



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การออกแบบและการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์โดยใช้พอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก ซึ่งได้จากการทำอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันเพื่อใช้ในการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี ของคน”

โดย ดร. แสงรวี ศรีวิชัย

กรกฎาคม 2557

สัญญาเลขที่ MRG5580133

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การออกแบบและการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์โดยใช้
พอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก ซึ่งได้จากการทำอิเล็กโทร
พอลิเมอไรเซชันเพื่อใช้ในการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี ของคน”

ดร. แสงรวี ศรีวิชัย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5580133

**Project Title : Design and Construction of Immunosensor Based-on
Electropolymerized Carboxylated-Conducting Polymer for the Detection
of Human Immunoglobulin G**

Investigator : Dr. SAENGRAWEE SRIWICHAI

E-mail Address : saengrawee.s@cmu.ac.th

Project Period : 2 years

The immunosensor based on electropolymerized carboxylated-polyaniline, poly(3-aminobenzoic acid) was designed and constructed in this research. The electropolymerization process of PABA films on gold-coated commercial BD-R and DVD-R grating substrates, which was also used as working electrode in electrochemical experiment, were first simultaneously studied by the combination of electrochemical technique and transmission surface plasmon resonance (TSPR) spectroscopy. The optical property as a function of the applied potentials during electropolymerization and the polymer film was studied at the fixed incident angle of 35°. The time dependence during electropolymerization was also in situ monitored at the fixed wavelength which is a maximum wavelength of each grating substrates. Furthermore, the obtained TSPR wavelength scan spectra after each potential cycle showed that the maximum wavelength slightly shifted to longer wavelength indicating the increasing of film thickness on both grating substrates. Electroactivity of the obtained PABA film in 0.5 M H₂SO₄ and neutral phosphate buffer saline (PBS, pH = 7.4) solution was also studied. In addition, the technique can be further employed for probing the change during construction of PABA-based immunosensor for label-free detection of human immunoglobulin G.

**Keywords : carboxylated conducting polymer, immunosensor,
electropolymerization, grating substrate**

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580133

ชื่อโครงการ : การออกแบบและการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์โดยใช้ พอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก ซึ่งได้จากการทำอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันเพื่อใช้ในการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี ของคน

ชื่อนักวิจัย : ดร.แสงรวี ศรีวิชัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : saengrawee.s@cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบและสร้างอิมมูโนเซนเซอร์จากพอลิเมอร์นำไฟฟ้าซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพอลิอะนิลีน คือ พอลิ(3-อะมิโนเบนโซอิกแอซิด) โดยได้ทำการเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ด้วยวิธีทางไฟฟ้าเคมีบนขั้วเสตรทแบบเกรตติง 2 ชนิด คือ BD-R และ DVD-R ซึ่งใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานสำหรับการเตรียมพอลิเมอร์ด้วย นอกจากนี้ได้ทำการติดตามการเกิดขึ้นของพอลิเมอร์โดยใช้เทคนิคทรานส์มิชชันเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี พบว่าพีคของสเปกตรัมที่ได้มีค่าความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงการมีฟิล์มพอลิเมอร์เกาะติดอยู่บนขั้วเสตรท ก่อนที่จะนำแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ไปเตรียมอิมมูโนเซนเซอร์ ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ในสารละลายที่มีค่า pH เป็นกลาง พบว่าแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าได้ในสารละลายดังกล่าว ซึ่งมีประโยชน์ในการใช้เตรียมอิมมูโนเซนเซอร์ได้ การติดตามการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี ของคนที่ความเข้มข้นต่างๆ สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคทรานส์มิชชันเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี

คำหลัก : พอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่มีคาร์บอกซิลิก อิมมูโนเซนเซอร์
อิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชัน ขั้วเสตรทแบบเกรตติง

1. บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

พอลิเมอร์นำไฟฟ้า (Conducting polymer) เป็นนาโนเทคโนโลยีที่มีความสำคัญมากในปัจจุบัน เนื่องจากคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์และขึ้นรูปได้ง่าย สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน สามารถดัดแปลงให้มีลักษณะเฉพาะตามต้องการ เมื่อรวมกับคุณสมบัติการนำไฟฟ้าจึงทำให้การสร้างสรรค์เทคโนโลยีใหม่ๆ มีความน่าสนใจขึ้นมาก พอลิเมอร์นำไฟฟ้า เช่น พอลิไทโอฟีน (Polythiophenes) พอลิไพโรล (Polypyrroles) พอลิอะนิลีน (Polyanilines) พอลิ(พารา-ฟีนิลีนไวนิลีน) (Poly(p-phenylenevinylenes)) เป็นต้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน ทั้งด้านการแพทย์ ด้านเทคโนโลยี ด้านอุตสาหกรรม ด้านสิ่งแวดล้อม และด้านการทหาร เป็นต้น ด้านที่มีความสำคัญมากและนิยมใช้พอลิเมอร์นำไฟฟ้ามากคือ ด้านการแพทย์ พอลิเมอร์นำไฟฟ้านิยมนำมาดัดแปลงเป็นเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดสารชีวภาพต่างๆ ในร่างกายเพื่อหาความผิดปกติที่อาจก่อให้เกิดโรคและวัดความร้ายแรงของโรค ทำให้การตรวจวัดอาการของโรคเป็นเรื่องสะดวกและรวดเร็ว ทำให้รักษาได้ทันเวลาที่ การใช้พอลิเมอร์นำไฟฟ้าเป็นเซนเซอร์จะสามารถแปลงสัญญาณจากปฏิกิริยาของสารที่ต้องการวัดกับส่วนของสารชีวภาพ (Bioreceptor) เป็นสัญญาณไฟฟ้าได้โดยตรง กล่าวคือเมื่อเกิดปฏิกิริยาขึ้นที่ส่วนของสารชีวภาพสัญญาณทางชีวภาพจะส่งผ่านพอลิเมอร์นำไฟฟ้ากลายเป็นสัญญาณไฟฟ้าและสามารถแสดงผลได้ทันที

พอลิอะนิลีนเป็นพอลิเมอร์นำไฟฟ้าชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในงานวิจัยทางด้านไบโอเซนเซอร์และเอนไซม์ เนื่องจากสามารถแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนได้โดยตรงกับ active site ของเอนไซม์ แต่ข้อจำกัดของพอลิอะนิลีนคือ ไม่สามารถนำไฟฟ้าได้ที่ pH ของสารละลายมากกว่า 4 ซึ่งไม่สามารถประยุกต์ใช้ได้กับการตรวจวัดสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งแปลกปลอมในร่างกายคนซึ่งมี pH เป็นกลางได้ การเลือกใช้พอลิเมอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของพอลิอะนิลีนและการทำโคพอลิเมอร์เชชันกับอนุพันธ์ของอะนิลีนที่มีหมู่ฟังก์ชันซึ่งสามารถทำให้พอลิเมอร์ชนิดนั้น ๆ มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ในสารละลายที่มี pH เป็นกลางได้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถพัฒนาเซนเซอร์ให้มีประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้ได้กับร่างกายคนเราได้ดีขึ้น

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการเตรียมและศึกษาลักษณะเฉพาะรวมถึงศึกษาสมบัติของแผ่นฟิล์มบางของ พอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพอลิอะนิลีนด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical method) โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic voltammetry) บนแผ่น DVD-R และ BD-R เคลือบด้วยทอง ซึ่งใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานในการทดลองทางเคมีไฟฟ้าด้วย แผ่นฟิล์มที่เตรียมได้คาดว่าจะสามารถใช้ในการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี ของคนโดยใช้เทคนิค Transmission-surface plasmon resonance (T-SPR) spectroscopy ต่อไปได้

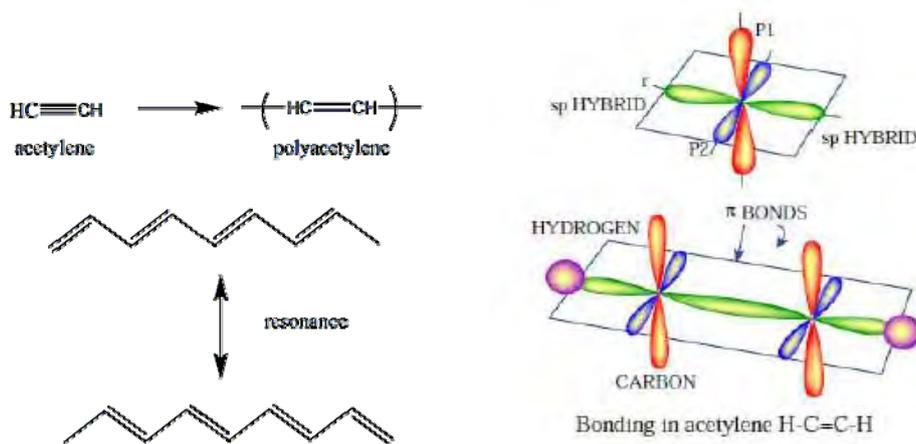
1.2 พอลิเมอร์นำไฟฟ้า (Conducting polymer) [1]

ในปัจจุบันพอลิเมอร์สังเคราะห์กลายเป็นที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้งานอย่างกว้างขวางทั้งในด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และอุตสาหกรรม พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่รู้จักกันมานานับร้อยปี ได้แก่ ยางและพลาสติก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมผลิตสารเคลือบ บรรจุภัณฑ์ และชิ้นส่วนของวัสดุต่างๆ เนื่องด้วยสมบัติยึดหยุ่น เป็นฉนวน ไม่นำความร้อน และไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี เรียกวัสดุประเภทนี้ว่า วัสดุประเภทพาสซีฟ (Passive materials) แต่มีพอลิเมอร์บางกลุ่มที่แสดงสมบัติเป็นสาร กึ่งตัวนำหรือสามารถนำไฟฟ้าได้ เรียกพอลิเมอร์กลุ่มใหม่นี้ว่า พอลิเมอร์นำไฟฟ้า ซึ่งถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1976 โดย อัลัน เจ ฮีเกอร์ (Alan J. Heeger) อัลัน จี แมกไดอาร์มิด (Alan G. MacDiarmid) และ ฮิเดกิ ชิรากาวา (Hideki Shirakawa) ร่วมกันค้นพบและศึกษาการสังเคราะห์พอลิอะเซทิลีนที่มีค่าการนำไฟฟ้าเทียบเท่าโลหะ ทำให้เกิดการพัฒนาพอลิเมอร์นำไฟฟ้าชนิดใหม่ต่อมาเพื่อให้มีคุณสมบัติตามความต้องการที่จะนำไปใช้งาน

1.2.1 โครงสร้างทางเคมี

โครงสร้างทางเคมีที่สำคัญของพอลิเมอร์นำไฟฟ้าเป็นแบบไพคอนจูเกต (π -conjugated system) โดยอะตอมของคาร์บอนต่อกันอยู่ด้วยพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวหรือมีวงแหวนอะโรมาติกหรือในวงแหวนประกอบด้วยอะตอมของธาตุไนโตรเจนและกำมะถัน ซึ่งส่งเสริมให้พอลิเมอร์กลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการกระจายอิเล็กตรอนที่ดี

ตัวอย่างพอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่เห็นได้อย่างชัดเจน คือ พอลิอะเซทิลีน ดังรูป 1.1 จะเห็นได้ว่ามีโครงสร้างที่อิเล็กตรอนไม่อยู่ที่ใดที่หนึ่งเฉพาะ (Delocalized electron) นั่นคือมีพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวทำให้อิเล็กตรอนสามารถเกิดเรโซแนนซ์ได้

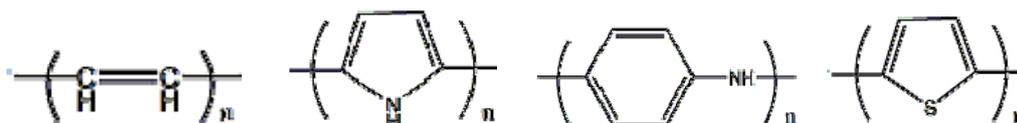


รูป 1.1 การเกิดเรโซแนนซ์ของพอลิอะเซทิลีน

ที่มา : http://ocw.mit.edu/courses/materials-science-and-engineering/3-063-polymer-physics-spring-2007/lecture-notes/lec21_07.pdf (30/5/2014)

1.2.2 สมบัติเชิงไฟฟ้าของพอลิเมอร์นำไฟฟ้า

พอลิเมอร์นำไฟฟ้าแต่ละชนิดอาจมีความสามารถในการนำไฟฟ้าแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ วิธีการสังเคราะห์ และการโด๊ป (Doping process) การโด๊ปเป็นกระบวนการที่ทำให้พอลิเมอร์นำไฟฟ้าได้ โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction) ทำให้พอลิเมอร์เหล่านี้ซึ่งจากเดิมเป็นฉนวนเปลี่ยนไปเป็นวัสดุที่สามารถนำไฟฟ้าได้ดีเหมือนโลหะ ดังแสดงในรูป 1.2 แต่อย่างไรก็ตาม สภาพตัวนำและฉนวนไฟฟ้าของพอลิเมอร์กลุ่มนี้สามารถผันกลับได้



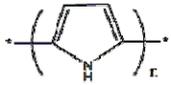
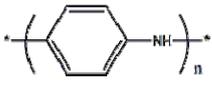
พอลิอะเซทิลีน (PAC) พอลิไพโรล (PPy) พอลิอะนิลีน (PAni) พอลิไทโอฟิน (PTh)

รูป 1.2 สูตรโครงสร้างทั่วไปของพอลิเมอร์นำไฟฟ้าบางชนิด [2]

เมื่ออยู่ในสภาวะปกติหรือสภาวะที่เป็นกลาง พอลิเมอร์เหล่านี้จะไม่สามารถนำไฟฟ้าได้ แต่เมื่อถูกกระตุ้นหรือโด๊ปเพื่อให้เกิดโครงสร้างที่ไม่เป็นกลาง เช่น การทำให้มีประจุบวกเกิดขึ้นในโครงสร้างจะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าของพอลิเมอร์นั้นสูงขึ้น โดยการกระตุ้นหรือการโด๊ปนั้น ในทางเคมี หมายถึง การทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์โดยอาจจะเป็นปฏิกิริยารีดักชันหรือปฏิกิริยาออกซิเดชันก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่เติมลงไปกระตุ้นหรือโด๊ป (dopant หรือ doping materials) ดังแสดงในตาราง 1.1

ความสามารถในการนำไฟฟ้าของพอลิเมอร์นำไฟฟ้าเหล่านี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ 2 ประการ คือ การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนภายในสายโซ่ (intra-molecular conductivity) และการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนระหว่างสายโซ่ (Inter-molecular conductivity)

ตาราง 1.1 โครงสร้างของพอลิเมอร์นำไฟฟ้าบางชนิดและสารกระตุ้นชนิดต่างๆ [3]

Polymer	Structure	Doping materials	Approximate conductivity (S/cm)
Polyacetylene	$(\text{CH})_n$	I_2 , Br_2 , Li, Na, AsF_3	$10,000^a$
Polypyrrole		BF_4^- , ClO_4^- , tosylate ^b	500-7500
Polythiophene		BF_4^- , ClO_4^- , tosylate ^b , FeCl_4^-	$1000-10,000^a$
Polyphenylene		AsF_3 , Li, K	1000
Polyfuran		BF_4^- , ClO_4^-	100
Polyaniline		HCl	200^a

1.2.3 การประยุกต์ใช้งาน [1,3]

ในปัจจุบันพอลิเมอร์นำไฟฟ้าได้รับความสนใจและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งในด้านเคมี ฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ และวิศวกรรมศาสตร์ เนื่องจากคุณสมบัติการนำไฟฟ้าที่ดี สัมประสิทธิ์และ ดัดแปลงได้ง่าย และมีราคาถูก จึงทำให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างการนำไปใช้งานแสดงดังตาราง 1.2

ตาราง 1.2 การประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆของพอลิเมอร์นำไฟฟ้า

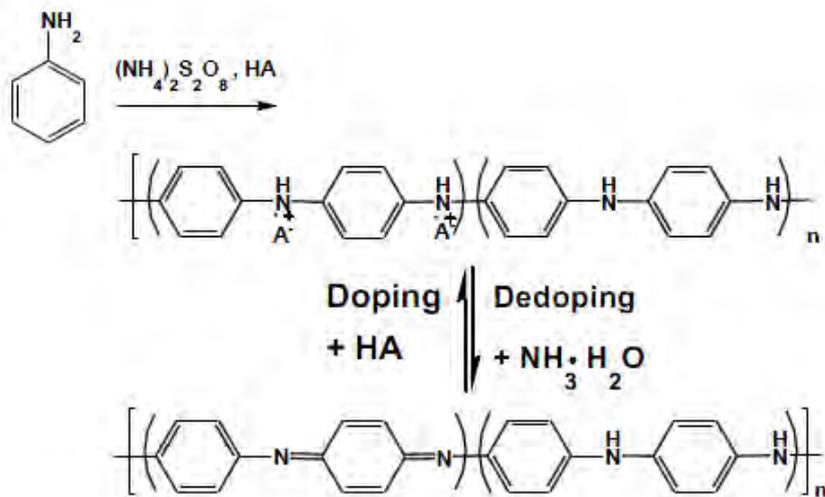
การใช้งานในด้านต่าง ๆ	ลักษณะการนำไปใช้งาน
1. ด้านการแพทย์	-การตรวจวินิจฉัยโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง เป็นต้น -การนำพายาเข้าสู่เป้าหมาย -อวัยวะเทียมภายนอกและภายในร่างกาย
2. ด้านสิ่งแวดล้อม	-การวิเคราะห์สารปนเปื้อนและมลพิษในน้ำและอากาศ
3. ด้านเคมี	-การแยกสารอินทรีย์ไอโอเมอร์ -การตรวจวัดสารเคมี -การวิเคราะห์หองค์ประกอบในสารตัวอย่าง -การแยกธาตุแต่ละชนิด -การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง
4. ด้านอิเล็กทรอนิกส์	-จอแสดงผลยืดหยุ่น -อุปกรณ์เปล่งแสง
5. ด้านพลังงาน	-แบตเตอรี่ -เซลล์เชื้อเพลิง
6. ด้านอุตสาหกรรม	-การป้องกันการกัดกร่อน -การป้องกันการรบกวนจากรังสี -การป้องกันไฟฟ้าสถิต
7. ด้านการทหาร	-การตรวจหาวัตถุระเบิด -การตรวจสอบสารพิษ

1.3 การสังเคราะห์พอลิเมอร์นำไฟฟ้า [1]

โดยทั่วไปวิธีการสังเคราะห์พอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่สำคัญ ได้แก่ การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical polymerization) การสังเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมี (Electrochemical polymerization หรือ electropolymerization) การสังเคราะห์โดยใช้แสง (Photochemical-initiated polymerization) และการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่ง (Enzyme-catalyzed polymerization) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.3.1 การสังเคราะห์ทางเคมี

การสังเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกในการสังเคราะห์พอลิเมอร์นำไฟฟ้าและได้รับความนิยมอย่างมากในการสังเคราะห์พอลิเมอร์เชิงการค้า โดยทั่วไปการสังเคราะห์ทางเคมีสามารถทำได้โดยใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิแดนท์ (Oxidant) ที่แรง เช่น แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) เฟอร์ริกไอออน (Ferric ions) เปอร์แมงกาเนตไอออน (Permanganate ions) หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) เป็นต้น ยกตัวอย่างเช่น พอลิอะนิลีนและอนุพันธ์เป็นสารไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในกรด (HA) เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ดังแสดงในรูป 1.3 เพราะฉะนั้นในกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี ไอออนลบ HSO_4^- หรือ SO_4^{2-} จะทำหน้าที่เป็นตัวได้ปให้กับสายโซ่หลักของพอลิเมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีอยู่ในช่วง $1-5^\circ\text{C}$



รูป 1.3 การสังเคราะห์พอลิอะนิลีนและอนุพันธ์ด้วยวิธีการทางเคมี [1]

1.3.2 การสังเคราะห์โดยใช้แสง

การสังเคราะห์พอลิอะนิลีนและอนุพันธ์โดยใช้แสงเป็นอีกหนึ่งวิธีการที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและไฟฟ้าเคมี การสังเคราะห์โดยใช้แสงมีข้อดี คือ เป็นกระบวนการที่ไม่เป็นภัยต่อสุขภาพของผู้ทดลอง สภาวะการทดลองเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า อีกทั้งยังมีต้นทุนในกระบวนการสังเคราะห์ต่ำกว่า การสังเคราะห์โดยใช้แสงเป็นอีกหนึ่งวิธีการที่มีประโยชน์อย่างมากในการเตรียมแผ่นฟิล์มที่ติดอยู่บนผิวของขั้วไฟฟ้า

1.3.3 การสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่ง

เมื่อไม่นานมานี้การสังเคราะห์พอลิอะนิลีนและอนุพันธ์โดยใช้เอนไซม์ เช่น ฮอร์สเซอร์ราดิชเปอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase, HRP) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นตัวเร่งในกระบวนการพอลิเมอร์ เซชันแทนการใช้ตัวออกซิเดนต์ต่างๆ แม่วิธีนี้จะมีประโยชน์ คือเป็นกระบวนการที่ไม่เป็นภัยต่อสุขภาพของผู้ทดลอง สภาวะการทดลองไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์โดยใช้แสง แต่พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มักจะมีมวลโมเลกุลต่ำและยังมีกิ่งก้านสาขาเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งจึงไม่เป็นที่นิยมในกลุ่มนักวิทยาศาสตร์

1.3.4 การสังเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมี

การสังเคราะห์พอลิเมอร์นำไฟฟ้าด้วยวิธีการทางไฟฟ้าเคมี เป็นวิธีการที่มีประโยชน์อย่างมากในการเตรียมแผ่นฟิล์มที่ติดอยู่บนผิวของขั้วไฟฟ้า (Electrode) ข้อดีของวิธีการทางไฟฟ้าเคมีคือ กระบวนการสังเคราะห์ทำได้ง่าย รวดเร็ว สามารถสังเคราะห์ทั้งสภาวะที่ใช้น้ำและไม่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จึงได้รับความนิยมอย่างมากในงานด้านเคมีวิเคราะห์ แต่ข้อเสียของวิธีการทางไฟฟ้าเคมีคือ ต้องการเครื่องมือทางไฟฟ้าเคมี ต้องการขั้วไฟฟ้าใช้งาน (Working electrode, WE) ขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode, CE) และขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode, RE) ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ใช้ต้องเป็นวัสดุที่นำไฟฟ้าได้ เช่น ขั้วกลาสซีคาร์บอน (Glassy carbon, GC) ขั้วโลหะทอง (Gold, Au) แพลตินัม (Platinum, Pt) หรือ ขั้วอินเดียมทินออกไซด์ (Indium tin oxide, ITO) ที่เคลือบบนกระจก รวมทั้งขนาดและรูปร่างของขั้วไฟฟ้าต้องเหมาะสมกับเครื่องมือด้วย

ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์นำไฟฟ้าด้วยวิธีทางไฟฟ้าเคมี มักใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic voltammetry) ซึ่งจะช่วยให้พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้เคลือบติดผิวขั้วไฟฟ้า ดัดแปลงรูปร่างได้ตามต้องการ สะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้งาน

1.4 ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensor) [4-5]

ไบโอสเซนเซอร์ คือ อุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพเป็นอุปกรณ์ที่นักวิทยาศาสตร์พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างเฉพาะเจาะจงและใช้ตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลากหลายชนิด

1.4.1 ส่วนประกอบของไบโอสเซนเซอร์

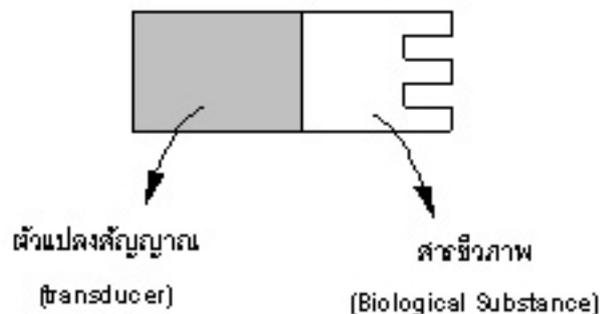
โดยรวมแล้วประกอบด้วยอุปกรณ์ 2 ส่วน คือ ตัวแปลงสัญญาณ และสารชีวภาพ

1. ตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) เป็นอุปกรณ์สำหรับแปลงสัญญาณเฉพาะต่างๆ เช่น อิเล็กตรอน แสง เป็นสัญญาณไฟฟ้าเพื่อเป็นดัชนีระบุถึงปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์

2. สารชีวภาพ (Biological substance) เป็นสารที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะเจาะจง

1.4.2 หลักการทำงานของไบโอสเซนเซอร์

ขั้นที่ 1 ทำการตรึงสารชีวภาพเข้ากับตัวแปลงสัญญาณเพื่อสร้างไบโอสเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์สารที่ต้องการ ดังรูป 1.4

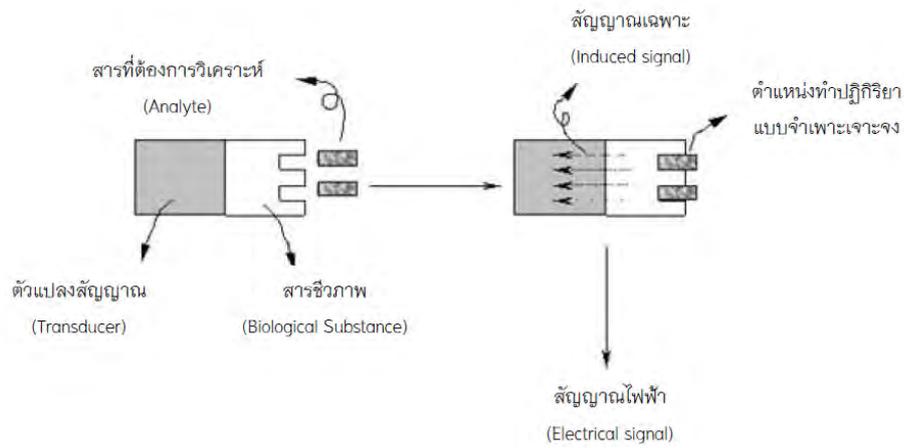


รูป 1.4 การตรึงสารชีวภาพเข้ากับตัวแปลงสัญญาณ

ที่มา : <http://www.vcharkarn.com/varticle/38381> (30/5/2014)

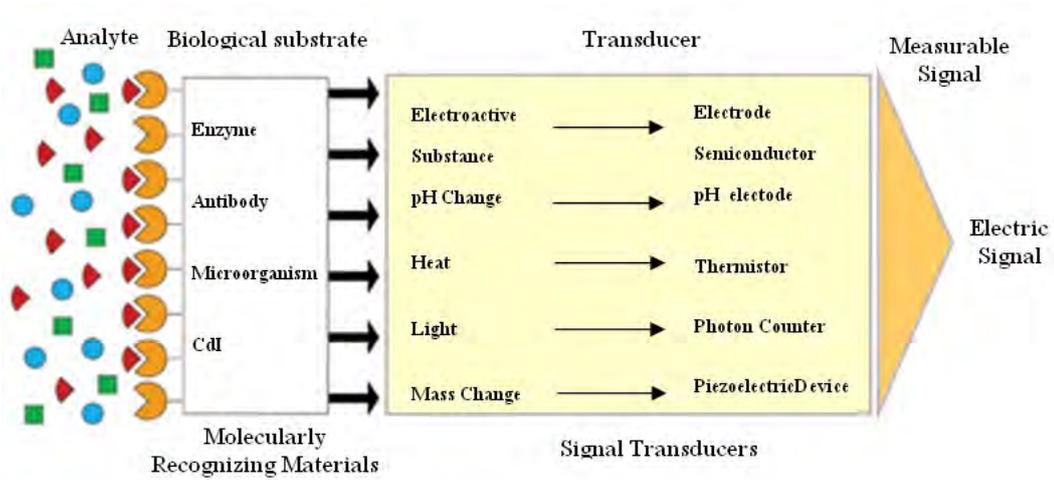
ขั้นที่ 2 นำไบโอสเซนเซอร์ที่ได้มาทำการตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในขั้นตอนนี้สารที่ต้องการวิเคราะห์จะจับกับไบโอสเซนเซอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะเจาะจงตรงส่วนของสารชีวภาพที่ถูกตรึงบนตัวไบโอสเซนเซอร์ เรียกขั้นตอนนี้ว่า “กลไกการจดจำทางชีวภาพ (Biological recognition mechanism)” จากการเข้าจับกันทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและมีการถ่ายทอดสัญญาณเฉพาะ (Indicated signal) ซึ่งอาจเป็นอิเล็กตรอน แสง และอื่นๆ เข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ ดังแสดงในรูป 1.5

ขั้นที่ 3 ตัวแปลงสัญญาณรับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้าผ่านเครื่องอ่านสัญญาณออกมา เรียกขั้นตอนนี้ว่า “เทคนิคของการรับและแปลงสัญญาณทางกายภาพ (Physical transduction technique)” ทำให้ทราบค่าสารตัวอย่างที่วิเคราะห์นั้นเป็นสารใด



รูป 1.5 การตรวจวัดและการแปลงสัญญาณไฟฟ้า
 ที่มา : <http://www.vcharkarn.com/varticle/38381> (30/5/2014)

ส่วนประกอบทั้งหมดและหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ แสดงดังรูป 1.6



รูป 1.6 ส่วนประกอบทั้งหมดและหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์
 ที่มา : <http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html> (30/5/2014)

1.4.3 การประยุกต์ใช้งานไบโอเซนเซอร์ [4-6]

ไบโอเซนเซอร์สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลายชนิดโดยอาศัยหลักการคือ การตรวจวัดสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะใช้ตัวแปลงสัญญาณและสารทางชีวภาพที่เฉพาะเจาะจงแตกต่างกันไปซึ่งมีประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่

- ด้านการแพทย์ การประยุกต์เทคโนโลยีตัวรับส่งสัญญาณ (sensor) มาใช้ในวินิจฉัยโรคต่างๆ ที่เกิดจากแบคทีเรีย ไวรัส การวัดปริมาณแก๊ส ไอออน และสารเมตาบอไลต์ในเลือด ตลอดจนการประเมินสภาวะของสารเมตาบอไลต์ในผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับสารชีวเคมีอย่างรวดเร็ว เช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวาน

- ด้านอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตร ใช้ไบโอเซนเซอร์ตรวจวัดสารพิษ เชื้อโรคปนเปื้อนในอาหาร สารปลอมปนในอาหารส่งออก และสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรม

- ด้านสิ่งแวดล้อม ใช้ในการวิเคราะห์สารปนเปื้อน โลหะหนัก และมลพิษในน้ำและอากาศของเสียจากโรงงาน เช่น การวัดค่าปริมาณการใช้ O₂ ของจุลินทรีย์ (BOD) ในการวัดคุณภาพน้ำ การวัดค่า pH ค่าการนำไฟฟ้าสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์

- ด้านการทหาร ซึ่งต้องการการวิเคราะห์ที่รวดเร็วสำหรับการตรวจสอบอันตรายที่ไม่ทราบในสนามรบ เช่น การวิเคราะห์แก๊ส sarin ซึ่งเป็นแก๊สที่มีผลต่อระบบประสาท ผ่นเหลืองจากเชื้อรา เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์วัตถุระเบิดได้อีกด้วย

1.4.4 ตัวอย่างไบโอเซนเซอร์ [6]

เครื่องมือที่ใช้หลักการทำงานแบบไบโอเซนเซอร์ในปัจจุบันมีความหลากหลาย และใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น มีทั้งที่อยู่ในชั้นของงานวิจัยและในเชิงพาณิชย์ มีแนวโน้มการพัฒนาให้มีขนาดเล็ก ใช้งานง่าย และพกพาสะดวก ตัวอย่างของเครื่องตรวจวัดที่เป็นไบโอเซนเซอร์ ได้แก่

- เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน

- เครื่องตรวจวัดสารอื่นๆ ในร่างกายเช่น ยูเรีย ฮอร์โมน กรด-เบส ฯลฯ

- เครื่องตรวจวัดสารปนเปื้อนในน้ำ

- เครื่องตรวจแบคทีเรียในอากาศ

- เครื่องตรวจจับเชื้อโรค ไวรัส

- เครื่องตรวจวัดวิตามินในอาหาร

- เครื่องตรวจวัดปริมาณยาในอาหาร เช่น ยาปฏิชีวนะ ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต และสารเร่งเนื้อแดง

- เครื่องตรวจวัดโปรตีนในอุตสาหกรรม เป็นต้น

1.5 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อประดิษฐ์แผ่นฟิล์มบางของพอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่หมุ่คาร์บอกซิลิกโดยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันและศึกษาสมบัติของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้ก่อนทำการสร้างเป็นอิมมูโนเซนเซอร์
2. เพื่อออกแบบและสร้างอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มที่ประดิษฐ์ได้
3. เพื่อทำการทดสอบอิมมูโนเซนเซอร์ที่ได้เพื่อใช้ในการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี ของคนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

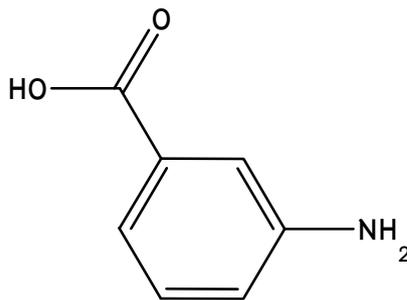
2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมและการทำความสะอาดแผ่น DVD-R และ BD-R ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

ตัดครึ่งแผ่น DVD-R เป็นครึ่งวงกลมแล้วแยกแต่ละครึ่งวงกลมออกเป็น 2 ส่วน เก็บส่วนที่เห็นเป็นแถบสีน้ำเงินไว้ กรณีแผ่น BD-R ให้ลอกแผ่นบางฟิล์มสีเงินบาง ๆ ที่เคลือบด้านล่างของแผ่นออกทิ้งแล้วเก็บส่วนด้านบนที่เห็นเป็นแถบสีน้ำเงินไว้ จากนั้นตัดแผ่น DVD-R และ BD-R ให้ได้ตามขนาดที่ต้องการใช้ในการทดลอง แล้วแช่ในกรดไนตริกเข้มข้น 15 นาที ตามด้วยล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ รอบ และล้างด้วยเอทานอล ทำให้แห้งก่อนที่จะนำไปเคลือบด้วยทองโดยการทำให้ vacuum evaporation ต่อไป

2.2 การเตรียมสารละลายมอนอเมอร์เพื่อใช้ในการเตรียมแผ่นฟิล์ม

สารละลายมอนอเมอร์ที่ใช้คือ 3-aminobenzoic acid ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอะนิลีน มีโครงสร้างดังนี้



3-aminobenzoic acid

ทำการเตรียมสารละลายมอนอเมอร์ความเข้มข้น 50 mM ใน 0.5 M H₂SO₄ (HPLC grade) เพื่อทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรไลต์ช่วยในการทำไซคลิกโวลแทมเมตรีต่อไป

2.3 การเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี

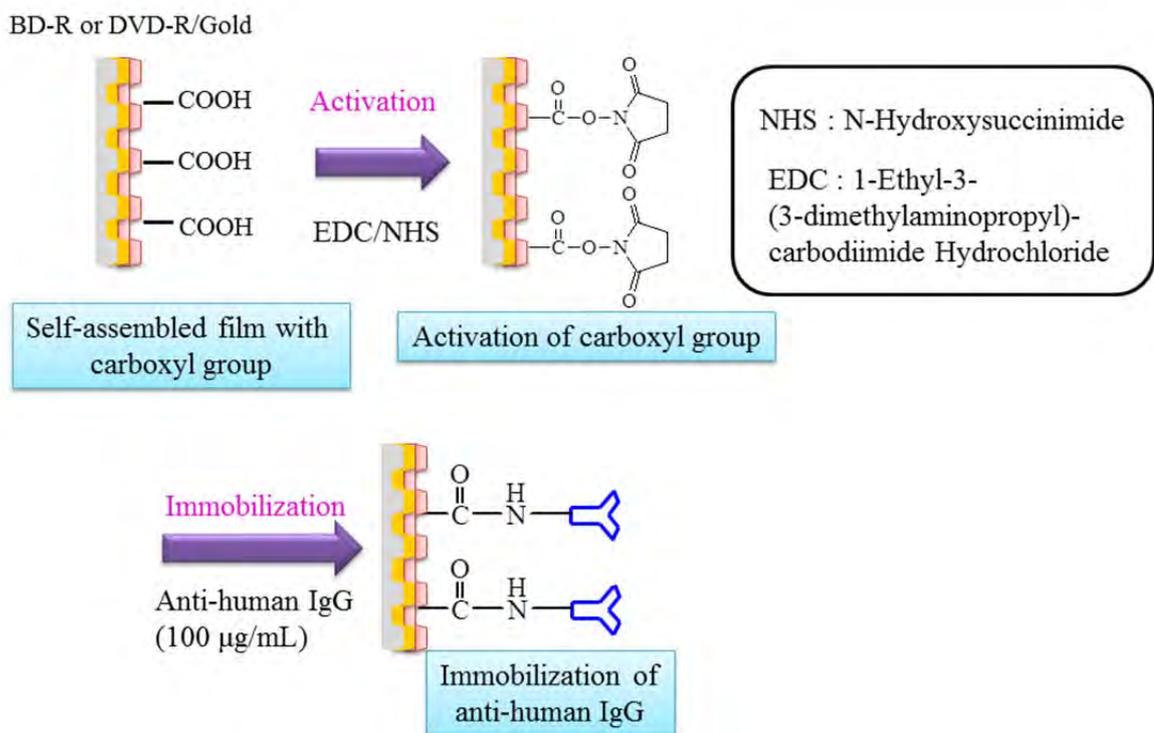
การเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ทำโดยใช้แผ่น DVD-R และแผ่น BD-R ที่เคลือบด้วยทองเป็นขั้วทำงาน (working electrode) ขั้ว Ag/AgCl เป็นขั้วอ้างอิง (reference electrode) และใช้ลวดแพททินัมเป็นขั้วช่วย (counter electrode) จุ่มลงในสารละลายมอนอเมอร์ที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการจ่ายความต่างศักย์ในช่วง -0.2 V ถึง 0.9 V จำนวน 5 รอบ ที่ scan rate เท่ากับ 20 mV/s พร้อมทั้งติดตามการเกิดแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Transmission-surface plasmon resonance (T-SPR) spectroscopy

2.4 การทดสอบสมบัติของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ในสารละลายที่มีค่า pH เป็นกลาง

การทดสอบสมบัติการนำไฟฟ้าของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้ก่อนนำไปสร้างเป็นอิมมูโนเซนเซอร์ทำโดยนำแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้จุ่มในสารละลาย phosphate buffer saline, PBS (pH = 7.4) จากนั้นทำการจ่ายความต่างศักย์ในช่วง -0.2 V ถึง 0.4 V จำนวน 1 รอบ ที่ scan rate ค่าต่าง ๆ คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 mV/s ตามลำดับ โดยใช้ขั้ว Ag/AgCl เป็นขั้วอ้างอิง และใช้หลอดแพททินัมเป็นขั้วช่วย

2.5 การออกแบบและสร้างอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้

การออกแบบและการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมได้บนแผ่น DVD-R และ BD-R แสดงดังรูป 2.1 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ หลังจากได้แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์แล้วทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลิกของพอลิเมอร์ให้เป็นหมู่เอสเทอร์โดยใช้สารละลายผสมของ EDC/NHS ในน้ำ จากนั้นทำการตรึง anti-human IgG ความเข้มข้น 100 µg/mL ซึ่งเตรียมในสารละลาย PBS การติดตามการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์ทำโดยใช้เทคนิค T-SPR spectroscopy



รูป 2.1 แผนผังแสดงการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์บนแผ่น DVD-R และ BD-R

ทำการผลิตแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์โดยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันได้แล้ว ทำการผลิตอิมมูโนเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลินจีในคน ดังนี้

- 1) ทำการล้างแผ่นฟิล์มที่ได้ด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ รอบ
- 2) ทำการแช่แผ่นฟิล์มที่ได้ด้วยสารผสม EDC/NHS เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบแล้วทำการล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย PBS
- 3) ทำการฉีดสารละลายแอนติอิมมูโนโกลบูลิน จี เข้มข้น 100 µg/mL แล้วทำการแช่เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบแล้วทำการล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย PBS
- 4) ทำการแช่แผ่นฟิล์มที่ได้ด้วยสารละลาย 0.2 M Ethanolamine–hydrochloride (EA–HCl) ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบแล้วทำการล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย PBS
- 5) แผ่นฟิล์มที่ได้จากการเคลือบด้วยแอนติอิมมูโนโกลบูลิน จี สามารถนำไปทำการตรวจวัด อิมมูโนโกลบูลิน จี โดยใช้ความเข้มข้น 5 µg/mL ในสารละลาย PBS

เมื่อทำเสร็จแล้วทุกขั้นตอนต้องทำการวัด T-SPR curve ของแผ่นฟิล์มที่ได้ในสารละลาย PBS โดยวิธี T-SPR spectroscopy

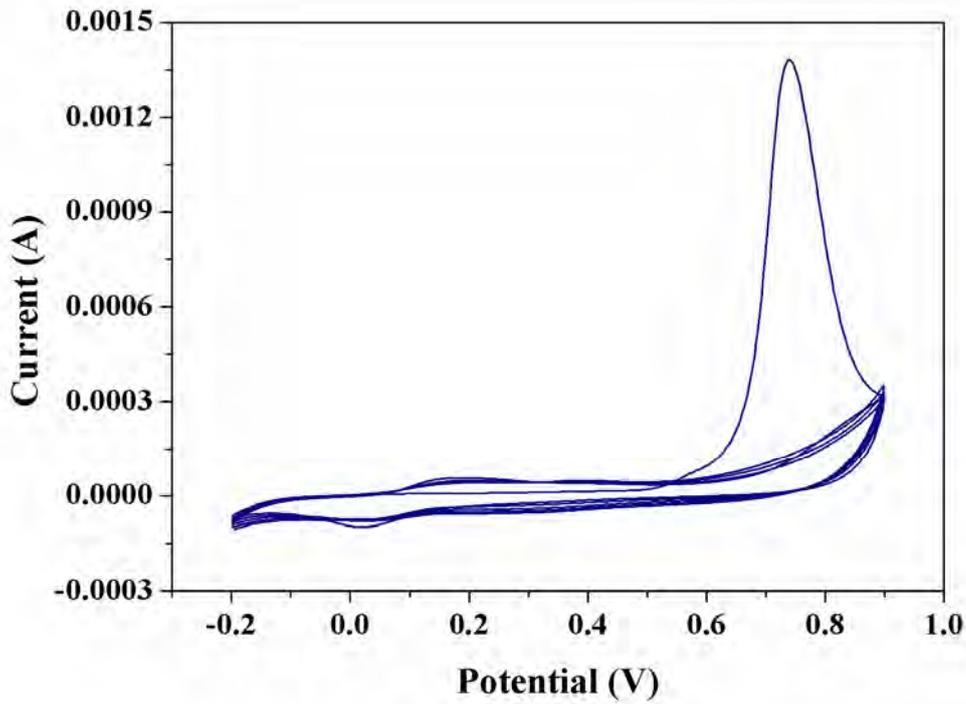
2.6 การศึกษาสัญญาณวิทยาของอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้

ทำการศึกษาสัญญาณวิทยาของแผ่นฟิล์มอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมได้บนแผ่น DVD-R และ BD-R โดยเทคนิค atomic force microscopy (AFM)

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี

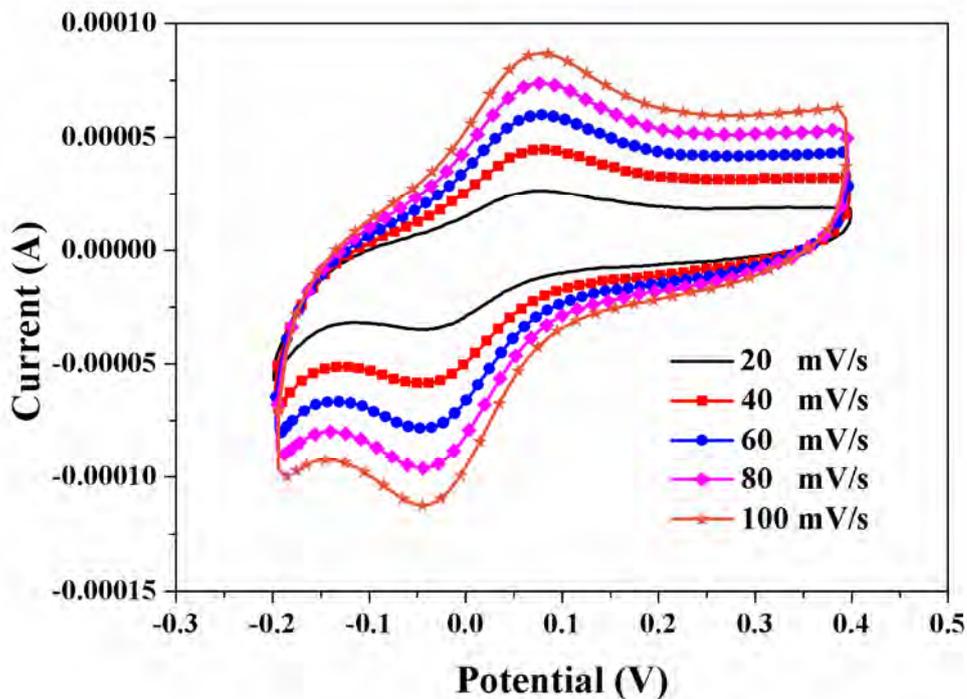
รูปกราฟแสดง Cyclic voltammogram ของการเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์บนแผ่น DVD-R และแผ่น BD-R ที่เคลือบด้วยทอง แสดงดังรูป 3.1



รูป 3.1 Cyclic voltammogram ของการเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์จากมอนอเมอร์ 3-aminobenzoic acid

จากรูปจะเห็นว่าเมื่อทำการจ่ายความต่างศักย์ในช่วง -0.2 V ถึง 0.9 V ที่ scan rate เท่ากับ 20 mV/s จำนวน 5 รอบ พบว่าเริ่มเกิดพอลิเมอร์ขึ้นเมื่อทำการจ่ายไฟฟ้าไปถึง 0.5 V และปรากฏ polymerization peak ที่ประมาณ 0.75 V ในรอบแรกของการจ่ายความต่างศักย์ และแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้มี oxidation peak อยู่ที่ประมาณ 0.2 V และ reduction peak อยู่ที่ประมาณ 0.02 V

แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้นำมาศึกษาความสามารถในการเกิด oxidation (หรือ doping) และการเกิด reduction (หรือ dedoping) ในสารละลาย 0.5 M H₂SO₄ โดยมีขั้ว Ag/AgCl เป็นขั้วอ้างอิง (reference electrode) และใช้ลวดแพลตินัมเป็นขั้วช่วย จากนั้นทำการจ่ายความต่างศักย์ในช่วง -0.2 V ถึง 0.4 V ที่ scan rate ตั้งแต่ 20-100 mV/s จำนวน 1 รอบในแต่ละ scan rate รูปกราฟแสดง Cyclic voltammogram ของการศึกษาความสามารถในการเกิด oxidation (หรือ doping) และการเกิด reduction (หรือ dedoping) ของฟิล์มพอลิเมอร์บนแผ่น DVD-R และแผ่น BD-R ที่เคลือบด้วยทอง แสดงดังรูป 3.2



รูป 3.2 Cyclic voltammogram ของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ poly(3-aminobenzoic acid) ใน 0.5 M H₂SO₄

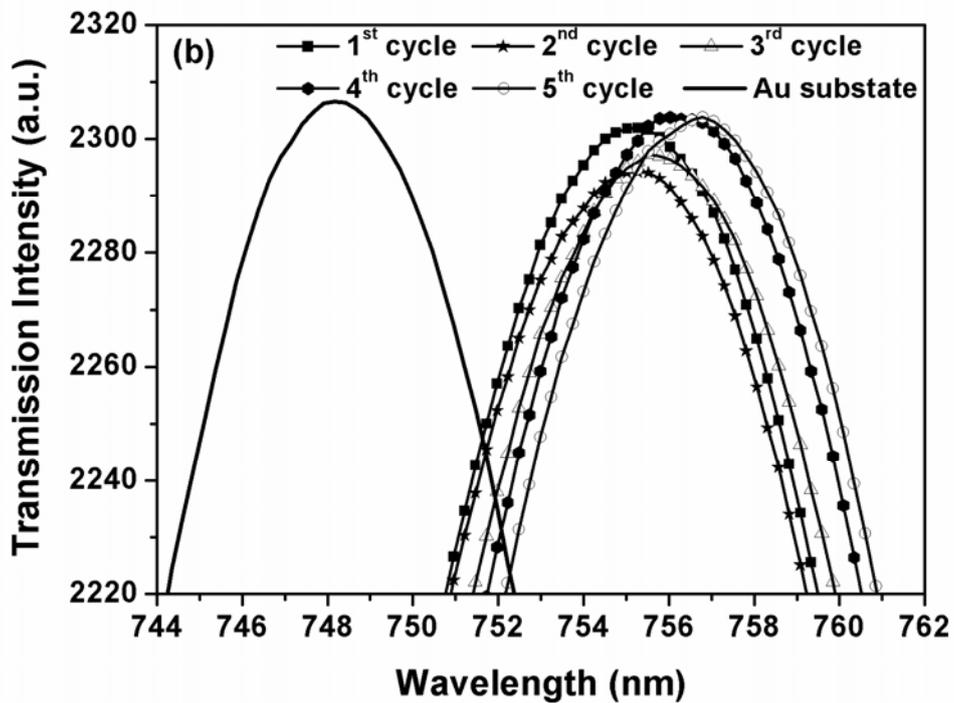
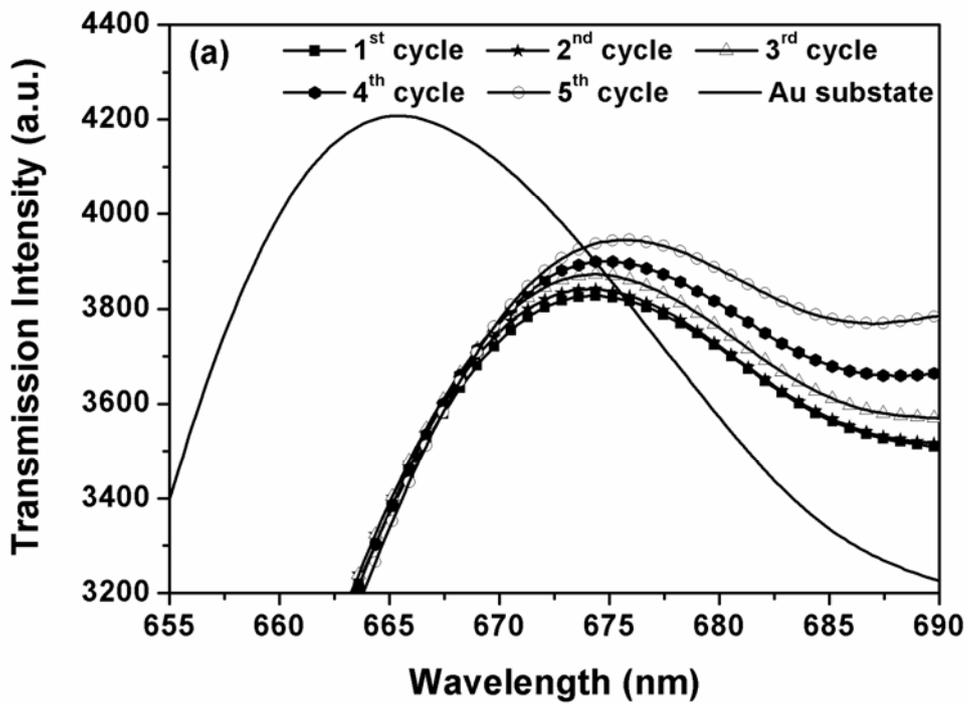
จากรูปจะเห็นว่าเมื่อทำการจ่ายความต่างศักย์ในช่วง -0.2 V ถึง 0.4 V ที่ scan rate ค่าต่าง ๆ คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 mV/s จำนวน 1 รอบ ใน 0.5 M H₂SO₄ พบว่าแผ่นฟิล์มที่ได้มีประสิทธิภาพในการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer) ได้ดี สังเกตได้จากการที่กระแสมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ scan rate ค่าเพิ่มขึ้น โดยมีการเกิด oxidation (หรือ doping) ที่ความต่างศักย์ประมาณ 0.07 V และการเกิด reduction (หรือ dedoping) ที่ความต่างศักย์ประมาณ -0.04 V

หมายเหตุ ผล cyclic voltammogram ที่ได้จากการทำอิเล็กโทรพอลิเมอร์เซชันบนทั้งแผ่น DVD-R และ BD-R เหมือนกัน

3.2 การติดตามการเกิดฟิล์มพอลิเมอร์โดยเทคนิค T-SPR spectroscopy

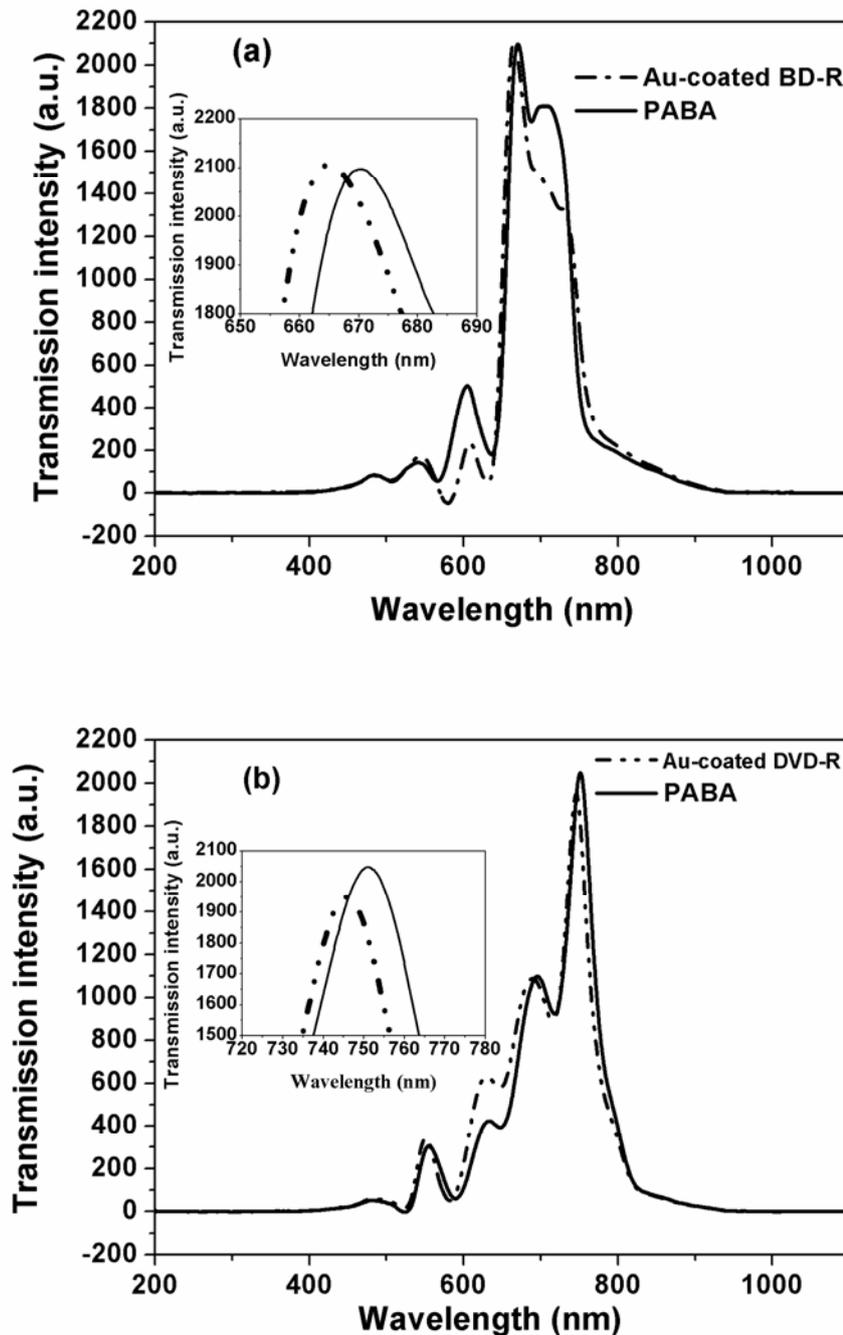
เทคนิค T-SPR spectroscopy เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวในตัวอย่างชนิดต่างๆ ในการทดลองนี้ได้ใช้เทคนิค T-SPR spectroscopy ในการติดตามการเกิดขึ้นของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกบนแผ่น DVD-R และ BD-R ซึ่งเป็นวัสดุทางการค้าที่หาได้ซื้อได้ง่าย โดยแผ่นทั้งสองมีคุณสมบัติในการเป็น grating ด้วยการเกิด transmission peak จะขึ้นอยู่กับช่องว่างระหว่าง grating ของแผ่น DVD-R และ BD-R

การติดตามการเกิดขึ้นของแผ่นฟิล์มทุกรอบของการทำอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันทำโดยการวัด T-SPR spectra แบบ wavelength scan ซึ่งแสดงดังรูป 3.3 ซึ่งแสดงให้เห็นเฉพาะส่วนที่เป็น transmission peak ของแต่ละแผ่น พบว่า transmission peak มีค่า wavelength ที่เปลี่ยนไปในทางที่มีค่ามากขึ้นในแต่ละรอบหลังจากการทำอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันเมื่อเปรียบเทียบกับเฉพาะแผ่น DVD-R (ประมาณ 748 nm) หรือ BD-R (ประมาณ 665 nm) เคลือบทองก่อนการทำพอลิเมอร์ไรเซชัน ค่า wavelength ที่เพิ่มขึ้นนี้แสดงถึงความหนาของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบนั่นเอง



รูป 3.3 T-SPR spectra (wavelength scan) หลังจากทำอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันแต่ละรอบบนแผ่น (a) BD-R และ (b) DVD-R ในสารละลายมอนอเมอร์ที่ละลายใน 0.5 M H_2SO_4

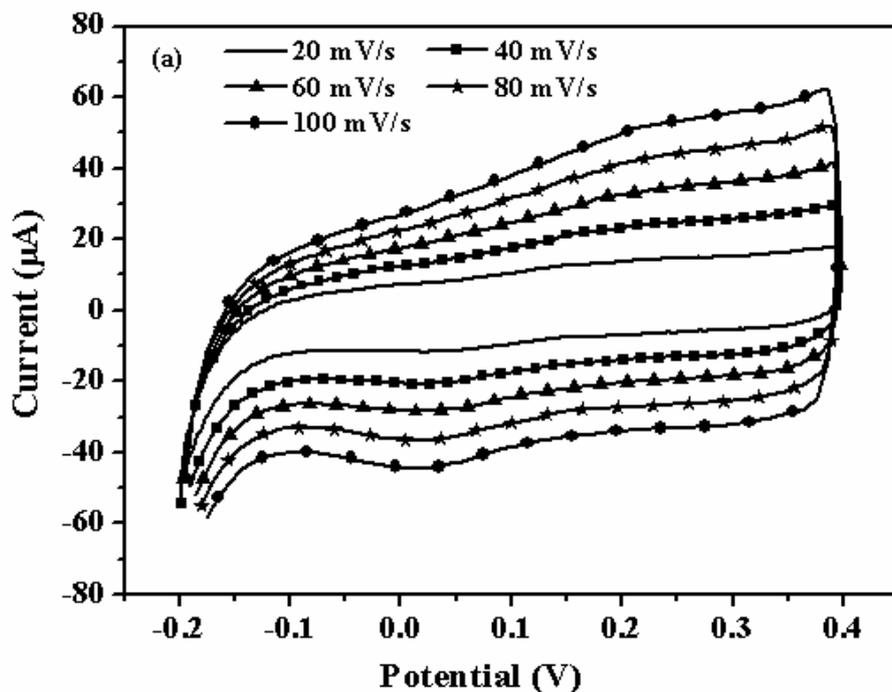
รูป 3.4 แสดง T-SPR spectra ก่อนและหลังจากการทำอิเล็กโทรพอลิเมอร์โรเซชันครบ 5 รอบแล้ว พบว่าหลังจากทำอิเล็กโทรพอลิเมอร์โรเซชันแล้วค่า wavelength มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 7 nm (ประมาณ 755 nm สำหรับ DVD-R และ ประมาณ 672 nm สำหรับ BD-R) เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่น DVD-R หรือ BD-R เคลือบทองเปลวก่อนการทำอิเล็กโทรพอลิเมอร์โรเซชัน แสดงให้เห็นว่าการเกิดฟิล์มพอลิเมอร์ขึ้นบนแผ่นขั้วไฟฟ้าทำงานทั้ง 2 ชนิดที่ใช้



รูป 3.4 T-SPR spectra (wavelength scan) ในน้ำก่อนและหลังการทำอิเล็กโทรพอลิเมอร์โรเซชันครบ 5 รอบบนแผ่น (a) BD-R และ (b) DVD-R

3.2 การทดสอบสมบัติของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ในสารละลายที่มีค่า pH เป็นกลาง

เนื่องจากการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์และการใช้อิมมูโนเซนเซอร์ในการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี นั้นต้องทำในสารละลายที่มีค่า pH เป็นกลาง ดังนั้นก่อนที่จะทำการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี จึงต้องทำการศึกษาสมบัติของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ก่อนในสารละลายที่มีค่า pH เป็นกลางก่อน แสดงในรูป 3.5 คือ cyclic voltammogram ที่ได้จากการทดสอบแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ในสารละลาย PBS โดยทำการจ่ายศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2 V ถึง 0.4 V จำนวน 1 รอบ ที่ scan rate ค่าต่าง ๆ คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 mV/s พบว่าแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้มีความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ สังเกตได้จากกระแสไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นเมื่อค่า scan rate เพิ่มขึ้น จึงคาดว่าสามารถใช้แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้ในการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี โดยการติดตามด้วยเทคนิค T-SPR ต่อไป

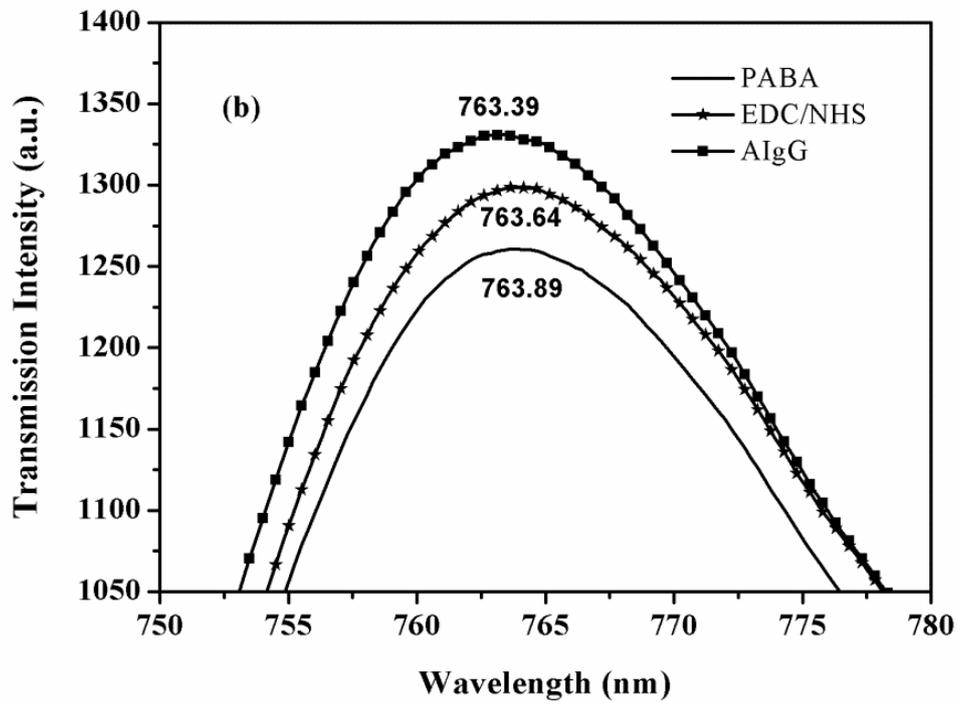
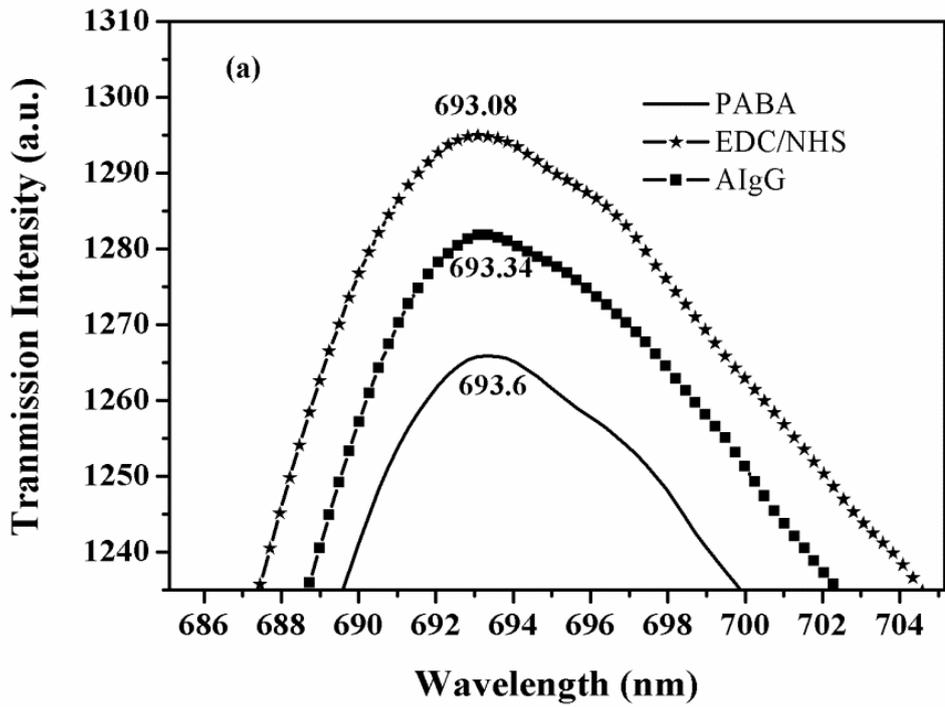


รูป 3.5 Cyclic voltammogram ของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ poly(3-aminobenzoic acid) ในสารละลาย PBS

3.3 การออกแบบและสร้างอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้เพื่อใช้ในการตรวจวัด อิมมูโนโกลบูลิน จี

การติดตามการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมได้บนแผ่น DVD-R และ BD-R โดยใช้เทคนิค T-SPR แสดงดังรูป 3.6 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ หลังจากได้แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ (PABA) แล้ว นำแผ่นฟิล์มที่ไว้วัด T-SPR spectrum ในสารละลาย PBS จากนั้นทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลิกของพอลิเมอร์ให้เป็นหมู่เอสเทอร์โดยใช้สารละลายผสมของ EDC/NHS ในน้ำ หลังจากล้างแผ่นฟิล์มที่ได้แล้วทำการวัด T-SPR spectrum ของฟิล์มที่ได้ในสารละลาย PBS และทำการตรึง anti-human IgG ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในสารละลาย PBS หลังจากล้างแผ่นฟิล์มที่ได้แล้วทำการวัด T-SPR spectrum ของฟิล์มที่ได้ในสารละลาย PBS

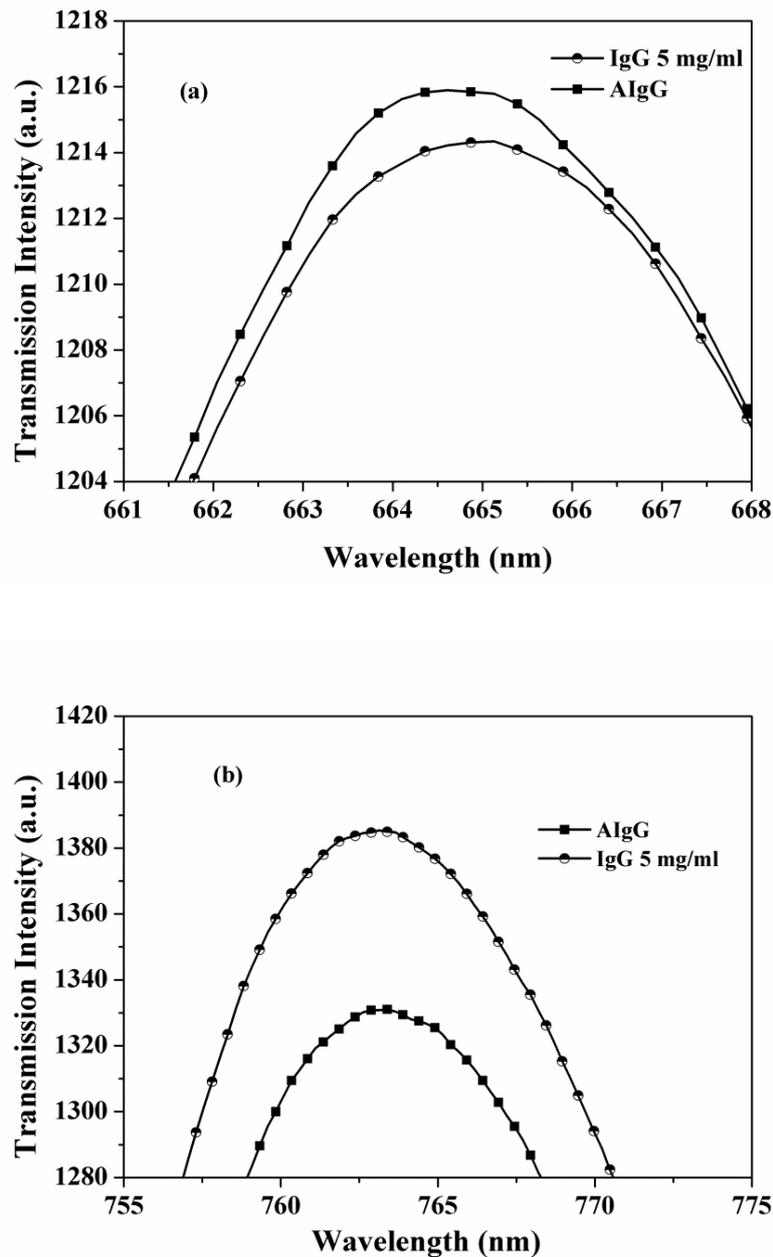
การติดตามการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์โดยการวัด T-SPR spectrum นั้นพบว่า T-SPR peak ของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงไปทั้ง intensity และ wavelength พิจารณาจากรูป 3.6 พบว่าแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์เมื่อทำการตรึงด้วย anti-human IgG แล้วมีค่า intensity เพิ่มขึ้นแสดงถึงการที่มี anti-human IgG ตรึงบนแผ่นพอลิเมอร์ และพบว่าค่า wavelength ของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์หลังจากการตรึงด้วย anti-human IgG มีค่าลดลงเล็กน้อยซึ่งแสดงถึงการที่มี anti-human IgG ตรึงบนแผ่นพอลิเมอร์เช่นกัน



รูป 3.6 T-SPR spectra (wavelength scan) ที่ได้จากการติดตามระหว่างการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์

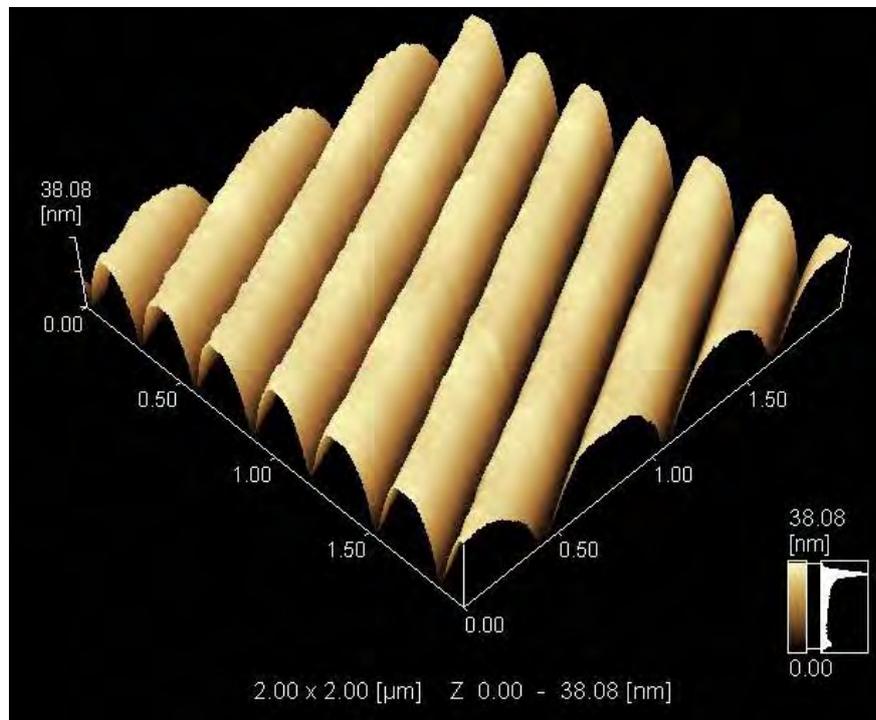
(a) BD-R และ (b) DVD-R

ขั้นตอนการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลิน จี นั้นทำได้โดยการฉีดสารละลายอิมมูโนโกลบูลิน จี ของคนที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ลงบนแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการติดตามผลที่ได้โดยการวัด T-SPR curve พบว่า T-SPR peak หลังจากฉีดอิมมูโนโกลบูลิน จี มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่ตรึงด้วยแอนติอิมมูโนโกลบูลิน จี ดังแสดงในรูป 3.7(a) สำหรับการทดลองบนแผ่น BD-R มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่ตรึงด้วยแอนติอิมมูโนโกลบูลิน จี ดังแสดงในรูป 3.7(b) สำหรับการทดลองบนแผ่น DVD-R

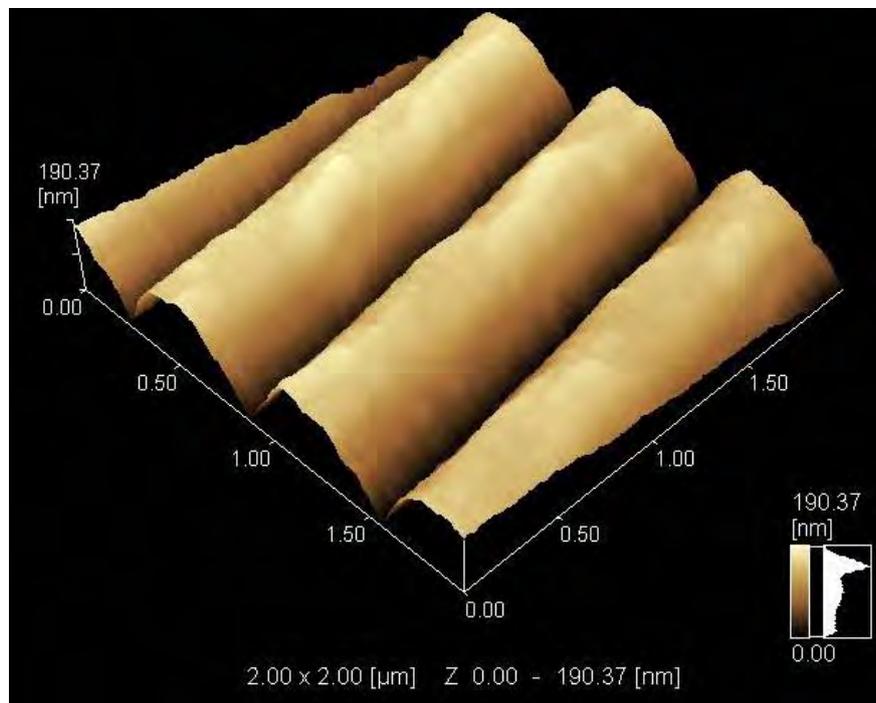


รูป 3.7 T-SPR spectra (wavelength scan) ที่ได้จากการตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลินจี (a) BD-R และ (b) DVD-R

รูป 3.8 แสดงภาพถ่าย AFM เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมได้บนแผ่น BD-R (รูป 3.8a) DVD-R (รูป 3.8b)



(a)



(b)

รูป 3.8 ภาพถ่าย AFM ของอิมมูโนเซนเซอร์จากแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมได้บนแผ่น

(a) BD-R (b) DVD-R

เอกสารอ้างอิง

- [1] เสนอ ชัยรัมย์. พอลิอะนิลีนและอนุพันธ์นำไฟฟ้า: การสังเคราะห์ และการประยุกต์ใช้งาน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ปีที่ 14, 2555.
- [2] Bhadra, S.; Khastgir, D.; Singha, N.K.; Lee, J.H. "Progress in preparation, processing and applications of polyaniline." *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34, 783.
- [3] จตุพร วุฒิกนกกาญจน์ (2013). "การสังเคราะห์พอลิเมอร์โดยใช้ปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมี. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก:
<http://www.seem.kmutt.ac.th/research/pentec/download/Chapter%2011.pdf>. (25/1/2013)
- [4] จริญญา จักรมณี. ไบโอสเซนเซอร์ หลักการทั่วไปและตัวอย่างการประยุกต์ใช้, 2012.
- [5] วราภรณ์ บุรณานนท์ (2013). "Biosensor." (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก: <http://www.gpo.or.th/rdi/html/biosensor.html>. (17/02/2013)
- [6] Harsányi, G. "Sensors in Biomedical Applications." CRC Press, 2000.

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง ดังนี้

1. Paphawadee Netsuwan, **Saengrawee Sriwichai***, Sukon Phanichphant, Akira Baba, Kazunari Shinbo, Keizo Kato and Futao Kaneko, "Fabrication of Carboxylated Conducting Polymer/CNTs Composites Thin Films for Immunosensor Application" *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2013, Vol. 580: pp. 7–14. (doi:10.1080/15421406.2013.803890)
2. Paphawadee Netsuwan, Wirat Chaisu, Sukon Phanichphant and **Saengrawee Sriwichai***, "Nanocomposite Thin Film of Poly(3-aminobenzoic acid) and Multi-walled Carbon Nanotubes Fabricated through Electrochemical Method" *Advances in Materials Science and Engineering*, 2014, Article number 873028. (doi:10.1155/2014/873028)

This article was downloaded by: [Chiang Mai University]

On: 11 October 2013, At: 03:12

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Molecular Crystals and Liquid Crystals

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gmcl20>

Fabrication of Carboxylated Conducting Polymer/CNTs Composites Thin Films for Immunosensor Application

P. Netsuwan^a, S. Sriwichai^b, S. Phanichphant^b, A. Baba^c, K. Shinbo^c, K. Kato^c & F. Kaneko^c

^a Nanoscience and Nanotechnology Program, The Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

^c Center for Transdisciplinary Research and Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Niigata, Japan

Published online: 11 Sep 2013.

To cite this article: P. Netsuwan, S. Sriwichai, S. Phanichphant, A. Baba, K. Shinbo, K. Kato & F. Kaneko (2013) Fabrication of Carboxylated Conducting Polymer/CNTs Composites Thin Films for Immunosensor Application, *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 580:1, 7-14, DOI: [10.1080/15421406.2013.803890](https://doi.org/10.1080/15421406.2013.803890)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15421406.2013.803890>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms &

Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Fabrication of Carboxylated Conducting Polymer/CNTs Composites Thin Films for Immunosensor Application

P. NETSUWAN,¹ S. SRIWICHAI,^{2,*} S. PHANICHPHANT,²
A. BABA,³ K. SHINBO, K. KATO,³ AND F. KANEKO³

¹Nanoscience and Nanotechnology Program, The Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

³Center for Transdisciplinary Research and Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Niigata, Japan

Electropolymerization of carboxylated conducting polymer/carbon nanotubes (CNTs) composites thin films has been studied by in situ electrochemical-surface plasmon resonance (EC-SPR) spectroscopy. Two derivatives of benzothiophene, thianaphthene-2-carboxylic acid and benzothiophene-2-propionic acid, composited with CNTs were electropolymerized in an acetonitrile with the potential range between 0 and 1.2 V at scan rate of 20 mV/s. The obtained films were characterized by in situ EC-SPR spectroscopy, UV-vis absorption spectroscopy, and atomic force microscopy. It was found that CNTs can improve properties of polymer/CNT composites films. Moreover, the obtained thianaphthene-2-carboxylic acid film can be further used for construction of immunosensor for detection of human IgG.

Keywords Benzothiophene-2-propionic acid; carbon nanotubes; composite; electrochemical-surface plasmon resonance; electropolymerization; thianaphthene-2-carboxylic acid

1. Introduction

Conducting polymers consist of π -bond in polymer backbone which led them to have unusual electrochemical, electrical and optical properties [1–2]. There have been many studies about the improvement of response property and sensitivity of conducting polymer based biosensors which conducting polymers were employed to transfer electrons between biomolecules and electrode [3–5]. Carbon nanotubes (CNTs) have the unique behavior in electrical, chemical, mechanical and structural properties [6]. CNTs can enhance the electrochemical reactivity of biomolecules and can promote the electron transfer of oxidation-reduction in electropolymerization and increased the amount of polymer loading on the large effective surface area of CNTs [7–9]. The well-known technique, in situ

*Address correspondence to Saengraee Sriwichai, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand. Tel.: +66 85 106 2185; Fax: +6653 892277. E-mail: saengraee.s@cmu.ac.th

electrochemical-surface plasmon resonance (EC-SPR) spectroscopy, has been used for investigation the optical and electrical properties of conducting polymer films at solid/liquid interfaces. The technique was also employed to monitor the kinetic of electropolymerization and immobilization biomolecules on the conducting thin films [10–13].

In this work, the composites of two derivatives of benzothiophene, thianaphthene-2-carboxylic acid and benzothiophene-2-propionic acid, with CNTs were prepared. The kinetic during electropolymerization of these composites on gold-coated high refractive index glass substrate, which used as working electrode, was studied by in situ EC-SPR spectroscopy. The UV-vis absorption spectra were recorded before (composite solution) and after electropolymerization (composite thin films). The surface morphology of the films was obtained from AFM. Moreover, the thianaphthene-2-carboxylic acid film was examined for label-free detection of human immunoglobulin G (IgG).

2. Experimental Details

2.1 Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. A single-walled carbon nanotubes (SWNTs) was obtained from Microphase Co. The composite solution of monomer/SWNTs was solubilized by the following method. The mixture of 10 mM of thianaphthene-2-carboxylic acid or benzothiophene-2-propionic acid and 0.25 mg/mL SWNTs was obtained by mixing with 0.1 M of tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF₆) in anhydrous acetonitrile and then sonicated for 24 h. The aggregated SWNTs was removed by centrifugation at 5000 rpm for 30 min. The supernatant was finally collected and characterized by UV-vis absorption spectroscopy (JASCO V-650 Spectrophotometer) before use in electropolymerization experiment.

2.2 Methods

All electropolymerization experiment was performed using 3 electrode setup potentiostat (HZ5000 model, Hokuto Denko Ltd., Japan) with Pt wire as counter electrode, Ag/Ag⁺ non-aqueous electrode as reference electrode, and Au (thickness of 47 nm) coated on high refractive index glass substrate as working electrode, respectively. The kinetic during electropolymerization was monitored by EC-SPR spectroscopy. The potential range was ranging from 0 V to 1.2 V at scan rate of 20 mV/s for 5 cycles. The thickness of the films was calculated by fitting the obtained SPR angular scan reflectivity curve by Fresnel equation algorithm using Winspall version 2.2. Atomic force microscopy (SHIMADZU, SPM9600) was employed to study morphology of the obtained thin films.

3. Results and Discussion

The UV-vis absorption spectra of the obtained composite solutions and films are shown in Fig. 1. The absorption peak of monomer and composite solutions and films appeared at around 500 nm. This indicated that CNTs did not exhibit the UV-vis absorption peak of the composite films.

Cyclic voltammogram (CV) traces for all electropolymerization experiments are shown in Fig. 2. As seen in Fig. 2(a) comparing with Fig. 2(b) and Fig. 2(c) comparing with Fig. 2(d), the oxidation onset peak of polymer/CNTs composites were occurred at lower potential than pure polymer. The reason of lower potential of oxidation might be from the

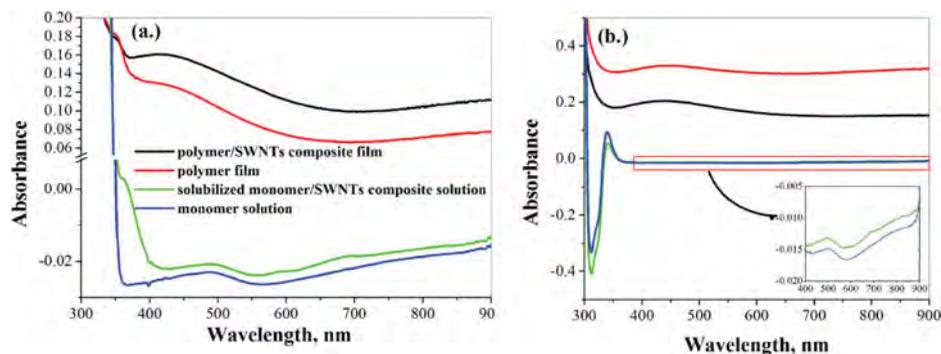


Figure 1. UV-vis spectra of (a) carboxylated thianaphthene-2-carboxylic acid and its composite and (b) carboxylated benzothiophene-2-propionic acid solution and its composite.

presence of CNTs promoted the electron transfer of oxidation-reduction. The oxidation onset peak at about 0.8 V corresponds to the deposition of polymer on the gold working electrode. Considering in term of the peak current, polythianaphthene-2-carboxylic acid/CNTs composite film showed higher peak current than the pure polymer film. The

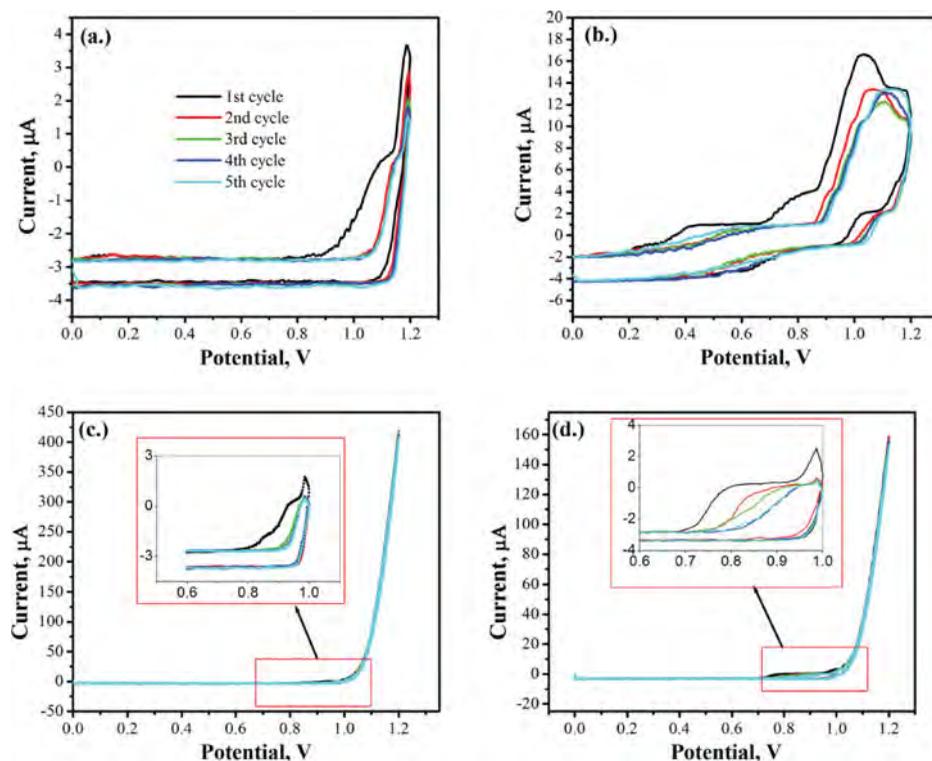


Figure 2. CV traces during electropolymerization for 5 cycles at scan rate of 20 mV/s (a) polythianaphthene-2-carboxylic acid (b) polythianaphthene-2-carboxylic acid/CNTs composite (c) polybenzothiophene-2-propionic acid and (d) polybenzothiophene-2-propionic acid/CNTs composite.

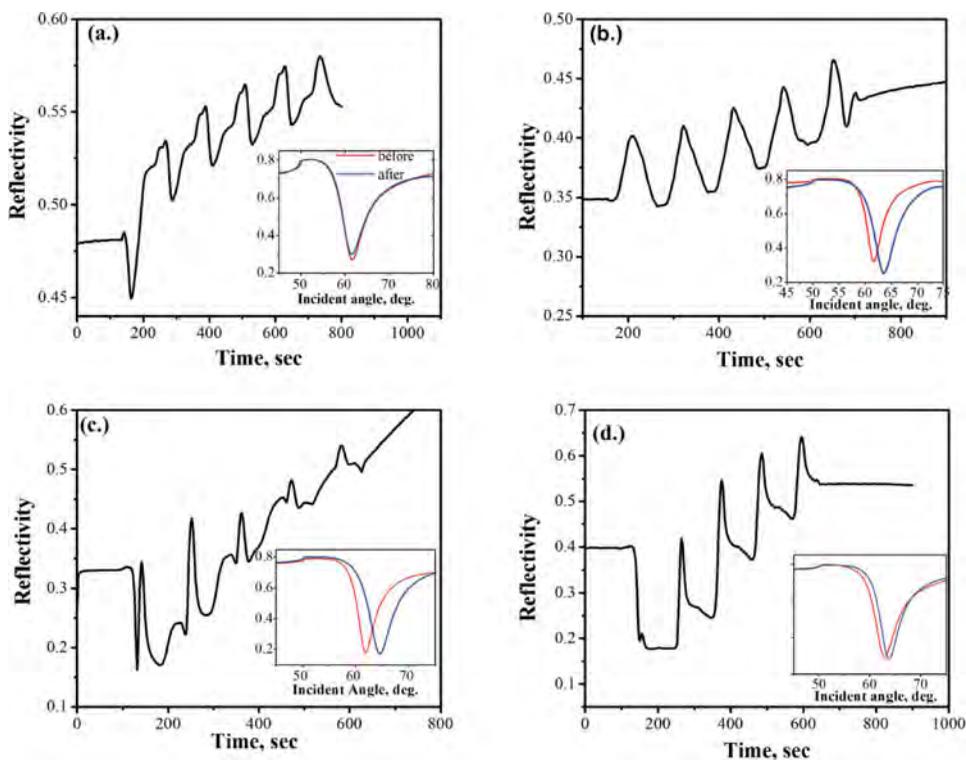


Figure 3. SPR reflectivity change during electropolymerization of (a) polythianaphthene-2-carboxylic acid (b) polythianaphthene-2-carboxylic acid/SWNTs composite (c) polybenzothiophene-2-propionic acid and (d) polybenzothiophene-2-propionic acid/SWNTs composite. The insets show the angular scan measurement before and after electropolymerization.

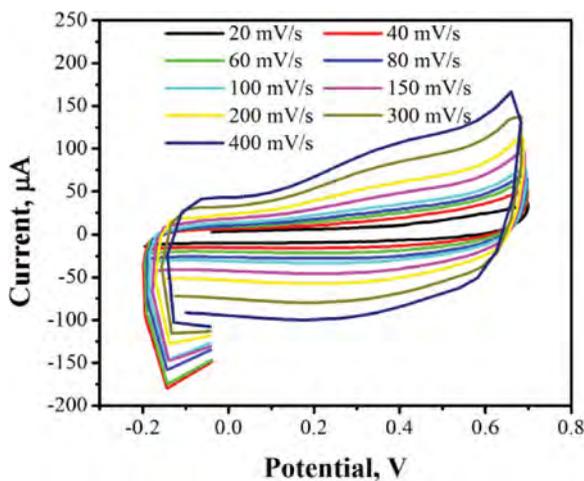


Figure 4. CV traces of poly(thianaphthene-2-carboxylic acid) film at different scan rates in PBS solution.

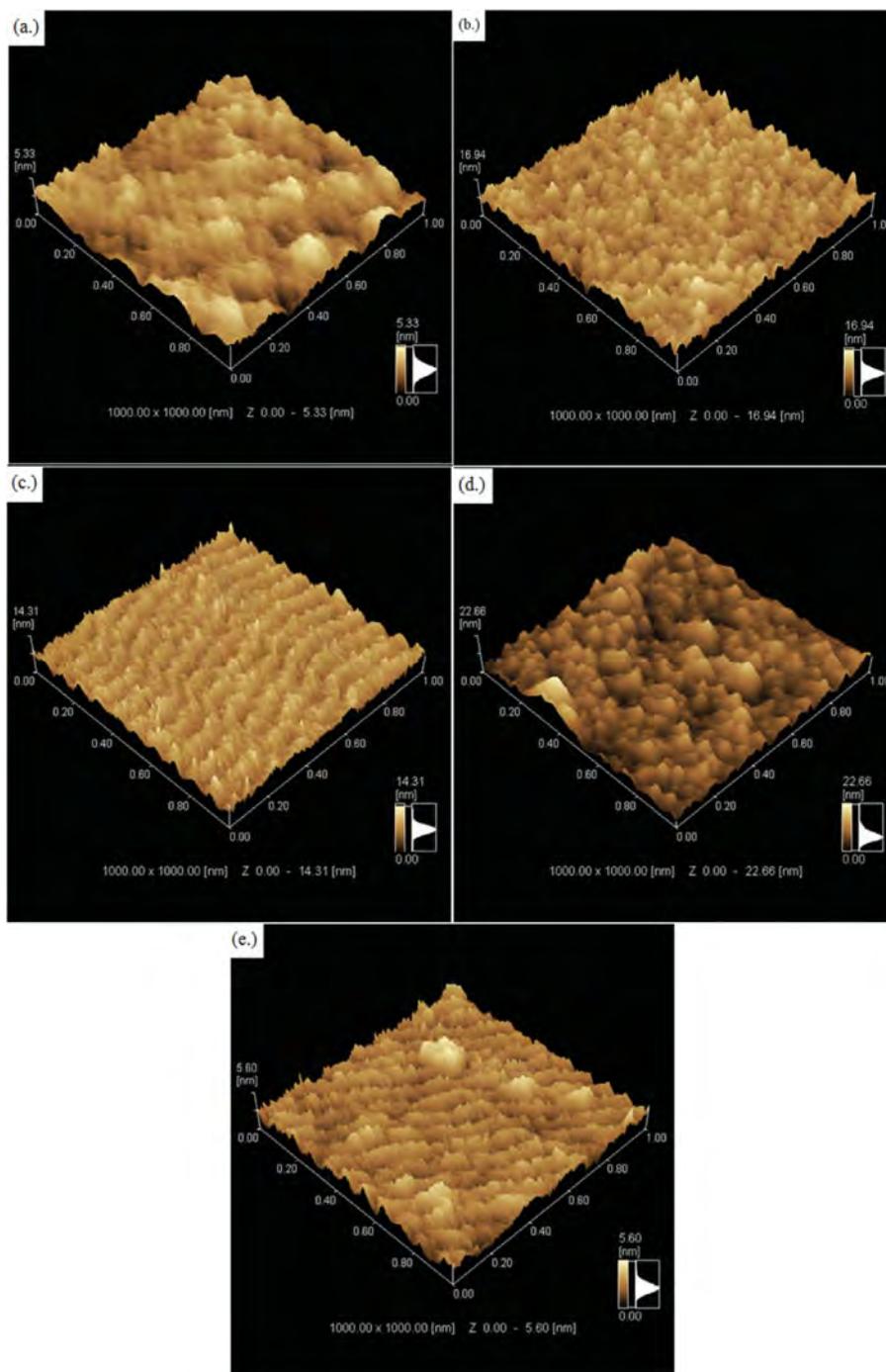


Figure 5. AFM images of the prepared films (a) bare gold (b) polythianaphthene-2-carboxylic acid (c) polythianaphthene-2-carboxylic acid/CNTs composite (d) polybenzothiophene-2-propionic acid (e) polybenzothiophene-2-propionic acid/CNTs composite.

reason for higher peak current of the composite film than the pure polymer film is that CNTs had large specific surface area which can enhance the amount of polymer loading. However, the peak current of polybenzothiophene-2-propionic acid film in Fig. 2(c) is higher than its composite film (Fig. 2(d)). It indicated that the less amount of polybenzothiophene-2-propionic acid loaded on the CNTs surface which showed the lower peak current in the composite film.

The kinetic during electropolymerization was monitored at a fixed incident angle as shown in Fig. 3. The reflectivity increased with number of cycle increased. As shown in the insets, the dip angle of angular scan reflectivity curve after electropolymerization was shifted to higher angle comparing with the dip angle of the curve before electropolymerization. These results indicated that the polymers were deposited on the gold substrates. The thickness of the polymer films was calculated by fitting this curve using Fresnel equation algorithm (Winspall software version 2.2) which were estimated to be 0.50, 7.24, 3.61, and 2.28 nm for polythianaphthene-2-carboxylic acid, polythianaphthene-2-carboxylic acid/SWNTs composite, polybenzothiophene-2-propionic acid, and polybenzothiophene-2-propionic acid/SWNTs composite, respectively.

For further construction of immunosensor, the electroactivity of the obtained poly(thianaphthene-2-carboxylic acid) film was studied in phosphate buffer saline (PBS) solution (pH 7.4). The potential range was from 0 V to 0.7 V with varying scan rates from 20 to 400 mV/s. The results as shown in Fig. 4 indicated that the poly(thianaphthene-2-carboxylic acid) film has electroactivity in this neutral solution.

Surface morphology of conducting polymer/CNTs composite films was further studied by AFM. The AFM images of the films are shown in Fig. 5. The roughness of the films was changed to higher values comparing with the bare Au substrates which indicating the deposition of the polymer and its composite films on the substrates after electropolymerization. The roughness of polythianaphthene-2-carboxylic acid, polythianaphthene-2-carboxylic acid/CNTs composite, polybenzothiophene-2-propionic acid and polybenzothiophene-2-propionic acid/CNTs thin films are 1.007, 1.300, 1.003 and 1.961, respectively.

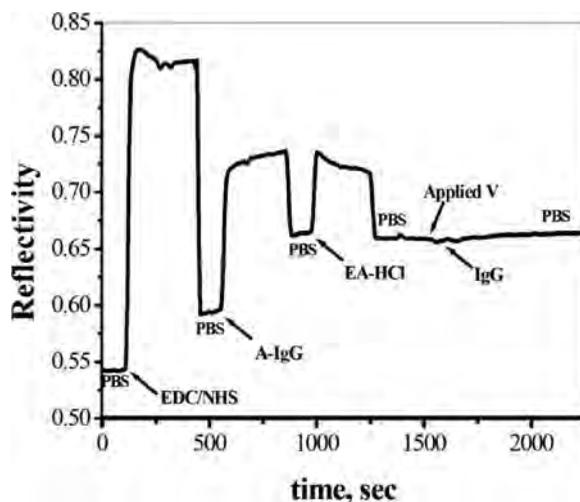


Figure 6. SPR response during the construction of poly(thianaphthene-2-carboxylic acid)-based sensor for detection of human IgG.

Figure 6 shows the example of the SPR kinetic curve during the construction of polymer-based immunosensor. The PBS solution was employed as the baseline before the activation of the carboxylic group of polymer, poly(thianaphthene-2-carboxylic acid), with a 1:1 ratio of 0.4 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride/0.1 M *N*-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) solution as a coupling reagent. After rinsing with PBS solution, 100 $\mu\text{g/ml}$ of anti-human IgG solution was then injected to immobilize on the polymer surface. An aqueous solution of 0.2 M ethanolamine hydrochloride (EA-HCl) was used for blocking the remaining free binding sites. After rinsing with PBS, a constant potential was applied to obtain the baseline before adding human IgG which is associated with the binding process of anti-human IgG and human IgG. This could be confirmed that the prepared film could be used for immunosensor application with further polymer/CNTs composite film for immunosensor experiment is undergoing.

4. Conclusion

Polythianaphthene-2-carboxylic acid/CNTs and polybenzothiophene-2-propionic acid/CNTs composite films were successfully prepared. The kinetic during electropolymerization process was in situ monitored by EC-SPR spectroscopy. The thickness of polymer films was calculated by fitting the obtained SPR angular curves by a Fresnel equation algorithm using Winspall software version 2.2. The polymer/CNTs films showed electroactivity in neutral PBS solution which can be used as immunosensor in the further work.

Acknowledgments

This work was partially supported by the NANOTEC, NSTDA, Ministry of Science and Technology, Thailand, through its program of Center of Excellence Network. S. S. would like to acknowledge Chiang Mai University for young staff research funding and the Research Grant for New Scholar (MRG5580133) from the Thailand Research Fund (TRF), the Thailand's Office of the Higher Education Commission (CHE) and Chiang Mai University. P. N. would like to acknowledge the Thailand's Office of the Higher Education Commission, Rajamangala University of Technology Lanna, and the Graduate School, Chiang Mai University, Thailand and the "Global Circus" Program of Niigata University supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan for financial support.

References

- [1] Tele, F. R. R., & Fonseca, L. P. (2008). *Mater. Sci. Eng., C*, 28, 1530.
- [2] Ramakrishnan, S. (1997). *Resonance*, 48.
- [3] Luo, X., Killard, A. J., Morrin, A. M., & Smyth, R. (2006). *Anal. Chim. Acta*, 575, 39.
- [4] Ramanavičius, A., Kaušaitė, A., & Ramanavičienė, A. (2005). *Sens. Actuators, B*, 111, 532.
- [5] Wang, J., Yuan, R., Chai, Y., Cao, S., Guan, S., Fu, P., & Min, L. (2010). *Biochem. Eng. J.*, 51, 95.
- [6] Wang, J. (2005). *Electroanalysis*, 17, 7.
- [7] Hu, L., Hecht, D. S., & Gruner, G. (2010). *Chem. Rev.*, 110, 5790.
- [8] El-Maghraby, A. A., Abou-Elenien, G. M., & El-Abdallah, M. (2010). *Synth. Met.*, 160, 1335.
- [9] Xia, L., Wei, Z., & Wan, M. (2010). *J. Colloid Interface Sci.*, 341, 1.
- [10] Tanaka, K., & Yamabe, T. (1991). *J. Appl. Phys.*, 70, 5653.

- [11] Sriwichai, S., Baba, A., Phanichphant, S., Shinbo, K., Kato, K., & Kaneko, F. (2010). *Sens. Actuators B*, 147, 322.
- [12] Janmanee, R., Baba, A., Phanichphant, S., Sriwichai, S., Shinbo, K., Kato, K., & Kaneko, F. (2011). *Jpn. J. Appl. Phys.*, 50, 01BK02–1.
- [13] Dong, H., Cao, X., Li, C. M., & Hu, W. (2008). *Biosens. Bioelectron.*, 23, 1055.
- [14] Suzuki, M., Nakashima, Y., & Mori, Y. (1999). *Sens. Actuators, B*, 54, 176.
- [15] Baba, A., Taranekar, P., Ponnampati, R. R., Knoll, W., & Advincula, Rigoberto C. (2010). *Appl. Mater. Interfaces*, 2, 2347.

Research Article

Nanocomposite Thin Film of Poly(3-aminobenzoic acid) and Multiwalled Carbon Nanotubes Fabricated through an Electrochemical Method

Paphawadee Netsuwan,¹ Wirat Chaisu,² Sukon Phanichphant,³ and Saengrawee Sriwichai²

¹ Nanoscience and Nanotechnology Program, Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

³ Materials Science Research Center, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Correspondence should be addressed to Saengrawee Sriwichai; sriwichai473@yahoo.com

Received 27 February 2014; Revised 6 June 2014; Accepted 10 June 2014; Published 24 June 2014

Academic Editor: Amit Bandyopadhyay

Copyright © 2014 Paphawadee Netsuwan et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The composite thin films of poly(3-aminobenzoic acid) (PABA) and multiwalled carbon nanotubes (MWNTs) are successfully fabricated through an electrochemical method. The composite mixtures containing 50 mM of 3-aminobenzoic acid with various concentrations of MWNTs (1.0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10 mg/mL) in 0.5 M H₂SO₄ were prepared and used in this study. Cyclic voltammetry (CV) was used for fabrication and monitoring the electropolymerization of the composite thin films with potential range of 0 to 1100 mV for 5 cycles at scan rate of 20 mV/s on indium tin oxide- (ITO)-coated glass substrate. UV-vis absorption spectroscopy, atomic force microscopy (AFM), and scanning electron microscopy (SEM) techniques were employed to characterize the obtained composite thin films. It was found that MWNTs can enhance the peak current of CV traces of the PABA/MWNTs composite thin films without affecting the UV-vis absorption spectra. The surface morphology of the thin films can be studied using AFM and SEM techniques.

1. Introduction

The application of the conducting polymers has attracted attention in various fields such as medical, industrial, and environmental fields [1–5]. Conducting polymers such as polypyrrole, polyaniline, polythiophene, and their derivatives can be obtained through both chemical and electrochemical polymerization. Their unique conjugated π -electron backbone system had led them to have unusual electronic properties such as electrical conductivity, low energy optical transitions, low ionization potential, and high electron affinity. Various conducting polymers have been widely used in sensor applications [5–10]. Among these conducting polymers, poly(aminobenzoic acid), which is one of polyaniline derivatives, is a conducting polymer containing electron-rich nitrogen atom and high electron density of carbonyl group. This makes it easily electropolymerized on the electrode [11, 12]. Carboxylated polyanilines with both ortho- and meta-substitutions known to show self-doping have been studied as

a promising polyaniline derivative for biosensor applications. The carboxylic acid group serves as a functional group that can be used as a matrix material for immobilization onto substrates or for covalent bonds with biomolecules such as proteins and antibodies [13]. Recently, the ultrathin films of poly(3-aminobenzoic acid) (PABA) were fabricated by electropolymerization on gold-coated high-refractive index glass slide as working electrode to construct the surface plasmon resonance (SPR) immunosensor for detecting human immunoglobulin G [13]. The other poly(aminobenzoic acid), poly(*o*-aminobenzoic acid), was also electropolymerized on boron-doped diamond electrode by cyclic voltammetry for construction of the amperometric immunosensor [14].

Carbon nanotubes (CNTs) show many advantages such as small size, high electrical, thermal conductivity, high specific surface area, and long term chemical stability which can improve the electrochemical reactivity of biomolecules and promote the electron transfer of redox reaction in

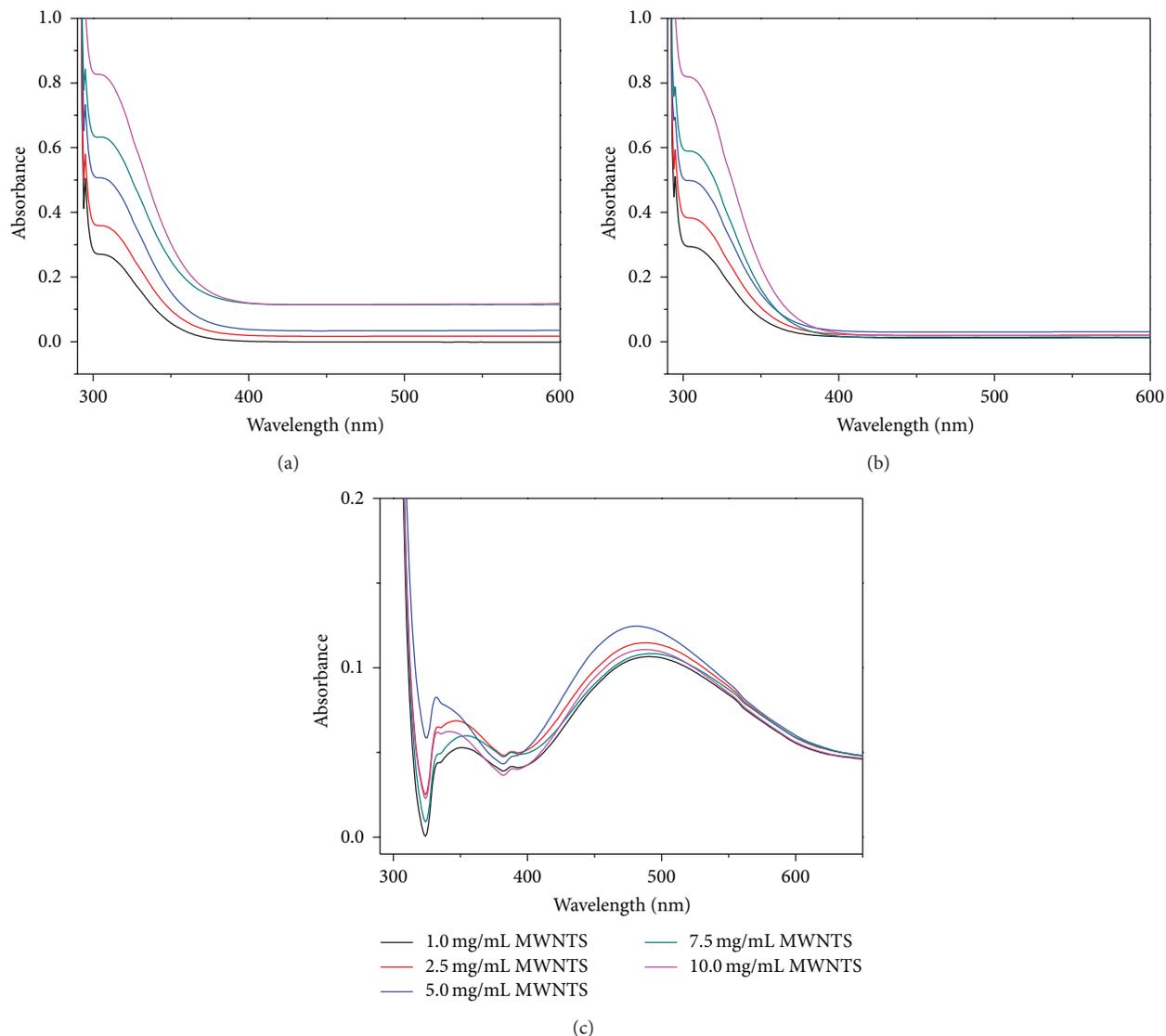


FIGURE 1: UV-vis spectra of (a) composite mixtures after sonication, (b) composite mixtures after sonication/centrifugation, and (c) composite thin films after electropolymerization for 5 cycles.

electropolymerization [15–20]. CNTs are hexagonal arrangements of carbon atoms which can be classified as single-walled (SWNTs) and multiwalled (MWNTs) carbon nanotubes. Since MWNTs are easier to synthesize and are of lower price than SWNTs [16], MWNTs were chosen for preparing the composite mixture in this work. The film of poly(2,6-pyridinediamine)/MWNTs composite and gold nanoparticles was developed to be used as amperometric immunosensor for detecting human chorionic gonadotrophin [21]. The cytochrome C biosensor base on the hybrid material consisting of the conducting polymer poly(3-methylthiophene) and MWNTs exhibited a good electrochemical performance concerning direct electron transfer. Moreover, it showed better sensitivity than other structured cytochrome C biosensors [22].

In this study, the PABA/MWNTs thin films were fabricated by electropolymerization of the composite mixtures

prepared from 50 mM 3-aminobenzoic acid (ABA) and various concentrations of MWNTs in 0.5 M H_2SO_4 . The effect of the concentration of MWNTs on PABA film were demonstrated by cyclic voltammetry and characterized by UV-vis absorption spectra, atomic force microscopy (AFM), and scanning electron microscopy (SEM) techniques.

2. Experimental

2.1. Materials. All materials and indium tin oxide- (ITO-) coated glass substrates were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. The multiwalled carbon nanotubes (MWNTs) were synthesized by chemical vapor deposition method from Department of Physics and Materials Science, Faculty of Science, Chiang Mai University.

Before electropolymerization, the composite mixtures of 50 mM of ABA and various concentrations (1.0, 2.5, 5.0, 7.5,

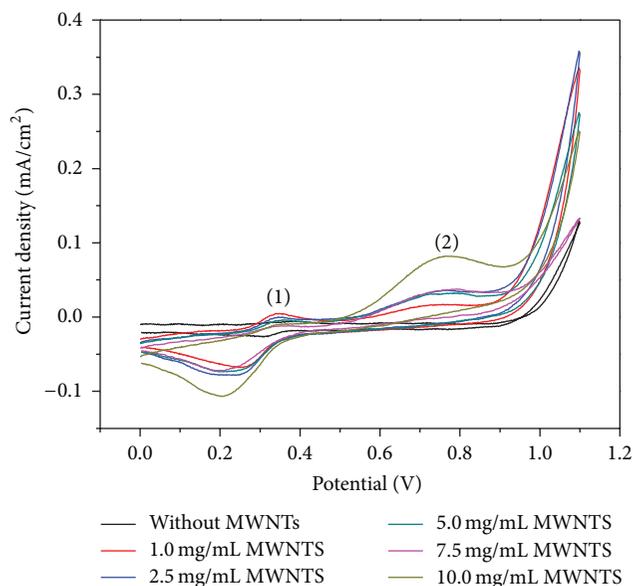


FIGURE 2: CV traces (selected from the second cycle) during electropolymerization at scan rate of 20 mV/s of composite mixtures containing 50 mM ABA and 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 mg/mL MWNTs in 0.5 M H₂SO₄.

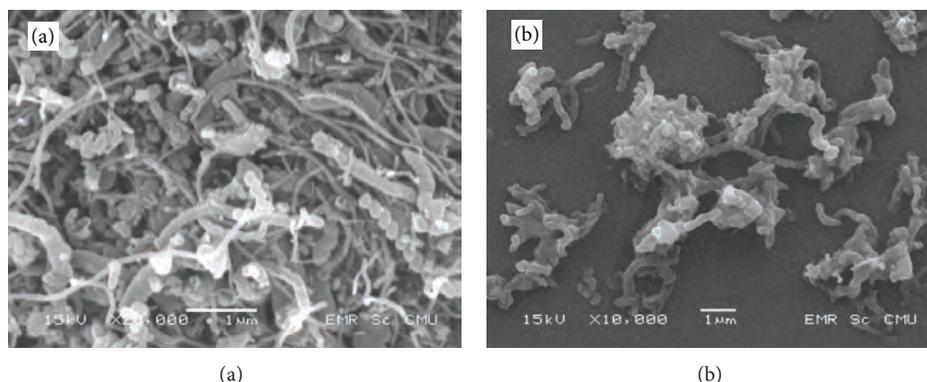


FIGURE 3: SEM images of (a) MWNTs and (b) PABA/MWNTs composite thin film containing 7.5 mg/mL MWNTs after electropolymerization for 5 cycles in 0.5 M H₂SO₄.

and 10.0 mg/mL) of MWNTs were prepared. The 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 mg/mL of MWNTs were dispersed in a solution of 50 mM ABA in 0.5 M H₂SO₄ by ultrasonication for 30 min. The aggregated MWNTs were then removed by centrifugation at 4000 rpm for 1 h. The dispersed MWNTs in ABA solution (after sonication) and the supernatant solution (after sonication/centrifugation) were studied by UV-vis absorption spectroscopy (Lambda 950 UV-vis spectrophotometer). An ITO-coated glass substrate was cleaned in ultrasonic bath before being used in electropolymerization experiment.

2.2. Fabrication of the Composite Thin Films. Electropolymerization processes were performed in 3-electrode setup potentiostat (eDAQ potentiostat ED410 e-corder 410) using platinum wire as counter electrode, Ag/AgCl aqueous electrode as reference electrode, and ITO-coated glass substrate as working electrode. The ITO electrode surface area for

electropolymerization was 1 cm². The PABA/MWNTs composite thin films were electropolymerized on the ITO-coated glass slide by switching potential range from 0 to 1100 mV at scan rate of 20 mV/s for 5 cycles. The composite thin films were washed with 0.5 M H₂SO₄ and distilled water, respectively, for several times to wash out the ABA monomer residue on the ITO electrode surface. The thin films were then stored in desiccator before characterization. The AFM (NanoScope IIIa, Digital Instruments) and SEM (JEOL JEM-6335F) measurements were employed to study morphology of the obtained thin films.

3. Results and Discussion

The UV-vis absorption spectra of the obtained composite mixtures and thin films are shown in Figure 1. As can be seen in Figure 1(a), for the composite mixture after

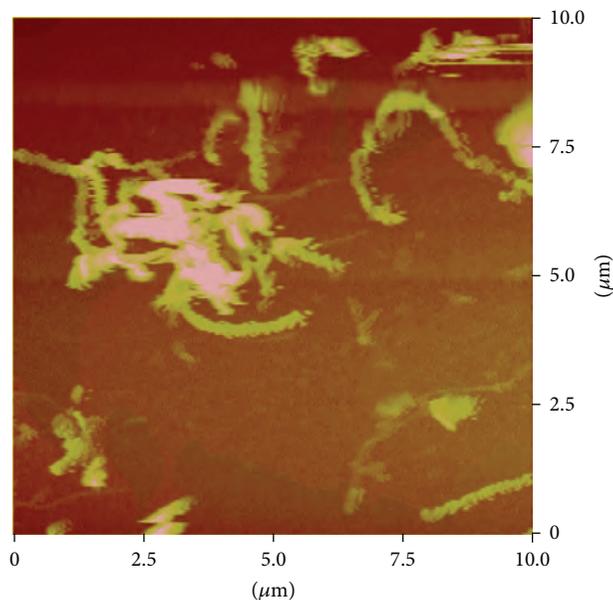


FIGURE 4: AFM image of the PABA/MWNTs composite film containing 7.5 mg/mL MWNTs after electropolymerization for 5 cycles in 0.5 M H_2SO_4 .

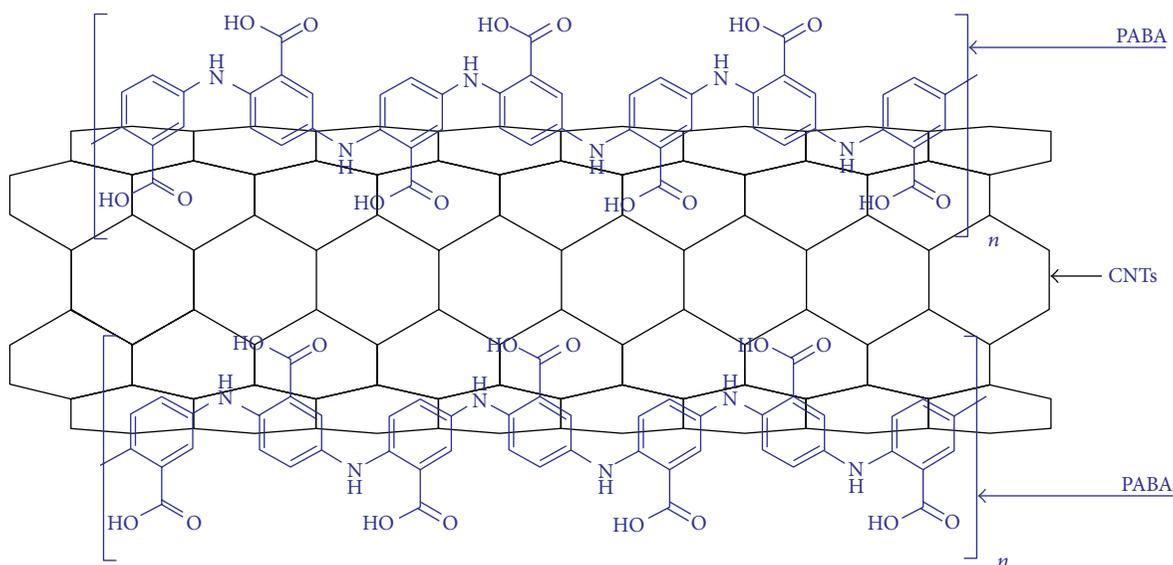


FIGURE 5: Schematic drawing of the proposed noncovalent attachment between PABA and MWNTs of the composite thin film.

sonication, and Figure 1(b), for the composite mixtures after sonication/centrifugation, the absorption peaks were clearly observed at around 295 nm. The baseline of the spectra was found to increase for the mixture after sonication. The different baseline can also be observed for each composite mixture probably due to the aggregated complex bundles of ABA/MWNTs in the mixtures. However, the baselines were decreased for the composite mixture after sonication/centrifugation because the aggregated complex bundles were removed from the composite mixtures [23, 24]. Moreover, the unique baseline can be obtained after

centrifugation. We therefore used these mixtures for preparation of the composite thin films. The absorption peaks of the obtained PABA/MWNTs composite films as shown in Figure 1(c) appeared at around 295 nm in UV region and at around 480 nm in visible region. The two absorption bands were assigned to π - π^* interband transition associated to the benzoid/quinoid ring structure and n - π^* transition from the nonbonding nitrogen lone pair to the π^* conduction band [23, 24]. Therefore, this indicated that MWNTs did not exhibit the UV-vis absorption peak of both the composite mixture and the PABA/MWNTs composite films.

To fabricate the PABA/MWNTs composite thin films, electropolymerization of 50 mM ABA monomer solution containing 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 mg/mL of MWNTs in 0.5 M H_2SO_4 on ITO-coated glass substrate was performed by cyclic voltammetry (potential range between 0 and 1100 mV at a 20 mV/s). Figure 2 shows the CV traces for electropolymerization of 1 cycle of the composite mixtures of ABA containing various concentrations of MWNTs. The PABA/MWNTs composite thin films were deposited and grown on the ITO-coated glass substrates. The PABA thin film showed one pair redox peak with the anodic current peak at around 0.35 V and cathodic peak at around 0.2 V. In addition, the PABA/MWNTs composite thin films showed another anodic current peak at about 0.75 V. It can be concluded that this anodic current peak of the composite thin films was probably due to the presence of MWNTs in the thin films. The anodic peak currents of the PABA/MWNTs composite thin films were clearly observed indicating higher electroactivity than PABA thin film. Moreover, MWNTs had larger effective surface area which can increase the amount of PABA loading on the films. Therefore, the pair redox current peaks at 0.75 V (anodic peak from PABA/MWNTs composite) increased and at 0.2 V (cathodic peak) decreased whereas the anodic peak at 0.35 V (from pure PABA) was decreased with increasing of MWNTs concentration. This indicated that the MWNTs affected the oxidation process of the PABA thin film; therefore, MWNTs can enhance the electroactivity of the PABA film.

Moreover, the potential of anodic peak was shifted with increasing concentration of MWNTs. The reason for potential shifting was that the strong adsorption of PABA in MWNTs led to more conjugated structure of PABA [22]. Furthermore, the increase of the current peak indicated that higher concentration of MWNTs, which had large specific surface area, could increase the amount of PABA loading and lead them to have good electron transfer. Therefore, the electron transfer of redox reaction in this work was promoted by the presence of MWNTs.

The surface morphology of the PABA/MWNTs composite thin films was further studied by SEM and AFM techniques. Figure 3(a) shows the surface morphology of MWNTs which have average diameters of about 72 nm. The example of surface morphology of the composite thin film obtained from electropolymerization of the composite mixture containing 7.5 mg/mL MWNTs was presented in Figure 3(b). As shown in the Figure 3(b), the aggregates of the PABA/MWNTs composite formed on the ITO electrode with average diameter of about 226 nm. This can be also previously observed in AFM image as shown in Figure 4.

From the SEM and AFM images in Figures 3 and 4, respectively, we proposed that the presence of MWNTs can lead PABA to wrap around the MWNTs bundles as noncovalent attachment between PABA and MWNTs. The schematic drawing of this proposed structure is shown in Figure 5. This may be the utility to future use as modified electrode in biosensor application.

4. Conclusion

In summary, the electropolymerization of PABA/MWNTs composite thin films was successfully fabricated on ITO-coated glass substrate which is also used as working electrode. The presence of MWNTs can enhance the current of redox peaks of the PABA and lead the composite thin films showing good electron transfer. The AFM and SEM images demonstrated the aggregation bundles of MWNTs and PABA on the substrate. We proposed that PABA can wrap around MWNTs. These composite thin films will be investigated in biosensor application in the future work.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

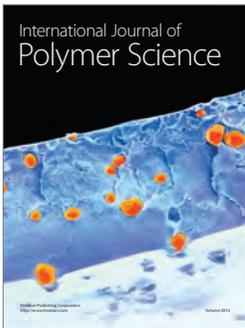
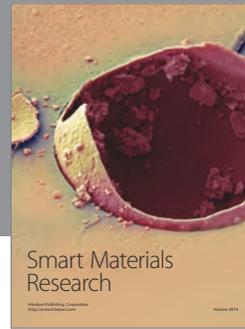
Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the Research Grant for New Scholar (MRG5580133) from the Thailand Research Fund (TRF), the Thailand's Office of the Higher Education Commission (CHE), and Chiang Mai University. The supports from the Thailand's Office of the Higher Education Commission, Rajamangala University of Technology Lanna, and the Graduate School, Chiang Mai University, are also acknowledged.

References

- [1] T. F. Otero and I. Cantero, "Conducting polymers as positive electrodes in rechargeable lithium-ion batteries," *Journal of Power Sources*, vol. 81-82, pp. 838-841, 1999.
- [2] F. M. Kelly, L. Meunier, C. Cochrane, and V. Koncar, "Polyaniline: application as solid state electrochromic in a flexible textile display," *Displays*, vol. 34, no. 1, pp. 1-7, 2013.
- [3] K. K. Krishnani, S. Srinives, B. C. Mohapatra et al., "Hexavalent chromium removal mechanism using conducting polymers," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 252-253, pp. 99-106, 2013.
- [4] P. Humpolicek, V. Kasparkova, P. Saha, and J. Stejskal, "Biocompatibility of polyaniline," *Synthetic Metals*, vol. 162, no. 7-8, pp. 722-727, 2012.
- [5] N. K. Guimard, N. Gomez, and C. E. Schmidt, "Conducting polymers in biomedical engineering," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 8-9, pp. 876-921, 2007.
- [6] S. Ramakrishnan, "Conducting polymers: from a laboratory curiosity to the market place," *Resonance*, vol. 2, no. 11, pp. 44-58, 1997.
- [7] J. L. Bredas and R. Silbey, *Conjugated Polymers*, Kluwer Academic Publishers, 1991.
- [8] F. R. R. Teles and L. P. Fonseca, "Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors," *Materials Science and Engineering C*, vol. 28, no. 8, pp. 1530-1543, 2008.
- [9] A. Baba, P. Taraneekar, R. R. Ponnappati, W. Knoll, and R. C. Advincula, "Electrochemical surface plasmon resonance and waveguide-enhanced glucose biosensing with N-alkylaminated polypyrrole/glucose oxidase multilayers," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 2, no. 8, pp. 2347-2354, 2010.

- [10] A. Baba, T. Mannen, Y. Ohdaira et al., "Detection of adrenaline on poly(3-aminobenzylamine) ultrathin film by electrochemical-surface plasmon resonance spectroscopy," *Langmuir*, vol. 26, no. 23, pp. 18476–18482, 2010.
- [11] A. Benyoucef, F. Huerta, J. L. Vázquez, and E. Morallon, "Synthesis and in situ FTIRS characterization of conducting polymers obtained from aminobenzoic acid isomers at platinum electrodes," *European Polymer Journal*, vol. 41, no. 4, pp. 843–852, 2005.
- [12] A. B. Mattos, T. A. Freitas, L. T. Kubota, and R. F. Dutra, "An *o*-aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serum," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 71, pp. 97–104, 2013.
- [13] S. Sriwichai, A. Baba, S. Phanichphant, K. Shinbo, K. Kato, and F. Kaneko, "Electrochemically controlled surface plasmon resonance immunosensor for the detection of human immunoglobulin G on poly(3-aminobenzoic acid) ultrathin films," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 147, no. 1, pp. 322–329, 2010.
- [14] A. Preechaworapun, T. A. Ivandini, A. Suzuki, A. Fujishima, O. Chailapakul, and Y. Einaga, "Development of amperometric immunosensor using boron-doped diamond with poly(*o*-aminobenzoic acid)," *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 6, pp. 2077–2083, 2008.
- [15] Y. Liao, C. Zhang, Y. Zhang et al., "Carbon nanotube/polyaniline composite nanofibers: facile synthesis and chemosensors," *Nano Letters*, vol. 11, no. 3, pp. 954–959, 2011.
- [16] L. Hu, D. S. Hecht, and G. Grüner, "Carbon nanotube thin films: fabrication, properties, and applications," *Chemical Reviews*, vol. 110, no. 10, pp. 5790–5844, 2010.
- [17] D. Olney, L. Fuller, and K. S. V. Santhanam, "A greenhouse gas silicon microchip sensor using a conducting composite with single walled carbon nanotubes," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 191, pp. 545–552, 2014.
- [18] G. Xu, B. Li, X. T. Cui, L. Ling, and X. Luo, "Electrodeposited conducting polymer PEDOT doped with pure carbon nanotubes for the detection of dopamine in the presence of ascorbic acid," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 188, pp. 405–410, 2013.
- [19] P. D. Tam and N. V. Hieu, "Conducting polymer film-based immunosensors using carbon nanotube/antibodies doped polypyrrole," *Applied Surface Science*, vol. 257, no. 23, pp. 9817–9824, 2011.
- [20] K. Shen, C. Hu, L. Chang, and K. Ho, "A complementary electrochromic device based on carbon nanotubes/conducting polymers," *Solar Energy Materials and Solar Cells*, vol. 98, pp. 294–299, 2012.
- [21] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, and P. Avouris, *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*, Springer, Berlin, Germany, 2001.
- [22] M. Eguilaz, L. Agui, P. Yanez-Sedeno, and J. M. Pingarron, "A biosensor based on cytochrome C immobilization on poly(3-methylthiophene)/multiwalled carbon nanotubes hybrid-modified electrode. Application to the electrochemical determination of nitrite," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 644, pp. 30–35, 2010.
- [23] V. Bavastrello, T. B. C. Terencio, L. Belmonte, P. Cossari, and C. Nicolini, "Influence of substituents in electrochemical and conducting properties of polyaniline derivatives and multiwalled carbon nanotubes nanocomposites," *Thin Solid Films*, vol. 520, no. 18, pp. 5877–5883, 2012.
- [24] A. Baba, Y. Kanetsuna, S. Sriwichai et al., "Nanostructured carbon nanotubes/copper phthalocyanine hybrid multilayers prepared using layer-by-layer self-assembly approach," *Thin Solid Films*, vol. 518, no. 8, pp. 2200–2205, 2010.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>

