b) ของสารประกอบ $\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO}$ เกิดจาก C=O จากหมู่อัลดีไฮด์ เข้าทำปฏิกิริยากับ -NH_2 บน MWCNTs-NH_2 ที่ผ่านปฏิกิริยา Schiff-base และตามด้วยปฏิกิริยารีดักชันโดยใช้ NaCNBH_3 จะได้สารประกอบในรูป $\text{MWCNTs-NH}_2\text{-FcCHO}$ ซึ่งยืนยันได้ด้วยผลจากสเปกตรัม (กราฟ b) จะไม่ปรากฏพีคที่ $1,647\text{ cm}^{-1}$ ของ MWCNTs-NH_2 (เปรียบเทียบกับกราฟ a) และ พีคที่ $1,680\text{ cm}^{-1}$ ของ FcCHO (เปรียบเทียบกับกราฟ c) เนื่องจากเกิดปฏิกิริยา Schiff-base ระหว่าง -NH_2 และหมู่อัลดีไฮด์ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Qiu และคณะ

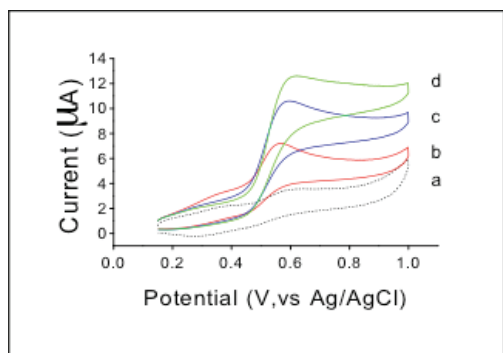
[3] แสดงให้เห็นว่า FcCHO ถูกตรึงลงบนวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO ได้เป็นผลสำเร็จ



รูปที่ 1 แสดง FTIR spectra ของ MWCNTs-NH₂ (กราฟ a), MWCNTs-NH₂-FcCHO (กราฟ b) และ FcCHO (กราฟ c)

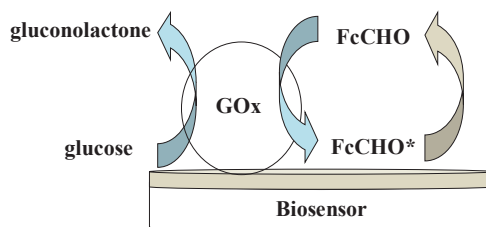
3.2 การตอบสนองทางเคมีไฟฟ้าของขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (GC/MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA-GOx) ต่อกลูโคส

ผลการทดลองจากเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี่ (cyclic voltammetry) ในการศึกษาการตอบสนองของขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ GC/MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA-GOx แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมของกลูโคส ความเข้มข้น (a) 0, (b) 5, (c) 10 และ (d) 15 มิลลิโมลาร์ ที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (GC/MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA-GOx) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 (ภายใต้บรรยากาศก๊าซอาร์กอน)

จากรูปไซคลิกโวลแทมโมแกรม (CV) ที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (รูปที่ 2) พบว่า CV ของไบโอเซนเซอร์ที่มีการเติมกลูโคส 5 มิลลิโมลาร์ ลงในสารละลาย (กราฟ b) ทำให้กระแสออกซิเดชันเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับสารละลายที่ไม่มีกลูโคส (กราฟ a) และค่ากระแสจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้น (กราฟ c-d) กลูโคสสามารถเกิดออกซิเดชันได้โดยมีค่าศักย์ที่ยอดพีคออกซิเดชัน ($E_{p,a}$) ประมาณ 0.6 โวลต์ แสดงว่าวัสดุเชิงประกอบ (MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA) ทำให้ GOx สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคสได้ที่ศักย์ต่ำๆ โดยมี Fc-CHO ที่สร้างพันธะกับ MWCNTs เป็นเมดิเอเตอร์ช่วยนำส่งอิเล็กตรอนระหว่าง active site ของเอนไซม์กับผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cass และคณะ [20] และ Liu และคณะ [11]



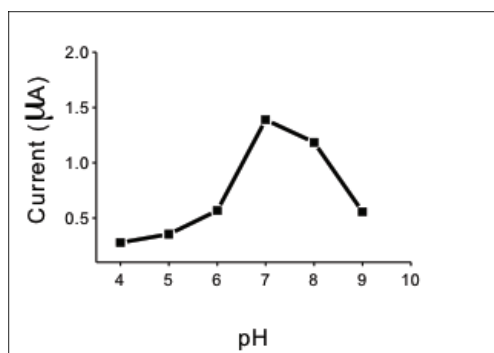
รูปที่ 3 กลไกปฏิกิริยาของไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดกลูโคส

สมการที่เกี่ยวข้อง แสดงได้ดังนี้



3.3 การศึกษาหาพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เหมาะสม

ค่าพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีผลอย่างมากต่อสภาพไวของไบโอเซนเซอร์ เนื่องจากค่าพีเอชมีผลต่อพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของ Fc และไบโอแอคทิวิตี (bio-activity) ของ GOx จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ GOx มักอยู่ที่ช่วงพีเอช 6.5-7.5 [21-22] ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีและวัสดุที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ การทดลองนี้จึงทำการศึกษาค่าพีเอชในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4

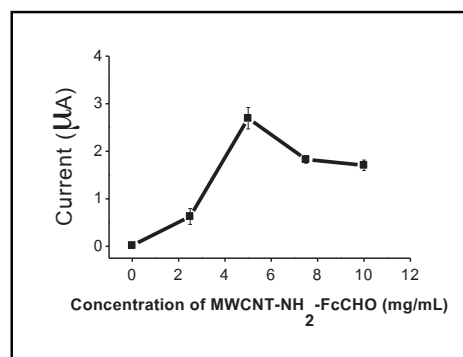


รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส กับค่าพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์

ผลการทดลองจากรูปที่ 4 พบว่าเมื่อพีเอชของสารละลายสูงขึ้น ค่ากระแสจะเพิ่มสูงขึ้นจนถึงพีเอช 7.0 และลดลงเมื่อพีเอชของสารละลายมากขึ้น จากการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าพีเอชของสารละลายมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ GOx กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่ากระแสสูงสุดที่พีเอช 7.0 สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [12], [17], [23],[24] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกค่าพีเอช 7.0 เป็นพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เหมาะสม

3.4 การศึกษาหาความเข้มข้นของวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO ที่เหมาะสม

ในการศึกษาหาปริมาณวัสดุเชิงประกอบที่เหมาะสมในการเตรียมกลูโคสไบโอเซนเซอร์ ผลของปริมาณวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO ต่อการตรวจวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสแสดงดังรูปที่ 5 ค่ากระแสออกซิเดชันในรูป เป็นค่าเฉลี่ยจากซ้ำไฟฟ้าที่เตรียมขึ้น 3 ซ้ำไฟฟ้า ส่วนแถบความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวัด

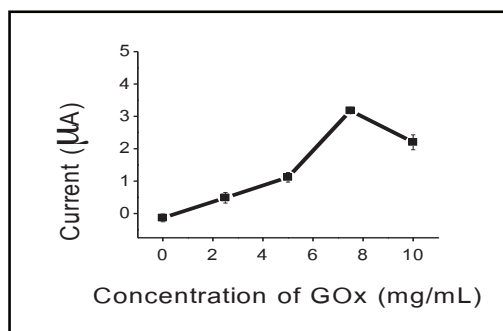


รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสกับความเข้มข้นของวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO ที่ใช้ในการดัดแปรกลูโคสไบโอเซนเซอร์

จากผลการทดลองในรูปที่ 5 พบว่าเมื่อปริมาณวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO เพิ่มขึ้นจาก 0-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรค่ากระแสที่ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO ช่วยปรับปรุงคุณสมบัติการนำไฟฟ้าของฟิล์มคอมโพสิตให้ดีขึ้น ค่ากระแสที่ได้จึงมีค่าสูงขึ้น และให้ค่ากระแสสูงสุดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นค่าลดลงและเริ่มคงที่ ที่ความเข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO ความเข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่ากระแสเริ่มคงที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

3.5 การศึกษาผลของปริมาณกลูโคสออกซิเดส

ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้สร้างไบโอเซนเซอร์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ ผลการศึกษาความเข้มข้นของ GOx ที่ใช้สร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์ต่อสภาพไวของไบโอเซนเซอร์แสดงดังรูปที่ 6

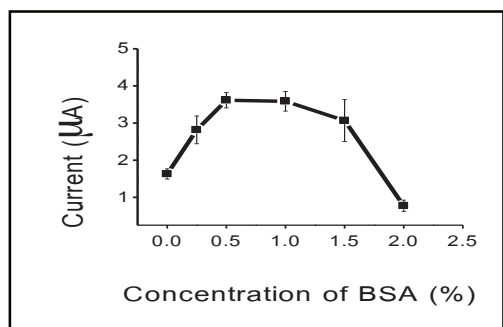


รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส กับความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOx)

จากรูปที่ 6 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ GOx จาก 0-7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่ากระแสออกซิเดชันของกลูโคสที่สูงขึ้นจนถึงที่ความเข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GOx ให้สูงขึ้นอีกค่ากระแสกลับลดลง ซึ่งอาจเกิดจากเมทริกซ์ที่ใช้ตรึงเอนไซม์มีพื้นที่จำกัดจึงสามารถตรึงเอนไซม์ได้จำนวนหนึ่งเท่านั้น เมื่อเติมเอนไซม์ที่มากเกินไปส่งผลให้ความสามารถในการนำไฟฟ้าของวัสดุเชิงประกอบลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tripathi และคณะ [17], [21] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การศึกษาผลของปริมาณสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน

ผลของปริมาณสารละลาย BSA ที่ใช้ในการดัดแปรกลูโคสไบโอเซนเซอร์ต่อค่ากระแสออกซิเดชันของกลูโคสแสดงดังรูปที่ 7



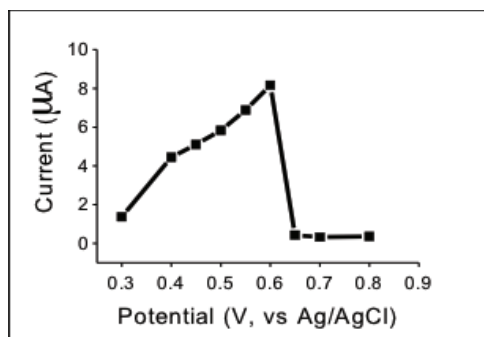
รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส กับความเข้มข้นของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) ที่ใช้ในการเตรียมกลูโคสไบโอเซนเซอร์

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย BSA จาก 0 จนถึง 1% ค่ากระแสที่ได้จะเพิ่มขึ้นและให้ค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.5% แสดงว่า BSA สามารถช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ GOx ได้ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kulys และคณะ [15] ซึ่งพบว่าอัลบูมินสามารถช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในการเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกได้ จากนั้นค่ากระแสจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้น 1% และค่อยลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณของ BSA ซึ่งเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่มากเกินไปส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้าลดลง ค่ากระแสที่ได้จึงลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1% BSA ซึ่งเป็นสภาวะที่ค่ากระแสที่ได้เริ่มคงที่ในการดัดแปรชีวไฟฟ้า

3.7 ศึกษาการตรวจวัดปริมาณกลูโคสแบบแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีเอทิลีน

3.7.1 ศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัดกลูโคส

การนำเทคนิคโพลีเอทิลีนมาใช้ร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอโรเมทรีที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจะทำให้ได้เทคนิควิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดกลูโคส ในการศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัดกลูโคสที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ผลการทดลองดังรูปที่ 8



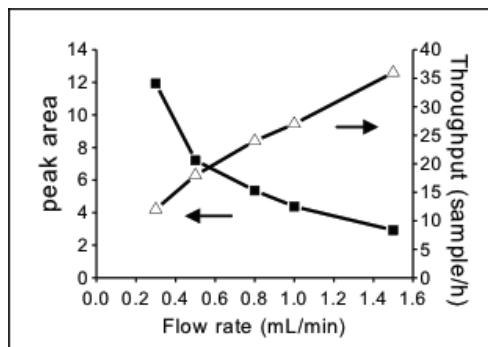
รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสกับศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ในระบบโพลีเอทิลีน

จากผลการทดลองในรูปที่ 8 พบว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +0.3 ถึง +0.6 โวลต์ ค่ากระแสที่ได้จะเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองที่ดีที่สุดของขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่ถูกควบคุมโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

ที่เกิดขึ้น ทำให้ค่ากระแสที่ได้เพิ่มมากขึ้น และเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้ามากกว่า +0.6 โวลต์ ค่ากระแสจะลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเกิดการลดลงของแรงขับเคลื่อนสำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชันของ FcCHO ซึ่งเป็นตัวกลางในการส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยที่ศักย์ไฟฟ้าที่ +0.6 โวลต์ จะให้ค่ากระแสสูงสุด จึงเป็นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวัดการตอบสนองของกลูโคสไบโอเซนเซอร์

3.7.2 การศึกษาหาอัตราการไหลที่เหมาะสมในการตรวจวัดกลูโคส

อัตราการไหลของสารละลายตัวพามีผลต่อการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์และจำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมง (sample throughput) ของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ผลของอัตราการไหลต่อสัญญาณจากการฉีดสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่วัดได้ และจำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 9

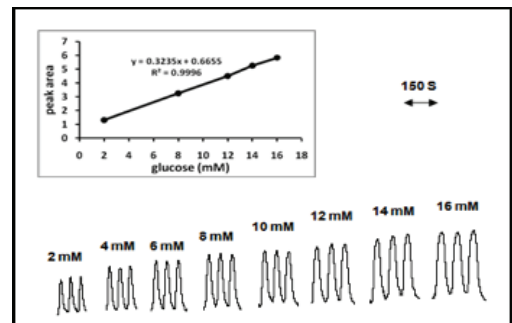


รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลกับสัญญาณที่วัดได้ (peak area) จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส และจำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมงที่วัดได้

จากรูปที่ 9 เมื่อเพิ่มอัตราการไหลเพิ่มขึ้นจาก 0.3 ถึง 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าพื้นที่ใต้พีคจะมีแนวโน้มลดลง แต่จำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมงกลับเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อพิจารณาในแง่ของความไวในการวิเคราะห์ และสภาพไวของการวิเคราะห์ จุดที่เหมาะสมของระบบวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้จึงเลือกอัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาทีใช้ในการทดลองต่อไป

3.7.3 การวิเคราะห์คุณลักษณะของระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมตรีที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์

ในการศึกษาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมตรีที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 ตัวอย่างสัญญาณของระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมตรีที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น และกราฟมาตรฐานของกลูโคส

รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างสัญญาณ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ และกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ได้จากระบบโวลอินเจกชันที่มีการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตรีที่ขั้วกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น พบว่าช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกลูโคส อยู่ในช่วงความเข้มข้น 2 ถึง 16 มิลลิโมลาร์ ค่าความชันเท่ากับ 323 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) เท่ากับ 0.9996

ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (detection limit) มีค่าเท่ากับ 0.36 มิลลิโมลาร์ ($S/N = 3$) ค่ากระแสที่ได้จากการวัดมีความเที่ยง (precision) ต่ำมากคือให้ค่า %RSD เท่ากับ 2.5 (วัดจากสัญญาณของกลูโคสความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์, $n = 7$) และสามารถวิเคราะห์ได้ 72 ตัวอย่างต่อชั่วโมง (วัดจากสัญญาณของกลูโคสความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์)

ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วกลุโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงที่เหมาะสมและอาจเป็นประโยชน์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณกลุโคสในเลือด (ระดับกลุโคสในเลือดของคนปกติมีค่าอยู่ที่ประมาณ 3.6-5.8 มิลลิโมลาร์) เนื่องจากมีความเที่ยงในการวิเคราะห์สูง และสามารถวัดปริมาณกลุโคสได้อย่างรวดเร็ว

4. สรุปและเสนอแนะ

กลุโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยการสร้างพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเฟอร์รีซีนคาร์บอกซิลไฮไดรด์ หรือ FcCHO เข้ากับ MWCNTs-NH₂ เพื่อป้องกัน Fc หลุดออกจากเมทริกซ์และรักษาแอคติวิตีทางเคมีไฟฟ้า มี BSA เพื่อช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ GOx และใช้กลูตาไรลไฮไดรด์ในการเชื่อมไขว้ (cross link) เพื่อให้เอนไซม์ถูกตรึงไว้ในวัสดุเชิงประกอบ MWCNTs-NH₂-FcCHO-BSA-GOx ก่อนนำไปเคลือบบนขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสคาร์บอนเพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดกลุโคสในระบบโพลีอินเจกชัน ทำให้ได้เทคนิควิเคราะห์กลุโคสที่มีข้อดีคือใช้สารปริมาณน้อย ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดต่ำ (0.36 มิลลิโมลาร์) ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงกว้าง (2-16 มิลลิโมลาร์) เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลุโคส สามารถตรวจวัดได้อย่างต่อเนื่องรวดเร็ว (72 ตัวอย่างต่อชั่วโมง) และมีความเที่ยงสูง (%RSD=2.5)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ ทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2554 (2553A11702010 และ 2554A11702005) และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยและการศึกษา

บรรณานุกรม

- [1] Pérez, J. P. H., López-Cabarcos, E. and López-Ruiz, B. 2010. "Amperometric glucose biosensor based on biocompatible poly(dimethylaminoethyl) methacrylate microparticles". **Talanta**. 81(4-5): 1197-1202.
- [2] Xu, F., Wang, L., Gao, M., Jin, L. and Jin, J. 2002. "Amperometric sensor for glucose and hypoxanthine based on a Pd-IrO₂ modified electrode by a co-crosslinking bienzymic system". **Talanta**. 57(2): 365-373.
- [3] Qiu, J.-D., Zhou, W.-M., Guo, J., Wang, R. and Liang, R.-P. 2009. "Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose". **Analytical Biochemistry**. 385(2): 264-269.
- [4] Wang, S. G., Zhang, Q., Wang, R. and Yoon, S. F. 2003. "A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection". **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 311(3): 572-576.
- [5] American Diabetes Association. 2006. **Diabetes Care. Standards of Medical Care-Table 6 and Table 7, Correlation between A1C level and Mean Plasma Glucose Levels on Multiple Testing over 2-3 months**. 29 (Supplement 1): 51-580.
- [6] White, B. J. and Harmon, H.J. 2002. "Novel optical solid-state glucose sensor using immobilized glucose oxidase". **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 296(5): 1069-1071.
- [7] Zhilei, W., Zaijun, L., Xiulan, S., Yinjun, F. and Junkang, L. 2010. "Synergistic contributions of fullerene, ferrocene, chitosan and ionic liquid towards improved performance for a glucose sensor". **Biosensors and Bioelectronics**. 25(6): 1434-1438.
- [8] Gomathi, P., Kim, M. K., Park, J. J., Ragupathy, D., Rajendran, A., Lee, S. C., Kim, J. C., Lee, S. H. and Ghim, H. D. 2011. "Multiwalled carbon nanotubes grafted chitosan nanobiocomposite: A prosperous functional nanomaterials for glucose biosensor application". **Sensors and Actuators B: Chemical**. 155(2): 897-902.
- [9] Kang, X., Mai, Z., Zou, X., Cai, P. and Mo, J. 2007. "A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold-platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes". **Analytical Biochemistry**. 369(1): 71-79.

- [10] Nagarale, R. K., Lee, J. M. and Shin, W. 2009. "Electrochemical properties of ferrocene modified polysiloxane/chitosan nanocomposite and its application to glucose sensor". **Electrochimica Acta**. 54(26): 6508-6514.
- [11] Liu, Y., Wang, M., Zhao, F., Xu, Z. and Dong, S. 2005. "The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix". **Biosensors and Bioelectronics**. 21(6): 984-988.
- [12] Qiu, J.-D., Wang, R., Liang, R.-P. and Xia, X.-H. 2009. "Electrochemically deposited nanocomposite film of CS-Fc/Au NPs/GOx for glucose biosensor application". **Biosensors and Bioelectronics**. 24(9): 2920-2925.
- [13] He, C., Liu, J., Zhang, Q. and Wu, C. 2012. "A novel stable amperometric glucose biosensor based on the adsorption of glucose oxidase on poly(methyl methacrylate)-bovine serum albumin core-shell nanoparticles". **Sensors and Actuators B: Chemical**. 166-167(0): 802-808.
- [14] Kurita, R., Tabei, H., Iwasaki, Y., Hayashi, K., Sunagawa, K. and Niwa, O. 2004. "Biocompatible glucose sensor prepared by modifying protein and vinylferrocene monomer composite membrane". **Biosensors and Bioelectronics**. 20(3): 518-523.
- [15] Kulys, J., Krikstopaitis, K., Ziemys, A. and Schneider, P. 2002. "Laccase-catalyzed oxidation of syringates in presence of albumins". **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 18(1-3): 99-108.
- [16] Chen, X., Hu, Y. and Wilson, G. S. 2002. "Glucose microbiosensor based on alumina sol-gel matrix/electropolymerized composite membrane". **Biosensors and Bioelectronics**. 17(11-12): 1005-1013.
- [17] Tripathi, V. S., Kandimalla, V. B. and Ju, H. 2006. "Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on ferrocene-bovine serum albumin and multiwall carbon nanotube modified ormosil composite". **Biosensors and Bioelectronics**. 21(8): 1529-1535.
- [18] Fernández, L. and Carrero, H. 2005. "Electrochemical evaluation of ferrocene carboxylic acids confined on surfactant-clay modified glassy carbon electrodes: oxidation of ascorbic acid and uric acid". **Electrochimica Acta**. 50(5): 1233-1240.
- [19] Chaubey, A. and Malhotra, B. D. 2002. "Mediated biosensors". **Biosensors and Bioelectronics**. 17(6-7): 441-456.
- [20] Cass, A. E. G., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H. A. O., Aston, W. J., Higgins, I. J., Plotkin, E. V., Scott, L. D. L. and Turner, A. P. F. 1984. "Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose". **Analytical Chemistry**. 56(4): 667-671.
- [21] Kandimalla, V. B., Tripathi, V. S. and Ju, H. 2006. "A conductive ormosil encapsulated with ferrocene conjugate and multiwall carbon nanotubes for biosensing application". **Biomaterials**. 27(7): 1167-1174.
- [22] Yu, J., Liu, S. and Ju, H. 2003. "Glucose sensor for flow injection analysis of serum glucose based on immobilization of glucose oxidase in titania sol-gel membrane". **Biosensors and Bioelectronics**. 19(4): 401-409.
- [23] Qiu, J.-D., Huang, J. and Liang, R.-P. 2011. "Nanocomposite film based on graphene oxide for high performance flexible glucose biosensor". **Sensors and Actuators B: Chemical**. 160(1): 287-294.
- [24] Liu, J., Zhang, X., Pang, H., Liu, B., Zou, Q. and Chen, J. 2012. "High-performance bioanode based on the composite of CNTs-immobilized mediator and silk film-immobilized glucose oxidase for glucose/O₂ biofuel cells". **Biosensors and Bioelectronics**. 31(1): 170-175.