

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยตรง ฮอสราดิซ เปรอร์ออกซิเดสบนพอลิไพโรล และอนุภาคนาโนทอง

Development of Biosensor for Detection of Hydrogen Peroxide Concentration by Immobilization of Horseradish Peroxidase on Polypyrrole and Gold Nanoparticles

ศิริวรรณ ตีฎุ* สุภาวดี อินทพรต และฐานิตา เนกขำ

Siriwan Teepoo, Supavadee Intarot and Thanita Nakkoum

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thailand

วันที่รับบทความ 22 กันยายน พ.ศ. 2557

วันที่ตอบรับตีพิมพ์ 20 เมษายน พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยใช้ฮอสราดิซ เปรอร์ออกซิเดสตรึงบนพอลิไพโรล และอนุภาคนาโนทองบนขั้วไฟฟ้า สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ ได้แก่ เวลาในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล ความเข้มข้นของไพโรล ปริมาณอนุภาคนาโนทอง ศักย์ไฟฟ้า ความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือใช้เวลา 40 วินาที ในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล ใช้ไพโรลความเข้มข้น 0.1 M ปริมาณอนุภาคนาโนทอง 500 μL โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.15 โวลต์ และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 6.00 และพบว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาสามารถตรวจหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.9 mM มีขีดจำกัดการตรวจวัดโดยประเมินจากความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน มีค่าเท่ากับ 0.02 mM และใช้เวลาในการตอบสนองเพียง 5 วินาที สุดท้ายนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง ผลการทดลองพบว่าผลวิเคราะห์ที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับผลจากผลิตภัณฑ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

คำสำคัญ : ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไบโอเซนเซอร์ อนุภาคนาโนทอง พอลิไพโรล แอมเพโรเมตริกไบโอเซนเซอร์

*Corresponding author. E-mail: siriwan@mail.rmutt.ac.th

Abstract

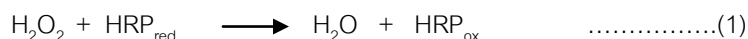
In this research, a biosensor was developed for detection of hydrogen peroxide. Horseradish peroxidase was immobilized on electrode surface via polypyrrole and gold nanoparticles. All affecting performances of biosensor were optimized such as electropolymerization time of polypyrrole, concentration of pyrrole, volume of gold nanoparticles, applied potential, concentration and pH of phosphate buffer. The optimum conditions were: 40 second for electropolymerization time, 0.1 M of pyrrole concentration, 500 μ L of gold nanoparticles, -0.15 V for applied potential, 0.1 M and pH 6.00 of phosphate buffer. This developed biosensor could detect the concentration of hydrogen peroxide in the range of 0.1-0.9 mM with the detection limit at 0.02 mM which was estimated as the analyte concentration that produced a signal of three times the background noise. The response time was only five second. Finally, the proposed method was applied to detect the concentration of hydrogen peroxide in real samples. When compared with the label, it was found that all results were no difference at significance level of 95 %.

Keywords : Hydrogen peroxide, Biosensor, Gold nanoparticles, Polypyrrole, Amperometric biosensor

บทนำ

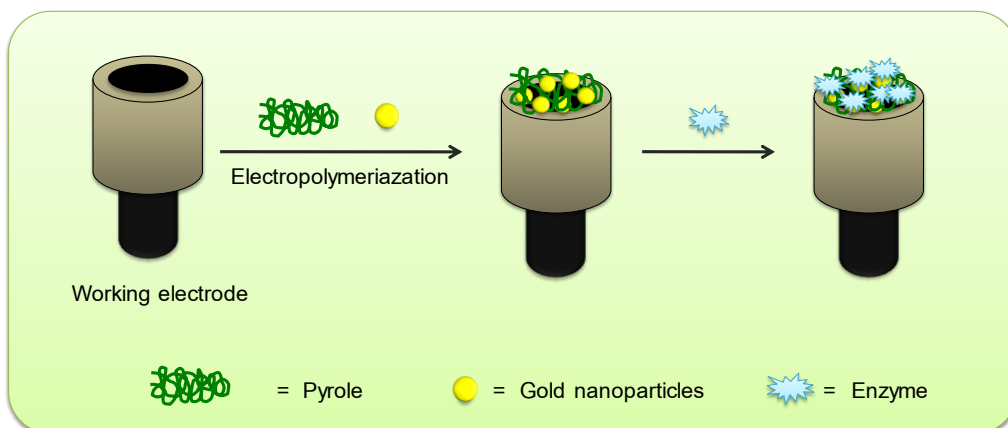
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2) เป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง โดยมีสมบัติสามารถฟอกสีและฆ่าเชื้อโรคได้ดี (Hu *et al.*, 2012) ดังนั้นจึงนิยมนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ตัวอย่างเช่น นำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นส่วนผสมในการผลิตน้ำยาซักล้าง ย้อมสีผม ยาสีฟัน อุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อฟอกสีหรือนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นส่วนผสมหลักในน้ำยาล้างแผลเพื่อฆ่าเชื้อโรค (Elzanowska *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012; Korkut *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังได้นำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปใช้ในกระบวนการสเตอริไลซ์ และการกระบวนการพาสเจอร์ไรซัมนเพื่อฆ่าเชื้อโรคในน้ำนมดิบ (Haddadin *et al.*, 1996) เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีฤทธิ์กัดกร่อนสูง ดังนั้น ถ้าหากร่างกายได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดการแพ้ ระคายเคือง (Suzuki *et al.*, 1999) วิธีทั่วไปที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีหลายวิธีได้แก่ ไทเทรต (Titrate) (Hurdis, & Romeyn, 1954) สเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) (Hoshino, *et al.*, 2014) และโครมาโทกราฟี (Chromatography) (Yue, *et al.*, 2009) แต่พบว่าวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดได้แก่ มีหลายขั้นตอน ใช้สารเคมีอันตราย มีผลของตัวรบกวน และเครื่องมือมีราคาสูง ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง (Shi, *et al.*, 2000) ดังนั้นทำให้นักวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ ทั้งนี้เพราะเทคนิคนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ลง (Ghaderi, & Mehrgardi, 2014; Zhou *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2008) ที่ผ่านมาก็ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ เช่น กลูโคส (Yang *et al.*, 2014) ยาฆ่าแมลง (Shang *et al.*, 2011) โลหะหนัก (Moyo *et al.*, 2014) และสารบ่งชี้มะเร็ง (Hu *et al.*, 2014) เป็นต้น เทคนิคไบโอเซนเซอร์เป็นการอาศัยการทำงาน

ร่วมกันระหว่างสารวัสดุชีวภาพ เช่น เอนไซม์ เนื้อเยื่อ หรือแอนติบอดี กับตัวตรวจวัด เมื่อสารตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์ เกิดปฏิกิริยาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือทางเคมี ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สำหรับการตรวจวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์นิยมใช้ เอนไซม์ฮอสราดิซ เฮอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase; HRP) เป็นวัสดุชีวภาพ (Wang *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2005; Xin *et al.*, 2013) โดยตรึง (Immobilization) เอนไซม์ฮอสราดิซ เฮอร์ออกซิเดสไว้บนขั้วไฟฟ้าทำงาน และมีสารช่วยส่งผ่าน อิเล็กตรอน (Mediator; M) เช่น เมทิลีนบลู (Methalene blue) เฟอโรซีน (Ferrocence) ทำหน้าที่ช่วยในการส่งผ่าน อิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์กับขั้วไฟฟ้า (Nakabayashi, & Yoshikawa, 2000; Tian *et al.*, 2001) ถ้าในตัวอย่างมีไฮโดรเจน เฮอร์ออกไซด์ จะเกิดปฏิกิริยาขึ้นที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้างสมการที่ 1-3 จากสมการจะเห็นได้ว่าการถ่ายเทอิเล็กตรอนเกิดขึ้น ระหว่างผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากับสารละลาย เมื่ออิเล็กตรอนมีการเคลื่อนที่จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น และใช้เทคนิคแอมเพอโร เมตริกเป็นตัวตรวจวัด โดยที่กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Ernst *et al.*, 2007)



อย่างไรก็ตามการตรึงเอนไซม์ฮอสราดิซ เฮอร์ออกซิเดสไว้บนขั้วไฟฟ้าทำงานโดยตรง มีข้อเสียคือ ทำให้สูญเสียการทำงาน ของเอนไซม์ได้ง่าย ดังนั้นที่ผ่านมาจึงได้มีการวิจัยพบว่าวัสดุนาโน เช่น ท่อนานาคาร์บอน (Odaci *et al.*, 2008) อนุภาค นาโนเงิน (Ma *et al.*, 2008) และอนุภาคนาโนทอง (Shi *et al.*, 2008) ถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ไว้บนขั้วไฟฟ้าทำงาน เพื่อรักษาไม่ให้กิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์สูญเสีย อนุภาคนาโนทองเป็นวัสดุนาโนที่ถูกนำมาใช้ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ มากที่สุด เพราะอนุภาคนาโนทองมีข้อดีคือ ช่วยในการนำไฟฟ้า เพิ่มพื้นที่ผิว และไม่เป็นพิษต่อเอนไซม์ (Xu *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่นำพอลิเมอร์นำไฟฟ้า เช่น พอลิไพโรล (Tam, & Hieu, 2011) มาใช้ในการตรึงร่วมกับอนุภาค นาโนทองบนขั้วไฟฟ้าทำงาน พอลิเมอร์นำไฟฟ้านอกจากจะใช้เพื่อตรึงอนุภาคนาโนทองบนขั้วไฟฟ้าทำงานแล้ว พอลิเมอร์ นำไฟฟ้ายังสามารถช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้อีกด้วย เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์นำไฟฟ้า

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยตรึงเอนไซม์ ฮอสราดิซ เฮอร์ออกซิเดสไว้บนอนุภาคนาโนทองและพอลิไพโรล ดังภาพที่ 1 จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ได้พัฒนาขึ้นมาไปวิเคราะห์ ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้าทำงาน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

เอนไซม์ฮอร์ราดิช เพอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase, Sigma-Aldrich) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Sigma-Aldrich) ไพโรล (Pyrrole, Sigma-Aldrich) โพแทสเซียม เฟอริกไซยาไนด์ (Potassium Ferricyanide, Ajax Finechem) กลูตาราลดีไฮด์ (Glutaraldehyde, Fluka) ไฮโดรเจนเตตระคลอโรออเรต (Hydrogentetrachloroaurate(III), Sigma-Aldrich) ไตรโซเดียมซิเตรต (Trisodium citrate, Sigma-Aldrich) และโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride, Sigma-Aldrich)

เครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า (Auto lab PGSTAT10, Eco chemie, Netherland) ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode) ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode) และ ขั้วไฟฟ้าแพลทินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (Auxiliary electrode) ใช้สำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า และเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV - 1601 จากบริษัท SHIMADZU ใช้สำหรับตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทอง

การทดลอง

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ผสมสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ ความเข้มข้น 125 mM ปริมาตร 1,200 μL และสารละลาย ไฮโดรเจนเตตระคลอโรออเรต ความเข้มข้น 0.3 mM ปริมาตร 153 μL ลงในสารละลายไตรโซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น 0.38 mM ปริมาตร 500 mL คนสารละลายต่อเนื่อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ และนำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทอง ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 300-700 nm

การตรึงเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้าทำงาน

ขั้นแรกตรึงพอลิไพโรล และอนุภาคนาโนทองบนขั้วไฟฟ้าทำงานโดยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชัน (Electropolymerization) โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานในสารละลายไพโรล ความเข้มข้น 0.1 M ผสมกับอนุภาคนาโนทอง ปริมาตร 500 μL ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 5 mL ให้ศักย์ไฟฟ้า + 0.7 โวลต์ เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นต่อไปจุ่มขั้วไฟฟ้าลงในสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% (v/v) เป็นเวลา 30 นาที และขั้นสุดท้ายเป็นขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าลงในเอนไซม์ฮอสมาดิซ เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 5 mg/ml เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้ขั้วไฟฟ้าทำงานที่ตรึงด้วยเอนไซม์ฮอสมาดิซเปอร์ออกซิเดส เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระบบไบโอเซนเซอร์ต่อไป โดยขั้นตอนการตรึงในแต่ละขั้นจะล้างขั้วไฟฟ้าด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.00 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ได้ไปตรวจสอบการเกาะติดด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทริก โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าลงในสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกซายาไนต์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 โวลต์

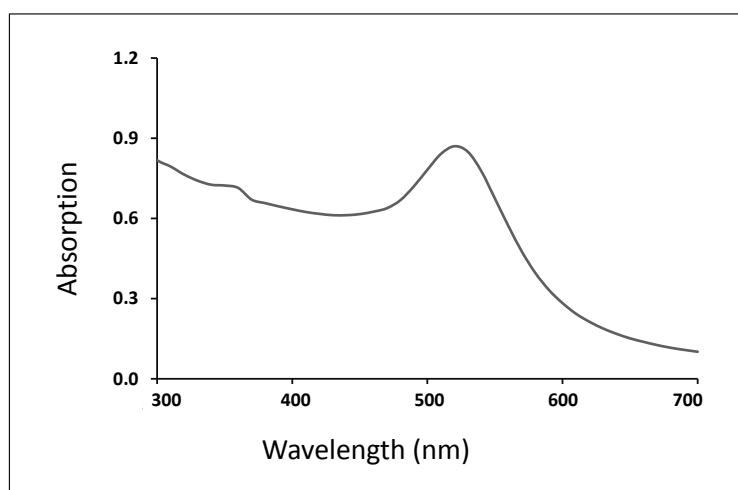
การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทริก

จุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานที่ตรึงด้วยเอนไซม์ฮอสมาดิซเปอร์ออกซิเดส ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าแพลทินัม ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.00 ความเข้มข้น 0.15 M ที่มีเมทิลีนบลู ปริมาตร 30 μL เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1.5 mM โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.15 โวลต์ แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน และวัดค่ากระแสไฟฟ้าตอบสนองที่ได้

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

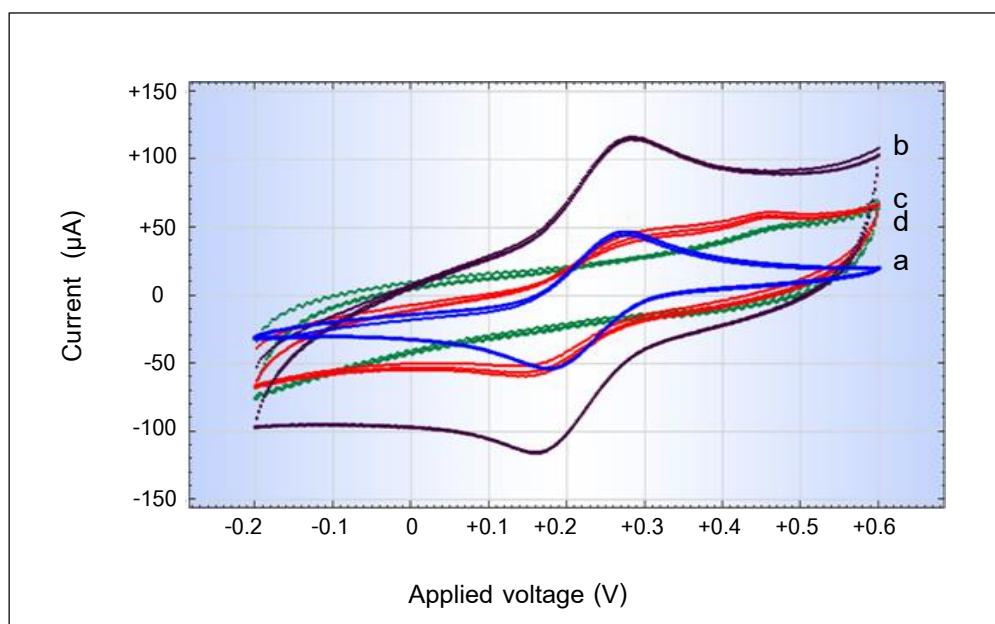
อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ มีลักษณะเป็นคอลลอยด์สีม่วงแดง และเมื่อนำอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบสมบัติทางแสง พบพีคของการดูดกลืนแสงที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 nm ดังภาพที่ 2 โดยผลการวัดแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้เป็นอนุภาคนาโนทอง เพราะอนุภาคนาโนทองมีสมบัติการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 500-600 nm (Hu *et al.*, 2014)



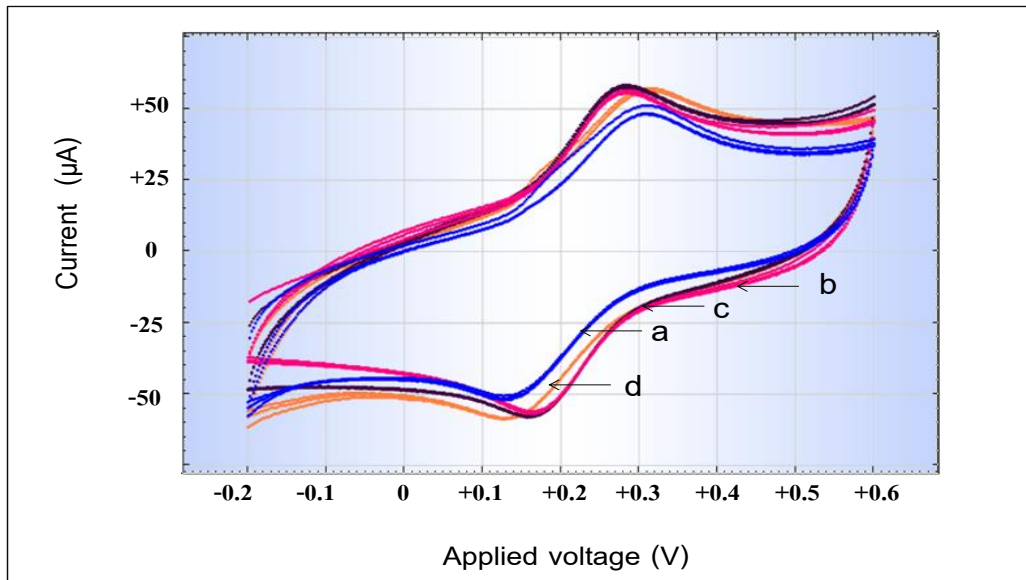
ภาพที่ 2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทอง

การตรวจสอบขั้นตอนการตรึงและการตอบสนองของเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้าทำงาน

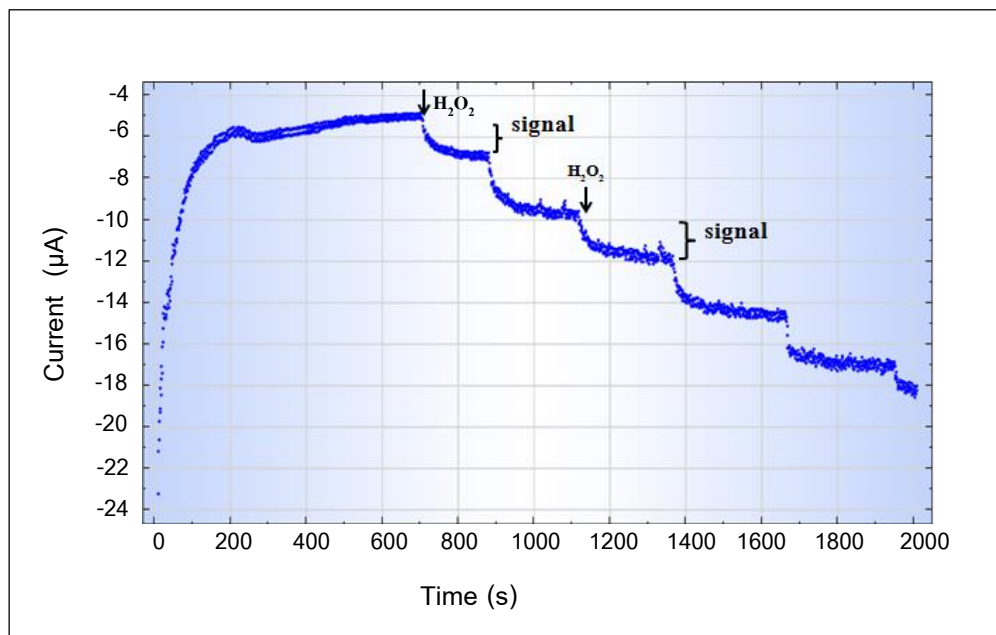
ภาพที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบการตรึงเอนไซม์ฮอสตราดิช เปอร์ออกซิเดส บนขั้วไฟฟ้าทำงานแต่ละขั้นตอน ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตริก พบว่าเมื่อตรึงพอลิไพโรลและอนุภาคนาโนทองไว้บนขั้วไฟฟ้าทำงาน ค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้าที่ไม่ตรึงเอนไซม์ฮอสตราดิช เปอร์ออกซิเดส พอลิไพโรลและอนุภาคนาโนทอง (ขั้วไฟฟ้าเปล่า) เพราะทั้งพอลิไพโรลและอนุภาคนาโนทองมีสมบัติช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ไปยังขั้วไฟฟ้า จากนั้นเมื่อตรึงด้วยกลูตาโรลดีไฮด์และเอนไซม์ ค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ลดลง เพราะผิวหน้าขั้วไฟฟ้าถูกบดบัง ทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนได้น้อยลง แสดงว่าเอนไซม์สามารถตรึงอยู่บนขั้วไฟฟ้าทำงานได้ จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ได้ไปตรวจสอบการตอบสนองต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตริกและเทคนิคแอมเพอโรเมตริก ภาพที่ 4 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และภาพที่ 5 แสดงสัญญาณการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก แสดงว่าขั้วไฟฟ้าสามารถตอบสนองต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดี



ภาพที่ 3 โวลแทมโมแกรมของ (a) ขั้วไฟฟ้าเปล่า (b) ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยพอลิไพโรลและอนุภาคนาโนทอง (c) กลูตาโรลดีไฮด์ และ (d) เอนไซม์ฮอสตราดิช เปอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 4 โวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยพอลิไพโรลและอนุภาคนาโนทองคำต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 mM (b) 0.5 mM (c) 1.0 mM และ (d) 1.5 mM ที่อัตราเร็วของการสแกน 50 mV/s



ภาพที่ 5 การตอบสนองของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเอนไซม์ฮอสราดิซ เพอร์ออกซิเดสต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.50 ความเข้มข้น 0.10 M ที่มีเมทิลีนบลู ปริมาตร 30 µL และให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์

การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไบโอเซนเซอร์

ผลของเวลาในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล

กระบวนการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ในงานวิจัยนี้ศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล ที่ 30 40 50 และ 60 วินาที โดยใช้โพโรสความเข้มข้น 0.1 M ให้ศักย์ไฟฟ้า +0.7 โวลต์ ตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 6.50 ผลการทดลองเป็นดังภาพที่ 6(a) ที่เวลา 40 วินาที ให้กระแสไฟฟ้าสูงสุด แต่หลังจาก 40 วินาที ค่ากระแสไฟฟ้าลดลง ทั้งนี้เพราะถ้าความหนาของชั้นพอลิไพโรลมากเกินไป เอนไซม์บนขั้วไฟฟ้ามีปริมาณน้อยลง ทำให้กระแสไฟฟ้าที่ลดลง ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่ใช้ในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันที่ 40 วินาที

ผลของความเข้มข้นของไพโรล

ความเข้มข้นของมอนอเมอร์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิเมอร์ ความเข้มข้นของไพโรลที่ศึกษา ได้แก่ 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 M โดยใช้เวลาในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล 40 นาที ให้ศักย์ไฟฟ้า +0.7 โวลต์ ตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 6.50 ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของไพโรลเพิ่มขึ้นจาก 0.025 ถึง 0.1 M ค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้เพิ่มขึ้นด้วยทั้งนี้เพราะสามารถเกิดเป็นชั้นพอลิไพโรลเพิ่มขึ้น สามารถตรึงเอนไซม์ได้มาก จึงทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของไพโรลมากกว่า 0.1 M ค่ากระแสไฟฟ้าลดลง ทั้งเพราะถ้าชั้นพอลิไพโรลบนขั้วไฟฟ้าทำงานหนาเกินไปจะเกิดการเกาะของเอนไซม์ (Steric effect) ทำให้เกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้น้อยลง ส่งผลให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงด้วย (ภาพที่ 6b) จึงเลือกใช้ไพโรลที่มีความเข้มข้น 0.1 M

ผลของปริมาณอนุภาคนาโนทอง

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณอนุภาคนาโนทอง เนื่องจากอนุภาคนาโนทองช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนและช่วยในการตรึงเอนไซม์ ศึกษาปริมาณอนุภาคนาโนทองที่ 300 – 1,000 μL โดยใช้โพโรสความเข้มข้น 0.1 M เวลาในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล 40 นาที ให้ศักย์ไฟฟ้า +0.7 โวลต์ ตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 6.50 ภาพที่ 6 (c) แสดงผลของปริมาณอนุภาคนาโนทอง เมื่อปริมาณอนุภาคนาโนทองเพิ่มขึ้น ค่ากระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น และที่อนุภาคนาโนทอง 500 μL ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุด จึงเลือกปริมาณของอนุภาคนาโนทองที่ 500 μL เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ผลของศักย์ไฟฟ้าสำหรับตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

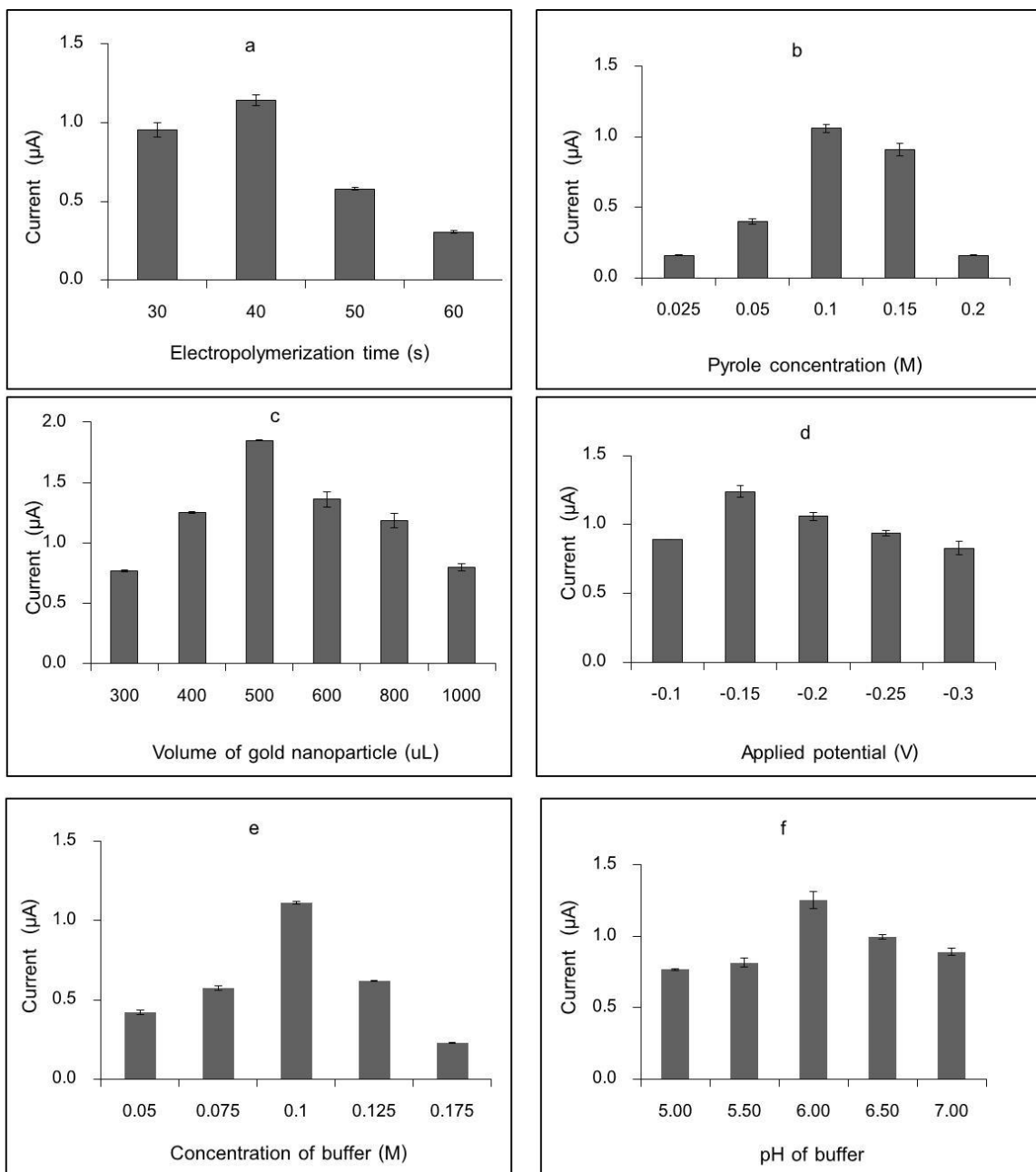
การวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ขั้วไฟฟ้าทำงานต้องเป็นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ดีที่สุด โดยงานวิจัยนี้ศึกษาศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.1 ถึง -0.3 โวลต์ ในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM โดยใช้โพโรสความเข้มข้น 0.1 M เวลาในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล 40 นาที ให้ศักย์ไฟฟ้า +0.7 โวลต์ อนุภาคนาโนทองปริมาตร 500 μL ตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 6.50 ผลการทดลองที่ศักย์ไฟฟ้า -0.15 โวลต์ ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุด ดังภาพที่ 6 (d) สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในงานวิจัยจึงเลือกใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.15 โวลต์ แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน

ผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์

ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 0.05-0.175 M โดยใช้ไพโรลความเข้มข้น 0.1 M เวลาในการเกิดอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล 40 นาที ให้ศักย์ไฟฟ้า +0.7 โวลต์ อนุภาคนาโนทองปริมาณ 500 μL และตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.15 mM ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตริกที่ศักย์ไฟฟ้า -0.15 โวลต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 6.50 ผลการทดลองเป็นดังภาพที่ 6 (e) พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.10 M เอนไซม์สามารถตอบสนองให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุด ในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.10 M

ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์

การเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายบัพเฟอร์มีผลต่อการทำงานที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ในงานวิจัยนี้ จึงศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 5.50-7.00 โดยใช้ไพโรลความเข้มข้น 0.1 M เวลาในการเกิดอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล 40 นาที ให้ศักย์ไฟฟ้า +0.7 โวลต์ อนุภาคนาโนทองปริมาณ 500 μL และตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.15 โวลต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 M ผลการทดลองพบว่าที่พีเอช 6.00 ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 6.00 ดังภาพที่ 6 (f)



ภาพที่ 6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ (a) เวลาในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล (b) ความเข้มข้นของไพโรล (c) ปริมาณของอนุภาคนาโนทอง (d) ศักย์ไฟฟ้า (e) ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ (f) พีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สำหรับตรวจวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 mM ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตริกไปโอสเซนเซอร์

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หาจากการทำซ้ำของการวัด (Repeatability) และการทวนซ้ำของวิธี (Reproducibility) สำหรับการทำให้ซ้ำไฟฟ้าทำงานซ้ำเดียวภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน โดยตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 mM จำนวน 10 ซ้ำ วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตอบสนองของเอนไซม์ในแต่ละครั้ง และนำค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation ; RSD) พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.8 % และสำหรับการทวนซ้ำของวิธี ทำการทดลองภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน โดยใช้ซ้ำไฟฟ้าทำงานที่เตรียมใหม่ จำนวน 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำนำไปตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 mM จำนวน 1 ซ้ำ พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 4.2 % ผลการทดลองทั้งการทำซ้ำและการทวนซ้ำพบว่าค่าที่ได้น้อยกว่าเกณฑ์กำหนด จึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงสูง (Taverniers *et al.*, 2004)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

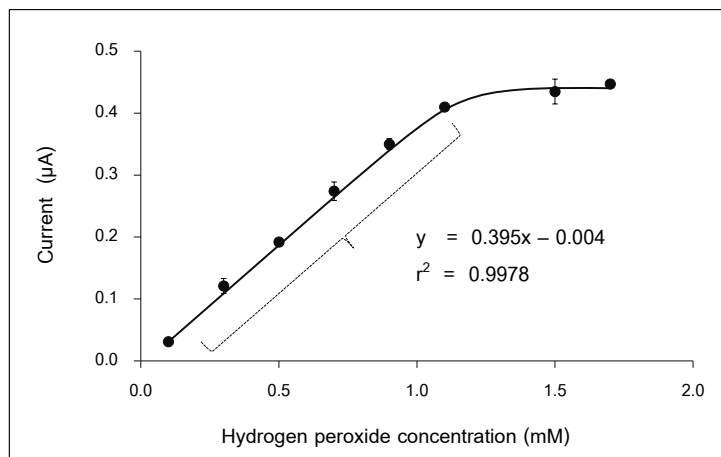
ศึกษาความแม่นยำของวิธีโดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (%Recovery) โดยเติมสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงในตัวอย่างจริง วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากก่อนและหลังเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน พบว่าค่าการได้กลับคืนของวิธีนี้อยู่ในช่วง 87-117 % ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนด (Taverniers *et al.*, 2004) แสดงว่าวิธีนี้มีความแม่นยำสูง มีประสิทธิภาพที่จะนำไปตรวจหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง

ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range)

ตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยระบบแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.1 ถึง 1.7 mM ภาพที่ 7 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตอบสนองของเอนไซม์ในแต่ละความเข้มข้น พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.9 mM ให้ค่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9978 และมีความไววิเคราะห์ (Sensitivity) เท่ากับ 0.395 $\mu\text{A}/\text{mM}$ หมายถึงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 mM จะให้ค่ากระแสไฟฟ้า 0.395 μA

ขีดจำกัดการตรวจวัด (Detection limit)

หาขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธี โดยตรวจวัดสารละลายเบลงค์ (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) จำนวน 10 ครั้ง นำค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตอบสนอง ไปคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัดโดยใช้ทฤษฎีสามเท่าของสัญญาณรบกวน (Taverniers *et al.*, 2004) ผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ความเข้มข้น 0.02 mM



ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง

ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีไบโอเซนเซอร์ที่ได้พัฒนาขึ้นมา โดยใช้พอลิเมอร์นำไฟฟ้าและอนุภาคนาโนทอง โดยวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง ได้แก่ น้ำยาล้างผม (bleach hair) น้ำยาล้างแผล (antiseptic solution) และนมสเตอริไลซ์ (Sterilized Milk) นำแต่ละตัวอย่างมาเจือจางกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปตรวจวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์เป็นดังตารางที่ 1 เมื่อนำค่าที่ตรวจวัดได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระบุไว้ในฉลากของแต่ละตัวอย่าง นำค่าที่ได้จากสองวิธีไปทดสอบด้วยสถิติที-เทส (t-test) พบว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีไบโอเซนเซอร์กับค่าที่ระบุไว้ในฉลากไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงได้

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์เปรียบเทียบกับฉลากผลิตภัณฑ์ที่ระบุอยู่ข้างขวด

Sample	Concentration of hydrogen peroxide (%)	
	Biosensor	Label
bleach hair	8.6±0.7	9
antiseptic solution	2.8±0.2	3
Sterilized Milk	No detectable	0

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาระบบไบโอเซนเซอร์ด้วยพอลิเมอร์นำไฟฟ้าและอนุภาคนาโนทอง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์เฮอสิราติสเปอร์ ออกซิเดสเป็นวัสดุชีวภาพ ตรึงบนชั้นพอลิไพโรลและอนุภาคนาโนทองของขั้วไฟฟ้าทำงาน เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ขึ้นที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน ทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น และตรวจวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นโดยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก ผลการทดลองพบว่าระบบไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนามีความแม่นยำ จำเพาะเจาะจงและความถูกต้องสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ห็นตัวอย่างจริงได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

เอกสารอ้างอิง

- Cao, Z., Jiang, X., Xie, Q. & Yao, S. (2008). A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized in a tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane/multiwalled carbon nanotubes film. *Biosensor and Bioelectronic*, 24, 222-227.
- Elzanowska H, Abu-Irhayem E, Skrzynecka B & Birss V. (2004). Hydrogen peroxide detection at electrochemically and sol-gel derived ir oxide films. *Electroanalysis*, 16, 478-490.
- Ernst, A., Makowski, O., Kowalewska, B., Miecznikowski, K. & Kulesza, P.J. (2007). Hybrid bioelectrocatalyst for hydrogen peroxide reduction: Immobilization of enzyme within organic-inorganic film of structured Prussian Blue and PEDOT. *Bioelectrochemistry*, 71, 23-28.
- Ghaderi, S. & Mehrgardi, M.A. (2014). Prussian blue-modified nanoporous gold film electrode for amperometric determination of hydrogen peroxide. *Bioelectrochemistry*, 98, 64-69.
- Haddadin, M. S., Ibrahim, S. A., & Robinson, R. K. (1996). Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control*, 7, 149-152.
- Hoshino, M., Kamino, S., Doi, M., Takada, S., Mitani, S., Yanagihara, R., Asano, M., Yamaguchi, T. & Fujita, Y. (2014). Spectrophotometric determination of hydrogen peroxidewith osmium(VIII) and m-carboxyphenylfluorone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 814-816.
- Hu H.C., Jin H.J. & Chai X.S. (2012). Rapid determination of hydrogen peroxide in pulp bleaching effluents by headspace gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1235, 182- 184.
- Hu, R., Wen, W., Wang, Q., Xiong, H., Zhang, X., Gu, H. & Wang, S. (2014). Novel electrochemical aptamer biosensor based on an enzyme-gold nanoparticle dual label the ultrasensitive detection of epithelial tumour marker MUC1. *Biosensors and Bioelectronics*, 53, 384-389.

- Hurdis, E.& Romeyn, H.(1954). Accuracy of determination of hydrogen peroxide by cerate oxidimetry, *Analytical Chemistry*, 26, 320–325.
- Korkut S., Keskinler B.& Erhan E. (2008). An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives, *Talanta*, 76, 1147-1152.
- Ma, L., Yuan, R., Chai, Y. & Chen, S. (2008). Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on DNA–silver nanohybrids and PDDA-protected gold nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 215-220.
- Moyo, M., Okonkwo, J.O. & Agyei, N.M. (2014). An amperometric biosensor based on horseradish peroxidase immobilized onto maize tassel-multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for determination of heavy metal ions in aqueous solution. *Enzyme and Microbial Technology*, 56, 28-34.
- Nakabayashi, Y. & Yoshikawa, H. (2000). Amperometric biosensors for sensing of hydrogen peroxide based on electron transfer between horseradish peroxidase and ferrocene as a mediator. *Analytical Sciences*, 16, 609-613.
- Odaci, D., Telefoncu, A. & Timur, S. (2008). Pyranose oxidase biosensor based on carbon nanotube (CNT)-modified carbon paste electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 132, 159-165.
- Shang Z.J., Xu, Y.I., Gu, Y.X.Z., Wang, Y., Wei, D.X.& Zhan, L.I. (2011). A Rapid Detection of Pesticide Residue Based on Piezoelectric Biosensor. *Procedia Engineering*, 15, 4480-4485.
- Shi, A.W., Qu, F.L., Yang, M.H., Shen, G.L. & Yu, R.Q. (2008). Amperometric H₂O₂ biosensor based on polythionine nanowire/HRP/nano-Au-modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 129, 779-783.
- Shi, G., Lu, J., Xu, F., Zhou, H., Jin, L.& Jin, J. (2000). Liquid chromatography-electrochemical detector for the determination of glucose in rat brain combined with in vivo Microdialysis. *Analytical Chimica Acta*. 413, 131–136.
- Silva R.A.B., Montes R.H.O., Richter E.M. & Munoz R.A.A. (2012). Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. *Food Chemistry*, 133, 200–204.
- Suzuki, I., Nojima, S. & Tanimura E. (1999). Japanese Standard of Food Additives. (Seventh ed).Tokyo: Hirokawa Publishing Co.
- Taverniers, I., Loose, M.D. & Bockstaele, E.V. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 535-552.

- Tian, F., Xu, B., Zhu, L. & Zhu, G. (2001). Hydrogen peroxide biosensor with enzyme entrapped within electrodeposited polypyrrole based on mediated sol-gel derived composite carbon electrode. *Analytical Chimica Acta*, 443, 9-16.
- Tam, P.D. & Hieu, N.V. (2011). Conducting polymer film-based immunosensors using carbon nanotube/antibodies doped polypyrrole. *Applied Surface Science*, 257, 9817-9824.
- Wang, G., Xu, J.J., Chen, H.Y. & Lu, Z.H. (2003). Amperometric hydrogen peroxide biosensor with sol-gel/chitosan network-like film as immobilization matrix. *Biosensor and Bioelectronic*, 18, 335-343.
- Xin, Y., Fu-bing, X., Hong-wei, L., Feng, W., Di-zhao, C. & Zhao-yang, W. (2013). Novel H₂O₂ biosensor based on Fe₃O₄-Au magnetic nanoparticles coated horseradish peroxidase and graphene sheets-Nafion film modified screen-printed carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 109, 750-755.
- Xu, Q., Mao, C., Liu, N.N., Zhu, J.J. & Sheng, J. (2006). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 768-773.
- Yang, P., Wang, L., Wu, Q., Chen, Z. & Lin, X. (2014). A method for determination of glucose by an amperometric bienzyme biosensor based on silver nanocubes modified Au electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 194, 71-78.
- Yao, H., Li, N., Wei, Y.L. & Zhu, J.J. (2005). A H₂O₂ biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase in a gelatine network matrix. *Sensors*, 5, 277-283.
- Yue, H., Bu, X., Huang, M.H., Young, J. & Raglione, T. (2009). Quantitative determination of trace levels of hydrogen peroxide in crospovidone and a pharmaceutical product using high performance liquid chromatography with coulometric detection. *International Journal of Pharmaceutics*, 375, 33-40.
- Zhou, K., Zhu, Y., Yang, X. & Li, C. (2011). Preparation and application of mediator-free H₂O₂ biosensors of graphene-Fe₃O₄ composites. *Electroanalysis*, 23, 862-869.