



**Development of Electrochemical Sensors and Their Application in
Environmental and Clinical Analysis**

Asamee Soleh

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Chemistry
Prince of Songkla University
2019**

Copyright of Prince of Songkla University

Thesis Title Development of Electrochemical Sensors and Their
Application in Environmental and Clinical Analysis

Author Mr. Asamee Soleh

Major Program Chemistry

Major Advisor

.....
(Asst. Prof. Dr. Warakorn Limbut)

Examining Committee:

.....Chairperson
(Assoc. Prof. Dr. Weena Siangproh)

.....Committee
(Asst. Prof. Dr. Warakorn Limbut)

Co-advisor

.....
(Assoc. Prof. Dr. Proespichaya Kanatharana)

.....Committee
(Assoc. Prof. Dr. Proespichaya Kanatharana)

.....Committee
(Assoc. Prof. Dr. Panote Thavarungkul)

.....Committee
(Asst. Prof. Dr. Apon Numnuam)

The Graduate School, Prince of Songkla University, has approved this thesis as partial fulfillment of the requirements for the Master of Science Degree in Chemistry

.....
(Prof. Dr. Damrongsak Faroongsarng)

Dean of Graduate School

This is to certify that the work here submitted is the result of the candidate's own investigations. Due acknowledgement has been made of any assistance received.

.....Signature

(Asst. Prof. Dr. Warakorn Limbut)

Major Advisor

.....Signature

(Mr. Asamee Soleh)

Candidate

I hereby certify that this work has not been accepted in substance for any degree, and is not being currently submitted in candidature for any degree.

.....Signature

(Mr. Asamee Soleh)

Candidate

ชื่อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าและประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์ทาง สิ่งแวดล้อมและทางการแพทย์
ผู้เขียน	นายอัสมี สอและ
สาขา	เคมี
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้พัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนในสิ่งแวดล้อมและตรวจวัดโดพามีน กรดยูริกและกลูโคสพร้อมกันในด้านคลินิก ประกอบด้วยสองงานวิจัยย่อย งานวิจัยแรกพัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนด้วยขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วย อนุภาคนาโนพอลาเดียม-กลาสซีคาร์บอนทรงกลม โดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมทรีร่วมกับระบบโพลีอีนเจกชัน ศึกษาลักษณะสัณฐานของอนุภาคนาโนพอลาเดียม-กลาสซีคาร์บอนทรงกลมและพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของไฮดรอกซีลามีนบนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคนาโนพอลาเดียม-กลาสซีคาร์บอนทรงกลมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีตามลำดับ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ปริมาณอนุภาคนาโนพอลาเดียม-กลาสซีคาร์บอนทรงกลมที่ใช้สำหรับปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้า ปริมาตรสารตัวอย่าง และอัตราการไหล ภายใต้สภาวะเหมาะสมพบว่าขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 25 – 25,000 ไมโครโมลาร์ มีขีดจำกัดการตรวจวัด 36 ไมโครโมลาร์ และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ 120 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีเสถียรภาพที่ดี (%RSD < 5.3 (n=73))

งานวิจัยที่สองพัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าโดยใช้ระบบขั้วไฟฟ้าทำงานคู่สำหรับตรวจวัดกลูโคส กรดยูริกและโดพามีนพร้อมกัน ปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงานที่ 1 ด้วยวัสดุกราฟีนออกไซด์ สำหรับตรวจวัดกรดยูริกและโดพามีนด้วยเทคนิคแอดซอร์พทีฟสทริปปิง โวลแทมเมทรี และขั้วไฟฟ้าทำงานที่ 2 ด้วยปร๊ตเซียนบลูกราไฟท์/โคโดซาน/เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสสำหรับตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคโครโมแอมเพอโรเมทรี ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมขั้วไฟฟ้าและการตรวจวัด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดพามีนมีความสัมพันธ์เชิงเส้นในช่วง 0.10-30 ไมโครโมลาร์ และ 30-80 ไมโครโมลาร์ ขีดจำกัดการตรวจวัด 0.080 ไมโครโมลาร์ กรดยูริกมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.20-10 ไมโครโมลาร์ และ 10-30 ไมโครโมลาร์ มีขีดจำกัดการตรวจวัด 0.11

ไมโครโมลาร์ และกลูโคสมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 15-1,500 ไมโครโมลาร์ มีขีดจำกัดการตรวจวัด 5.7 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้เซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าระบบขั้วไฟฟ้าทำงานคู่ที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทำซ้ำและรื้อยะการได้กลับคืนที่ดี เมื่อใช้เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นตรวจวัดโดพามีน กรดยูริกและกลูโคสในตัวอย่างพลาสมา โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานจากโรงพยาบาล พบว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ซึ่งสามารถยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดโดพามีน กรดยูริกและกลูโคสในตัวอย่างจริงได้

Thesis title	Development of Electrochemical Sensors and Their Application in Environmental and Clinical Analysis
Author	Mr. Asamee Soleh
Major Program	Chemistry
Academic Year	2018

Abstract

Electrochemical sensors were developed for the determination of hydroxylamine in environmental monitoring and the simultaneous determination of dopamine, uric acid, and glucose in clinical analysis. Two projects were undertaken. The first project reports the development of an electrochemical sensor for the detection of hydroxylamine by flow injection amperometry based on a glassy carbon electrode (GCE) modified with a nanocomposite of palladium nanoparticles and glassy carbon spheres (PdNPs-GCS). The surface morphology and electrochemical behavior of hydroxylamine on the PdNPs-GCS modified electrode were characterized by scanning electron microscope and cyclic voltammetry, respectively. The amount of PdNPs-GCS used to modify the electrode, the working potential, the sample volume and the flow rate were optimized. Under the optimal conditions, this sensor provided a wide linear concentration range of 25 to 25,000 μM . The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 36 μM and 120 μM , respectively. Moreover, it provided good stability (%RSD < 5.3 (n=73)).

The second project involved the development of a novel electrochemical sensor using a system of dual working electrodes for the simultaneous determination of glucose, uric acid and dopamine. A graphene oxide-modified glassy carbon electrode (GO/GCE) was fabricated and used with adsorptive anodic stripping voltammetry to detect uric acid and dopamine while a chitosan/glucose oxidase/prussian blue-graphite modified glassy carbon electrode (Chi/GOx/PB-G/GCE) was fabricated and used for chronoamperometric glucose detection. The fabrication and operating conditions for both electrodes were optimized. Linearity was obtained in the ranges of 0.10 to 30 μM and 30 to 80 μM for dopamine, 0.20 to 10 μM and 10 to 30 μM for uric acid and 15 to 1,500 μM for glucose. The system provided detection limits (LOD = $3\sigma/S$) of 0.080 μM , 0.11 μM , and 5.7 μM for dopamine, uric acid and glucose, respectively. This dual

working electrode system showed good reproducibility and excellent recovery for the simultaneous determination of dopamine, uric acid, and glucose. When used to analyze dopamine, uric acid, and glucose in blood plasma samples, the results agreed well with those from conventional methods ($P>0.05$), confirming the potential of this system to simultaneously determine these three analytes in real samples.

Acknowledgements

This thesis became a reality with the kind support and help of many people. I would like to express my sincere thanks to all of them.

It is a genuine pleasure to express my deep sense of gratitude to my advisors, Assistant Professor Dr. Warakorn Limbut, Associate Professor Dr. Proespichaya Kanatharana, and Associate Professor Dr. Panote Thavarungkul for giving me the opportunity to work in my area of interest and for their help, advice, suggestions and support through the whole duration of this work.

I would like to express the deepest appreciation to the examination committee members for giving their valuable time to consider this thesis.

I wish to record my deep gratitude to The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Center of Excellence for Trace Analysis and Biosensor (TAB-CoE), Financial Support from Faculty of Science Research Fund (Contract No. 1-2558-02-002), Graduate School and Faculty of Science, Prince of Songkla University.

I profusely thank all the staff of the Department of Chemistry, Department of Physics and Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

I am very grateful to Members of the Center of Excellence for Trace Analysis and Biosensor for their help, encouragement and support.

Most importantly, I am greatly indebted to my family. I would like to acknowledge the love and support they have offered throughout my life.

Asamee Soleh

The Relevance of the Research Work to Thailand

The purpose of this Master of Science Thesis in Chemistry (Analytical Chemistry) is the development of electrochemical sensors for application in environmental and clinical analysis. The electrochemical sensor developed for environmental application could improve the quality of the environment by determining hydroxylamine in wastewater. The second electrochemical sensor, developed for application in clinical chemistry, simultaneously determined glucose, uric acid and dopamine in biological fluids. This development could improve the efficiency of treatment, and the specificity of diagnosis in hospitals. Moreover, these sensors could be applied as alternative analysis methods by the Ministry of Public Health, Ministry of Environment and Ministry of Education in Thailand.

Contents

	Page
List of Figures	xii
List of Abbreviation	xiii
List of Publications	xiv
List of Patent	xv
1. Introduction	1
1.1 Background and Rationale	1
1.2 Objectives	2
2. Electrochemical sensor	3
2.1 Electrode modification	3
2.1.1 Carbon material	4
2.1.2 Composite material	5
2.2 Transducer	8
2.2.1 Electrochemical transducer	8
3. Analytical performance criteria	14
3.1 Linearity	14
3.2 Sensitivity	14
3.3 Limit of detection	14
3.4 Reproducibility	15
3.5 Selectivity	15
3.6 Recovery	15
4. Concluding Remarks	16
5. References	17
Paper I	22
Paper II	34
Patent I	74
Patent II	78
Patent III	80
Patent IV	82
VITAE	84

List of Figures

Figure		Page
1	The sensitivity (slope of the calibration plot of 2-10 μM of UA and DA) of an electrode modified with different amounts of graphene oxide (GO)	5
2	The sensitivity (slope of the calibration plot of 0.1-10 mM of hydroxylamine) of electrode modified with different amount of PdNPs-GCS.	6
3	Calibration curve of concentration of glucose in the range from 15 to 1500 μM at GOx/Chi/PB-G/GCE.	7
4	Typical input waveforms (a) and output (b) for cyclic voltammetry	9
5	(a) CV curves of GCE (i), GO/GCE (ii) and PdNPs/GO/GCE (iii) in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7. (b) CV curves of bare GCE and GO/GCE for measurement 100 μM DA and 100 μM UA. (c) CV curves of PB/GCE (i), Chi/PB-G/GCE (ii), GOx/ Chi/ PB-G/ GCE (iii) and GOx/Chi/PB-G/GCE with glucose (iv) in a 0.10 M acetate buffer solution at pH 5.0 containing 0.10 M KCl.	10
6	AdSV: (a) the potential-time waveform, and (b) along with the resulting voltammogram.	11
7	Typical input waveforms (a) and output (b) for chronoamperometry	12
8	FIA responses of PdNPs/GO/GCE for the detection of various concentrations of hydroxylamine.	13

List of Abbreviations

AdSV	Adsorptive stripping voltammetry
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Amp	Amperometry
UA	Uric acid
CV	Cyclic voltammetry
CS	Chitosan
DA	Dopamine
GCE	Glassy carbon electrode
GCS	Qlassy carbon spherical
GO	Graphene oxide
LOD	Limit of detection
μM	Micro molar
nM	Nano molar
PB	Prussian blue
PdNPs	Palladium nanoparticles
RSD	Relative standard deviation
SEM	Scanning electron microscope

List of Publications

This thesis contains general summary including, introduction, some background information and conclusions and the following papers, and which are referred to in the text by their roman number.

- Paper I** **Soleh, A.**, Kooni-art, P., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Limbut, W. Electrochemical sensor for hydroxylamine detection based on palladium nanoparticle –glassy carbon spherical (PdNPs-GCS) modified on glassy carbon electrode. 1st National Graduation Research Conference and Creative Innovation Competition. 17-18 August, 2017, Chiang Mai, Thailand.
Proceeding
- Paper II** **Soleh, A.**, Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Limbut, W. Novel electrochemical sensor using a dual working electrode system for simultaneous determination of glucose, uric acid and dopamine.
Manuscript (Submitted).

List of Patent

- Patent I** Limbut, W., **Soleh, A.**, Kanatharana, P., Thavarungkul, P. “Process of simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine” (Patent Pending)
- Patent II** Limbut, W., **Soleh, A.**, Kanatharana, P., Thavarungkul, P. “Glucose, uric acid and dopamine sensor” (*Patent Pending*)
- Patent III** Limbut, W., **Soleh, A.**, Kanatharana, P., Thavarungkul, P. “Device for simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine” (*Patent Pending*)
- Patent IV** Limbut, W., **Soleh, A.**, Kanatharana, P., Thavarungkul, P. “Single drop device for simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine” (*Patent Pending*)

1. Introduction

1.1 Background and rationale

Nowadays, the improvement of health and wellbeing is regarded as the most important determinant and the main objective of world-class research. One facet of life and wellness is the presence or absence of disease or infirmity, which is directly proportional to the ability to monitor not only disease but also food quality and safety along with environmental hazards: functions that demand continuous tracking and prompt action. Developing accurate, selective, stable and sensitive monitoring is an essential part of research into innovations that satisfy these demands [1-3].

Electrochemical sensors are a powerful tool in analytical chemistry. They determine substances by using the electrochemical properties of the substances. A sensor detects a variant quantity of the target analyte and converts measurements into signals based on suitable transducing mechanisms. Electrochemical sensors are simple, sensitive, selective, portable (on-site analysis) and fast. Compared with other instruments, they require minimum sample treatment, low-cost instrumentation and use small quantities of reagent [4]. Electrochemical methods have been widely used in clinical, food, forensic and environmental applications. This thesis focuses on environmental (i.e. hydroxylamine) and clinical chemistry (i.e. glucose, uric acid and dopamine).

Hydroxylamine (NH_2OH), a derivative of ammonium, is widely used in industry and pharmacology as a reducing agent. It is a key intermediate in the nitrogen cycle and production of nitrous oxide [5]. Hydroxylamine is a well-known mutagenic agent, which induces highly specific mutations in the nucleic acid cytosine. Modest levels of hydroxylamine can be toxic to humans, animals and even plants. Recently, the dangers of hydroxylamine exposure were highlighted by the occurrence of two major accidents: one in the USA in February 1999, which killed five people, and the other in Japan in June 2000, which killed four people [6, 7]. However, hydroxylamine cannot react chemically on a bare glassy carbon electrode. Therefore, it is necessary to modify the surface of the electrode to enable electrochemical detection of hydroxylamine.

With regard to the clinical application of electrochemical sensing, an aging population is a critical problem in many countries and the diagnosis and management of several diseases is a necessity for the elderly. Common diseases such as diabetes, kidney disease, heart disease, Parkinson's disease and Alzheimer's disease are overrepresented in elderly patients [8, 9]. These diseases can be diagnosed based on the levels of certain biomolecules in the human body, especially glucose, uric acid and dopamine. Glucose levels in blood are related to the diagnosis of diabetes, alcohol consumption, obesity and high cholesterol. Early diagnosis and treatment of diabetes is important, and normal levels of glucose in blood fall in a range from 4.4 to 6.6 mM [10]. Uric acid (UA), meanwhile, is an important metabolic product of purine [11]. The normal level of UA in blood is in a range from 0.13 to 0.46 mM, and abnormal UA levels in human blood can be related to gout, high blood pressure, kidney disease and heart disease [12]. Dopamine (DA) is one of the most important catecholamine neurotransmitters in the central nervous system. The range of basal levels of DA in humans is from 10 nM to 1 μ M, and an unusual level of DA in human body fluids can indicate diseases such as schizophrenia, Parkinson's disease, and Alzheimer's [13-15]. Independent detection of glucose, UA, and DA using various electrochemical techniques has been reported in the literature. However, a single assay that can simultaneously detect these three biomolecules would be valuable in clinical diagnosis and could improve treatment efficiency and diagnostic specificity. Additionally, this assay could save time and reduce the required sample quantity and device cost.

1.2 Objective

The aim of this study is to develop electrochemical sensing systems for applications in environmental and clinical analysis. Two subprojects were undertaken.

Subproject I: The development of a glassy carbon electrode modified with palladium nanoparticles and glassy carbon spheres (PdNPs-GCS) for the determination of hydroxylamine (**Paper I**).

Subproject II: The development of an electrochemical sensor for simultaneous determination of DA, UA and glucose, using a dual working electrode system and two electrochemical techniques: adsorptive anodic stripping voltammetry (WE1,

GO/GCE), for determination of DA and UA, and chronoamperometry (WE2, Chi/GO_x/PB-G/GCE) for determination of glucose (**Paper II**).

2. Electrochemical sensor

Electrochemical sensors are devices that detect the interaction between a target analyte and a recognition layer (electrode) and then produce an electrical signal. That signal is transmitted by coupling a chemically selective layer (the recognition layer) to an electrochemical transducer [16]. Therefore, electrochemical sensors consist of two major components: the recognition layer and the transducer. In addition, electrochemical sensors can be classified as working in static or dynamic mode.

Static sensors are used in static conditions, or batch mode, where no flow occurs between the electrode and the analyte. This system is governed by diffusion and Brownian motion. Also, the concentration of the analyte in the cell remains unchanged [17]. Electrochemical batch mode is most commonly used in the development of an electrochemical sensor (**this method was applied in Paper I**).

On the other hand, dynamic sensors produce an electric current response to an oxidation or reduction reaction. This method, characterized by a flow of analyte in solution across an electrode with a large specific area, is known as flow detection. The advantage of this method is the enhanced mass transport. A fresh solution is constantly transported to the electrode surface and no buildup of products can occur at the electrode surface since they are continuously washed away. Moreover, flow systems make automation easier, leading to more reproducible experiments [18]. (**This method was applied in the work detailed in Paper II**).

2.1 Electrode modification

Electrodes used in electrochemical sensors consist of a counter electrode (CE), a reference electrode (RE) and a working electrode (WE) [19]. This three-electrode cell with one working electrode is the most common setup used in electrochemistry but a three-electrode system with dual working electrodes is an interesting way to enhance electrochemical performance. This type of system can determine more than one analyte,

shorten analytical time and reduce detection cost. In this system, the auxiliary electrode (AE) and the reference electrode (RE) are equally shared.

The material used to modify the electrode is a crucial component for the sensing element, which can dramatically increase the response signal, reduce the overpotential of the analyte, broaden the determination dynamic range, and improve detection sensitivity and specificity. In recent years, composite electrode modification layers have incorporated carbon materials, metallic materials, composite materials and enzymes.

2.1.1 Carbon material

Carbon materials, possessing good conductivity, can be used as a substrate supporting metal nanoparticles and conducting polymers that have electrocatalytic activity. Graphene oxide (GO) is one of the most widely used carbon materials in electrochemical sensors because it not only has unique electrical and chemical properties, but also possesses other useful properties, such as high oxygen-containing chemical groups that provide excellent hydrophilicity [20-22]. **Paper II** describes how GO was used to improve the surface area of an electrode and the determination of the optimal GO loading that provided the best sensitivity for the determination of uric acid and dopamine (**Figure 1**).

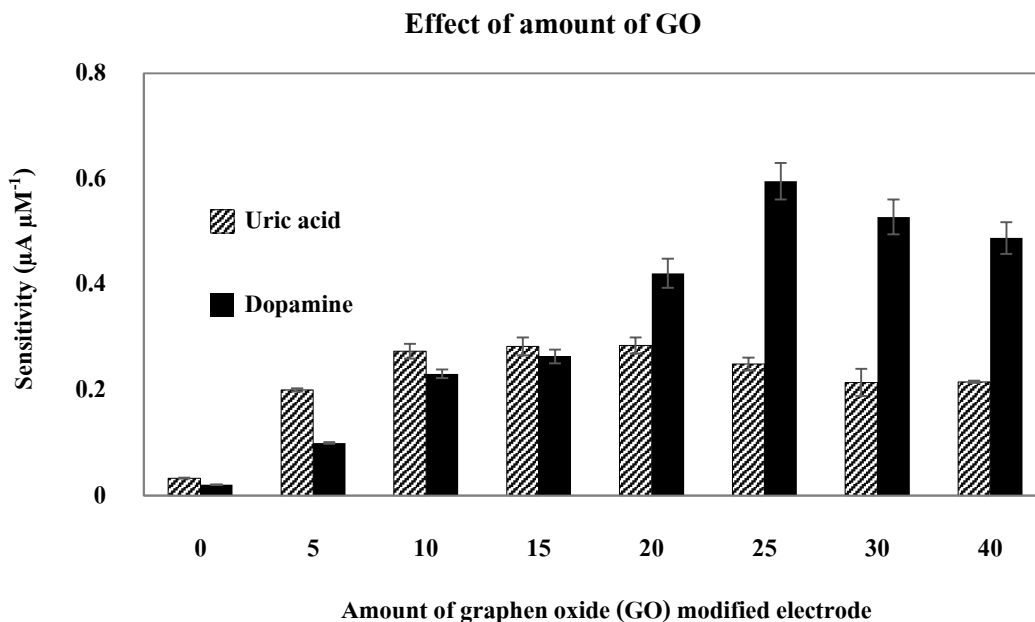


Figure 1 The sensitivity (slope of the calibration plot of 2-10 μM of UA and DA) of an electrode modified with different amounts of graphene oxide (GO) (**Paper II**).

2.1.2 Composite material

Composite materials combine two or more different components that are expected to compensate the deficient characteristics of each component. The concept has led to various developments in electrochemical sensors, such as nanocomposite materials for improved electrocatalytic detection of target analytes, and nano-composite materials utilized as transducers for enzyme-based biosensors.

Paper I describes the development of a nanocomposite of palladium nanoparticles and glassy carbon spheres (PdNPs-GCS) that was used to improve the sensitivity of the developed electrochemical sensor. Glassy carbon spheres (GCS) are an interesting candidate support material. The material exhibits excellent conductivity, a wide potential window, structural stability, a large surface area and thermal insulation [23]. They have been used with metal nanoparticles to fabricate nanocomposites that enhance the catalytic activities of electrodes. Palladium nanoparticles (PdNPs) are preferable to platinum or gold due to their lower price and they not only have great

catalytic, adsorptive, and other useful properties themselves but can also be used as additives for other functional materials to enhance their catalytic properties [23-25]. **Paper I** describes how a nanocomposite of PdNPs-GCS was used to improve the electrocatalytic oxidation of hydroxylamine (**Figure 2**). Moreover, nanocomposite materials can be utilized as transducer materials for enzyme-based biosensors (**Paper II**).

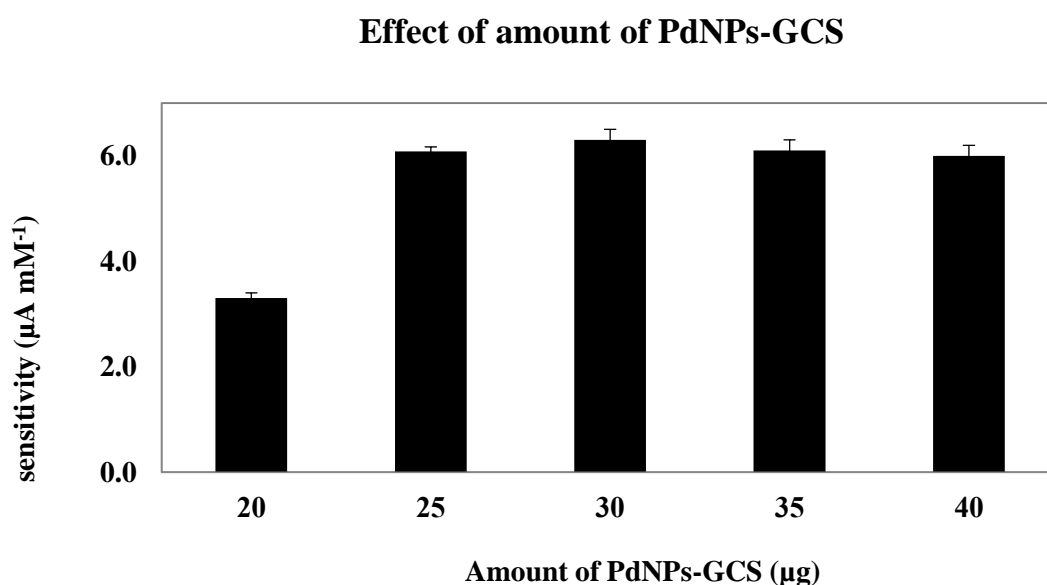


Figure 2 The sensitivity (slope of the calibration plot of 0.1-10 mM of UA and DA) of an electrode modified with different amounts of PdNPs-GCS (**Paper I**).

Enzymes with specific catalytic functions can be used as electrode modification materials to fabricate electrochemical sensors. Due to the high specificity of enzymes, enzyme biosensors can avoid interference from other substances during the detection process. Besides that, enzyme biosensors also exhibit the advantages of short detection time and high sensitivity. This section will focus on a glucose biosensor. The working principle of this electrode depends on the signal change induced by an enzymatic reaction. It is well known that hydrogen peroxide (H_2O_2) is a product of enzymatically catalyzed reactions [26]. The redox mediator prussian blue (PB), or ferric ferrocyanide ($Fe_4^{III} [Fe^{II}(CN)_6]_3$), has excellent electrocatalytic properties for H_2O_2 reduction at low

applied potential [27]. Since the bimolecular rate constant of PB ($3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) for the reduction of H_2O_2 is comparable to the enzymatic rate for peroxidase ($2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), PB can act as an “artificial peroxidase” [28]. Moreover, the high catalytic activity and selectivity of PB lowers the operating potential (around 0.1 V) sufficiently to prevent or greatly reduce the contribution not only from potential interfering compounds [29] but also from UA and DA ($E_{\text{ox}} > 0.1 \text{ V}$). So, it can measure glucose in the presence of UA and DA without interference. **Figure 3** shows a calibration curve between the current and the concentration of glucose at a GOx/Chi/PB-G/GCE (**Paper II**).

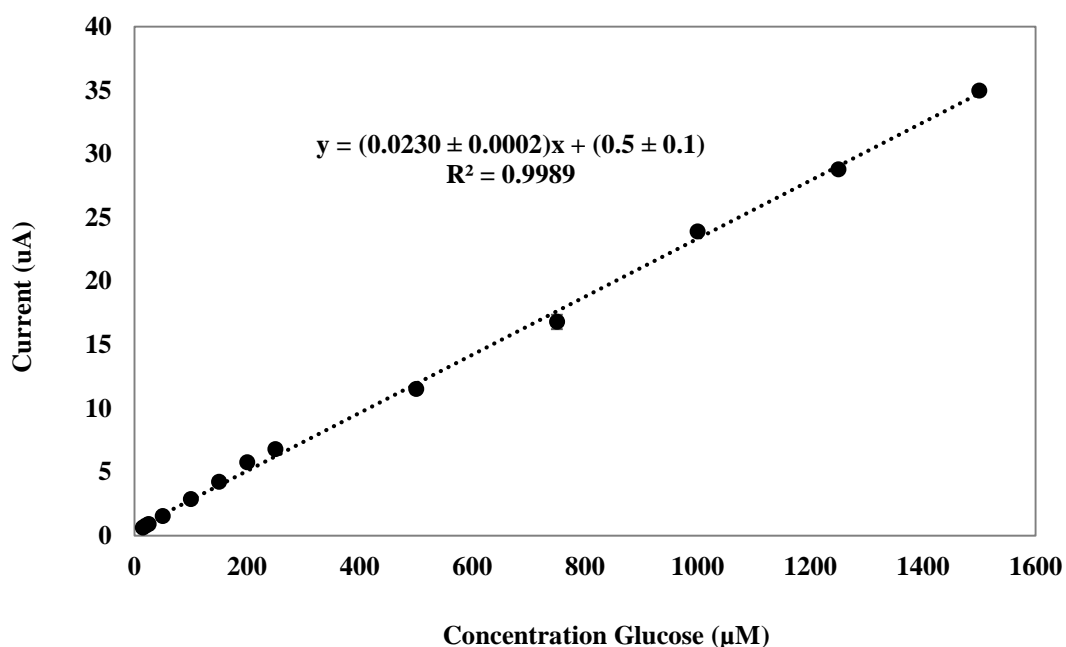


Figure 3 Calibration curve of concentration of glucose in the range from 15 to 1500 μM at GOx/Chi/PB-G/GCE (**Paper II**).

2.2 Transducer

A transducer is a device that transforms the response from the reaction between the target analyte and the recognition layer into an electrical signal (current or potential). Meanwhile, in a biosensor system, transducers change the energy carrying the chemical information of an analyte into useful analytical signals: one of them is an electrochemical signal.

2.2.1 Electrochemical transducer

In this research work, cyclic voltammetry (CV), linear sweep voltammetry (LSV), chronoamperometry and amperometry (Amp) will be investigated.

2.2.1.1 Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry (CV) is one of the most commonly used techniques for studying the electrochemical behavior of electroactive species on an electrode surface. It can be carried out by sweeping a range of voltage between two values in forward and backward directions starting from V_1 to V_2 and back to V_1 (excitation waveform) (**Figure 4**). The resulting faradaic current is measured from a cyclic voltammogram. For analyte identification, the cyclic voltammogram provides a unique reaction potential for each substance. The analyte can be quantified from the analyte peak current at its oxidation or reduction potential [30]. In this work, this method was applied to study the electrochemical behavior of hydroxylamine on variously modified electrodes (**Figure 5a**) (**Paper I**) and the electrochemical behavior of dopamine and uric acid on a bare glassy carbon electrode, a glassy carbon electrode modified with graphene oxide (**Figure 5b**) (**Paper II**) and a glassy carbon electrode modified with chitosan/GOx/PB-G (**Figure 5c**) (**Paper II**).

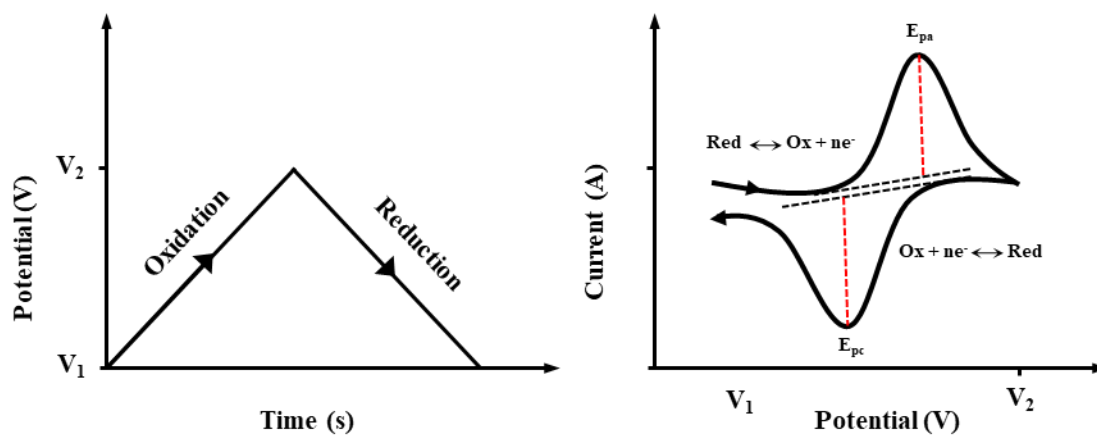


Figure 4 Typical input (a) and output (b) waveforms for cyclic voltammetry [31].

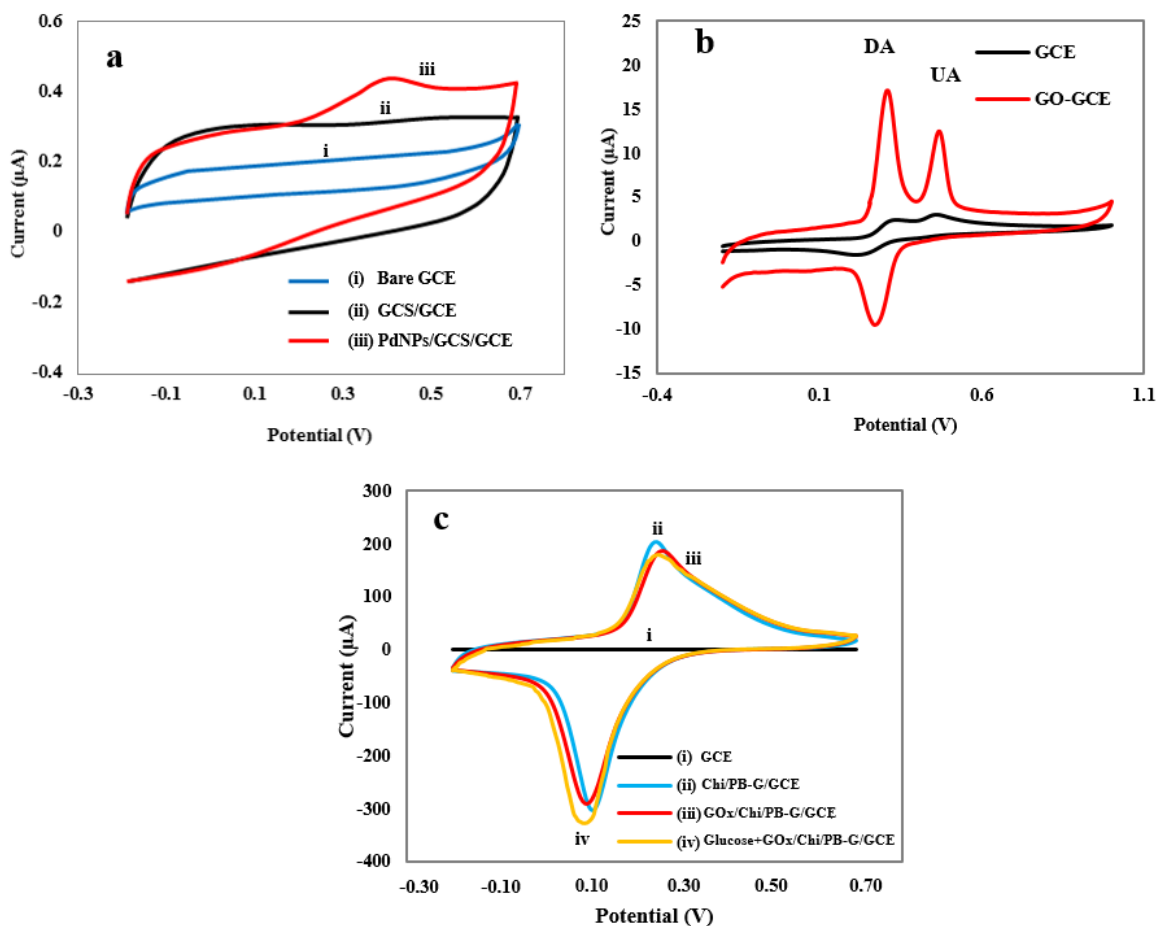


Figure 5 (a) CV curves of GCE (i), GO/GCE (ii) and PdNPs/GO/GCE (iii) in 0.1 M phosphate buffer solution pH 7 (**Paper I**): (b) CV curves of bare GCE and GO/GCE for measurement of 100 μM DA and 100 μM UA: (c) CV curves of PB/GCE (i), Chi/PB-G/GCE (ii), GOx/Chi/PB-G/GCE (iii) (**Paper II**) and GOx/Chi/PB-G/GCE with glucose (iv) in a 0.10 M acetate buffer solution at pH 5.0 containing 0.10 M KCl (**Paper II**).

2.2.1.2 Adsorptive stripping voltammetry (AdSV)

Adsorptive stripping voltammetry (AdSV) is widely used to enhance the sensing range and the sensitivity of electrochemical techniques. It consists of two steps. During the first step, accumulation, target analytes in the solution are accumulated on the working electrode surface by adsorption (physical or chemical). In the second step,

stripping (detection), the accumulated analytes are stripped from the working electrode surface into solution, which is accomplished using different voltammetry modes for reduction or oxidation of the accumulated analyte (**Figure 6**) [32, 33]. This method was applied for the measurement of UA and DA as reported in **Paper II**.

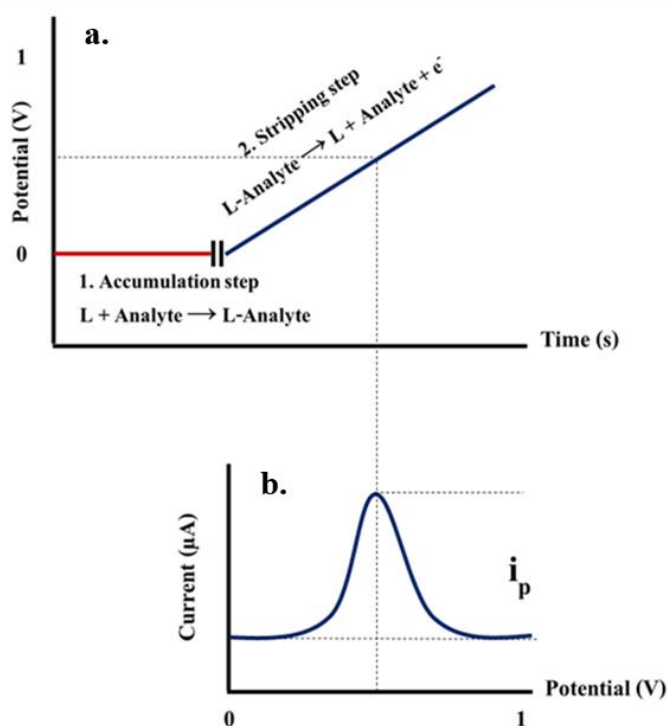


Figure 6 AdSV: (a) the potential-time waveform and (b) the resulting voltammogram.

2.2.1.3 Chronoamperometry

Chronoamperometry is one of the most commonly used techniques employed with sensors. Typical waveforms used in chronoamperometry are shown in **Figure 7(a)**. As with cyclic voltammetry, this technique is undertaken with a stationary electrode in a quiescent solution, initially at a potential where the target analyte does not undergo any electrochemical reaction. The potential is then stepped to a point beyond that required for the target analyte to be electrochemically oxidised or reduced. Here its surface concentration becomes effectively zero. The resulting current–time dependence

is monitored: a typical profile is shown in **Figure 7(b)** [31]. In this work, this method was applied for the measurements of glucose described in **Paper II**.

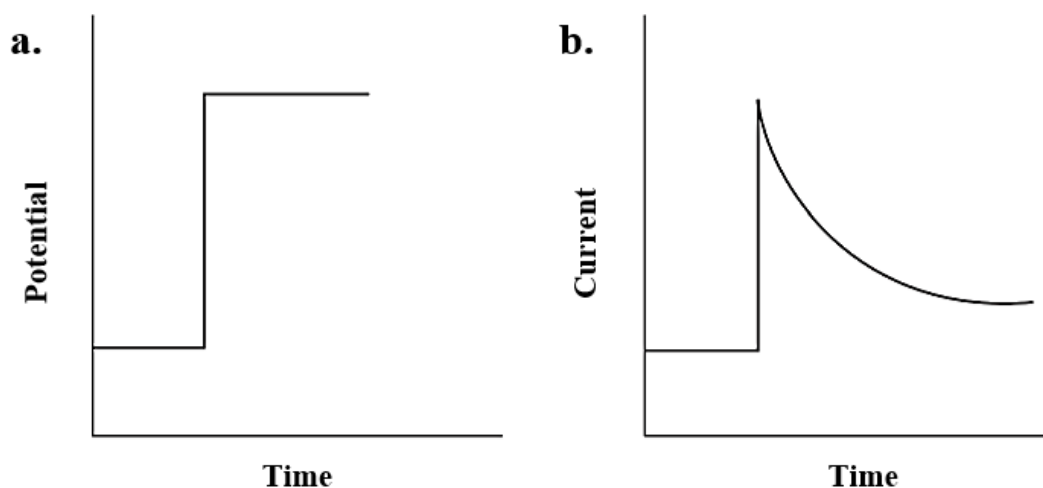


Figure 7 Typical input (a) and output (b) waveforms for chronoamperometry [31].

2.2.1.4 Amperometric

In amperometric detection, a fixed potential is applied to a working electrode sufficient to cause oxidation or reduction of the target analyte on the electrode surface. The resulting electric current is directly proportional to the analyte concentration and is measured as a function of time [34]. The study reported in **Paper I** used amperometric detection coupled with flow analysis, or flow injection amperometry (FI-Amp).

FI-Amp is one of the most popular techniques of analysis and has been applied in clinical, pharmaceutical, food processing and industrial and environmental fields [35-38]. It has the capacity to obtain excellent results in terms of speed, precision and accuracy through the automation of analytical processes [35]. FI-Amp is based on the injection of a target analyte into a carrier solution continuously propelled through a narrow tube by a pump. Electroactive analytes are injected through an injection port and passed through a working electrode (electrochemical detector). In this research

work, this method was applied in the work described in **Paper I** for the measurement of hydroxylamine, as shown in **Figure 8**.

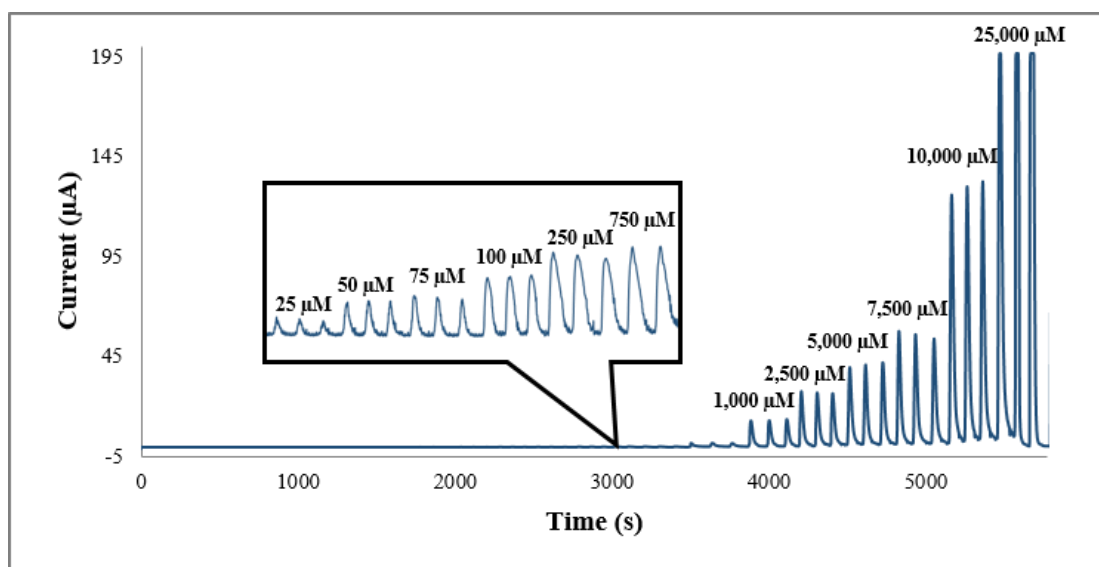


Figure 8 FI-Amp responses of PdNPs/GO/GCE for the detection of various concentrations of hydroxylamine

3. Analytical performance criteria

The analytical performances of the developed method need to be evaluated to show the applicability in real samples. The validation characteristics for this analytical method are selectivity, linearity and limit of detection (LOD), reproducibility, selectivity and recovery.

3.1 Linearity

An important parameter in a quantitative analytical method is linearity. The definition of linearity is a response to an analyte in a sample which is directly proportional to the concentration of the analyte [39]. The linearity was obtained by plotting current response *vs.* analyte concentrations. The linearity was evaluated by considering a correlation coefficient that was greater than 0.99 [40]. In this thesis, the plots of the responses *vs.* the analyte concentrations were employed for the linear sweep voltammetric and chronoamperometric sensor (**Paper II**) and amperometric sensor (**Paper I**).

3.2 Sensitivity

The sensitivity of a method is determined by the slope of a linear calibration plot of the ratios of response change and the analyte concentration. If a small change in the concentration of the analyte causes a large change in the response, the method is a sensitive method [39]. In this thesis, sensitivity was evaluated by the current change *vs.* analyte concentration (**Paper I-II**).

3.3 Limit of detection

The limit of detection (LOD) is the lowest concentration of an analyte that can be detected. Many methods can be used to calculate the LOD, in this thesis the LOD was calculated based on the following equation: $LOD = 3S_y/B$, where S_y is the standard error of estimate (residual standard deviation) in regression, and B is the slope of the linear regression [41] (**Paper I-II**).

3.4 Reproducibility

Reproducibility expresses the closeness of individual measurements of an analyte under the same condition [39]. In this thesis, the reproducibility of the fabrication sensor was investigated by comparing the response of the analyte to different electrode preparations, in the same laboratory, with the same equipment and the same operator (**Paper II**). The relative standard deviations (RSD) of the sensitivities were used to indicate the acceptability of the developed sensors [42].

3.5 Selectivity

Selectivity is the efficacy of the method to determine the target analyte accurately and specifically in the presence of other components in a sample matrix [39]. In this thesis, the selectivity of the sensor for detection of the target analyte was investigated by testing with various possible interference species present in real samples (**Paper II**).

3.6 Recovery

The accuracy of an analytical procedure can be described as the closeness of agreement between the true value or an accepted reference value and the found value [39]. The recovery of an analytical method aims to estimate the true value of the analyte concentration to confirm the accuracy of the developed sensor. Recovery is determined by spiking a known analyte concentration into a sample, then comparing the measured concentration to the known concentration. This applied method was used in the work described in **Paper II**.

4. Concluding Remarks

This thesis focused on the development of electrochemical sensors to be applied in the environment for the detection of hydroxylamine and in clinical applications to detect glucose, UA and DA. The work describes the modification of electrodes with various materials that possess unique properties. The aims of the work were to achieve good performances and good responses from the contributions of the modifying materials.

Hydroxylamine detection by flow injection amperometry was based on a glassy carbon electrode (GCE) modified with a composite of palladium nanoparticles and glassy carbon spheres (PdNPs-GCS). PdNPs improved the electrocatalytic oxidation of hydroxylamine. The glassy carbon spheres have excellent conductivity, a wide potential window, structural stability, a large surface area and provide thermal insulation. The PdNPs-GCS-modified GCE exhibited high sensitivity and good stability with a low detection limit (**Paper I**).

Glucose, UA and DA detection was based on a dual working electrode system for the simultaneous detection of DA, UA and glucose, using adsorptive stripping voltammetry and chronoamperometry. The results from this sensor displayed good linearity, low detection limits and indicated good reproducibility. The preparation of the dual working electrode sensor is relatively simple. This sensor determined glucose, UA and DA in blood samples with excellent accuracy, providing an alternative diagnostic tool for medicine. This system may open up a new path for further simultaneous electrochemical sensing (**Paper II**).

5. Reference

- [1] J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, *et al.*, "Biosensors for life quality: Design, development and applications," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 102, pp. 179-194, 2004/09/13/ 2004.
- [2] S. Lupu, "New Developments in Electrochemical Sensors Based on Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-Modified Electrodes," *International Journal of Electrochemistry*, vol. 2011, 2011.
- [3] A. J. S. Ahammad, J.-J. Lee, and M. A. Rahman, "Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes," *Sensors*, vol. 9, p. 2289, 2009.
- [4] H. R. S. Lima, J. S. da Silva, E. A. de Oliveira Farias, P. R. S. Teixeira, C. Eiras, and L. César C. Nunes, "Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of antineoplastic drugs," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 108, pp. 27-37, 2018/06/15/ 2018.
- [5] P. Kannan and S. A. John, "Highly sensitive determination of hydroxylamine using fused gold nanoparticles immobilized on sol-gel film modified gold electrode," *Anal Chim Acta*, vol. 663, pp. 158-64, Mar 24 2010.
- [6] "Business Concentrates," *Chem. Eng. News*, vol. 78, pp. 15-16, 2000.
- [7] M. McCoy, "Antitrust agencies eye bromine industry," *Chem. Eng. News*, vol. 77, pp. 11-12, 1999.
- [8] S. X. X. Hu, W. I. Lei, K. K. Chao, B. J. Hall, and S. F. Chung, "Common chronic health problems and life satisfaction among Macau elderly people," *International Journal of Nursing Sciences*, vol. 3, pp. 367-370, 2016.
- [9] L. Jacob, J. Breuer, and K. Kostev, "Prevalence of chronic diseases among older patients in German general practices," *GMS German Medical Science*, vol. 14, p. Doc03, 03/03
- [10] Y. Koskun, A. Savk, B. Sen, and F. Sen, "Highly sensitive glucose sensor based on monodisperse palladium nickel/activated carbon nanocomposites," *Anal Chim Acta*, vol. 1010, pp. 37-43, Jun 20 2018.
- [11] R. E. Simoni, L. N. Gomes, F. B. Scalco, C. P. Oliveira, F. R. Aquino Neto, and M. L. de Oliveira, "Uric acid changes in urine and plasma: an effective tool in

- screening for purine inborn errors of metabolism and other pathological conditions," *J Inherit Metab Dis*, vol. 30, pp. 295-309, Jun 2007.
- [12] Y. C. Luo, J. S. Do, and C. C. Liu, "An amperometric uric acid biosensor based on modified Ir-C electrode," *Biosens Bioelectron*, vol. 22, pp. 482-8, Oct 15 2006.
- [13] M. Ates, J. Castillo, A. Sezai Sarac, and W. Schuhmann, "Carbon fiber microelectrodes electrocoated with polycarbazole and poly(carbazole-co-p-tolylsulfonyl pyrrole) films for the detection of dopamine in presence of ascorbic acid," *Microchimica Acta*, vol. 160, pp. 247-251, 2008/01/01 2008.
- [14] A. Üğ̈e, D. Koyuncu Zeybek, and B. Zeybek, "An electrochemical sensor for sensitive detection of dopamine based on MWCNTs/CeO₂-PEDOT composite," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 813, pp. 134-142, 2018.
- [15] J. Zheng and X. Zhou, "Sodium dodecyl sulfate-modified carbon paste electrodes for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid," *Bioelectrochemistry*, vol. 70, pp. 408-15, May 2007.
- [16] D. Antuñ̈a-Jiménez, G. Díaz-Díaz, M. C. Blanco-López, M. J. Lobo-Castañ̈on, A. J. Miranda-Ordieres, and P. Tuñ̈on-Blanco, "Chapter 1 - Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Past, Present, and Future," in *Molecularly Imprinted Sensors*, S. Li, Y. Ge, S. A. Piletsky, and J. Lunec, Eds., ed Amsterdam: Elsevier, 2012, pp. 1-34.
- [17] M. S. Cosio, M. Scampicchio, and S. Benedetti, "Chapter 8 - Electronic Noses and Tongues," in *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Y. Picó, Ed., ed Boston: Academic Press, 2012, pp. 219-247.
- [18] R. Nasraoui, D. Floner, and F. Geneste, "Analytical performances of a flow electrochemical sensor for preconcentration and stripping voltammetry of metal ions," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 629, pp. 30-34, 2009/04/15/ 2009.
- [19] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. New York: Wiley, 2001.
- [20] D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, and R. S. Ruoff, "The chemistry of graphene oxide," *Chem Soc Rev*, vol. 39, pp. 228-40, Jan 2010.

- [21] L. Yu, P. Li, X. Ding, and Q. Zhang, "Graphene oxide and carboxylated graphene oxide: Viable two-dimensional nanolabels for lateral flow immunoassays," *Talanta*, vol. 165, pp. 167-175, Apr 1 2017.
- [22] Y. Zeng, Y. Zhou, L. Kong, T. Zhou, and G. Shi, "A novel composite of SiO₂-coated graphene oxide and molecularly imprinted polymers for electrochemical sensing dopamine," *Biosens Bioelectron*, vol. 45, pp. 25-33, Jul 15 2013.
- [23] L. Kong, X. Lu, X. Bian, W. Zhang, and C. Wang, "Accurately tuning the dispersity and size of palladium particles on carbon spheres and using carbon spheres/palladium composite as support for polyaniline in H₂O₂ electrochemical sensing," *Langmuir*, vol. 26, pp. 5985-90, Apr 20 2010.
- [24] E. Lee, M. S. Ahmed, J.-M. You, S. K. Kim, and S. Jeon, "Conducting polymer-coated, palladium-functionalized multi-walled carbon nanotubes for the electrochemical sensing of hydroxylamine," *Thin Solid Films*, vol. 520, pp. 6664-6668, 2012.
- [25] E. Lee, D. Kim, J.-M. You, S. K. Kim, M. Yun, and S. Jeon, "Electrocatalytic Oxidation of Hydrazine and Hydroxylamine by Graphene Oxide-Pd Nanoparticle-Modified Glassy Carbon Electrode," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 12, pp. 8886-8892, // 2012.
- [26] D. Jiang, Z. Chu, J. Peng, and W. Jin, "Screen-printed biosensor chips with Prussian blue nanocubes for the detection of physiological analytes," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 228, pp. 679-687, 2016.
- [27] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, and L. Gorton, "On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes," *Electrochemistry Communications*, vol. 1, pp. 78-82, 1999/02/01/ 1999.
- [28] J.-H. Yang, N. Myoung, and H.-G. Hong, "Facile and controllable synthesis of Prussian blue on chitosan-functionalized graphene nanosheets for the electrochemical detection of hydrogen peroxide," *Electrochimica Acta*, vol. 81, pp. 37-43, 2012.
- [29] N. Chandra Sekar, S. A. Mousavi Shaegh, S. H. Ng, L. Ge, and S. N. Tan, "A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 204, pp. 414-420, 2014.

- [30] L. R. F. Allen J. Bard, "ELECTROCHEMICAL METHODS " 2001.
- [31] K. C. Honeychurch, "13 - Printed thick-film biosensors," in *Printed Films*, M. Prudenziati and J. Hormadaly, Eds., ed: Woodhead Publishing, 2012, pp. 366-409.
- [32] W. T. P. dos Santos, H. M. A. Amin, and R. G. Compton, "A nano-carbon electrode optimized for adsorptive stripping voltammetry: Application to detection of the stimulant selegiline in authentic saliva," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 279, pp. 433-439, 2019/01/15/ 2019.
- [33] W. T. P. dos Santos and R. G. Compton, "A simple method to detect the stimulant modafinil in authentic saliva using a carbon-nanotube screen-printed electrode with adsorptive stripping voltammetry," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 285, pp. 137-144, 2019/04/15/ 2019.
- [34] T. J. Roussel, D. J. Jackson, R. P. Baldwin, and R. S. Keynton., "Amperometric Techniques," presented at the In Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics, Boston, 2013.
- [35] S. Kurbanoglu, M. A. Unal, and S. A. Ozkan, "Recent developments on electrochemical flow injection in pharmaceuticals and biologically important compounds," *Electrochimica Acta*, vol. 287, pp. 135-148, 2018/10/10/ 2018.
- [36] X. Chen, B. Chu, H. Xi, J. Xu, L. Lai, H. Peng, *et al.*, "Determination of chlorine ions in raw milk by pulsed amperometric detection in a flow injection system," *Journal of Dairy Science*, vol. 101, pp. 9647-9658, 2018/11/01/ 2018.
- [37] S. Preecharueangrit, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, and A. Numnuam, "Amperometric sensing of sulfite using a gold electrode coated with ordered mesoporous carbon modified with nickel hexacyanoferrate," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 808, pp. 150-159, 2018/01/01/ 2018.
- [38] K. Promsuwan, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, and W. Limbut, "Flow injection amperometric nitrite sensor based on silver microcubics-poly (acrylic acid)/poly (vinyl alcohol) modified screen printed carbon electrode," *Electrochimica Acta*, vol. 232, pp. 357-369, 2017/04/01/ 2017.
- [39] AOAC, "Guidelines for Standard Method Performance Requirements," pp. 1-16, 2016.

- [40] P. Bruce, P. Minkkinen, and M.-L. Riekkola, "Practical Method Validation Validation Sufficient for an Analysis Method," *Mikrochim. Act*, vol. 128, pp. 93-106, 1998.
- [41] J. W. Robinson, E. M. S. Frame, and G. M. Frame II, *Undergraduate Instrumental Analysis* United States America: Marcel Dekker, 2005.
- [42] I. Taverniers, M. De Loose, and E. Van Bockstaele, "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 535-552, 2004/09/01/ 2004.

Paper I

Electrochemical sensor for hydroxylamine detection based on palladium nanoparticle –glassy carbon spherical (PdNPs-GCS) modified on glassy carbon electrode.

Soleh, A., Kooni-art, P., Kanatharana, P., Thavarungkul, P.,Limbut, W.

Proceeding



บทความฉบับสมบูรณ์ในรายงานการประชุมวิชาการ

การประชุมวิชาการ และประกวด
นวัตกรรมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ **1**

“เกิดพระเกียรติวันแม่แห่งชาติ สู่ความมั่นคง มั่งคั่ง ยั่งยืน”

1st National Graduate Research Conference and
Creative Innovation Competition



วันที่ 17-18 สิงหาคม 2560

ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติดิเอ็มเพรส โรงแรมดิเอ็มเพรส เชียงใหม่



บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ชั้น 1 อาคารเทพศาสตร์ถิตย์
63 หมู่ 4 ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

Ins 0-5387-5520 Fax 0-5349-8133 E-mail : GCIC.MJU@gmail.com



การประชุมวิชาการและประกวดนวัตกรรมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 1
1st National Graduate Research Conference and Creative Innovation Competition
วันที่ 17-18 สิงหาคม 2560 โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่

เซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับตรวจวัดไฮดรอกซีลามีน โดยใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วย

อนุภาคนาโนพาลาเดียม-กลาสคาร์บอนทรงกลม (PdNPs-GCS)

Electrochemical sensor for hydroxylamine detection based on palladium nanoparticle – glassy carbon spherical (PdNPs-GCS) modified on glassy carbon electrode

อัสมิ สอและ^{1,2,3} ปณัสยา คูนิอาจ⁴ เพรศพิชญ์ คณาธารณา^{1,2,3} ปณต ถาวรังกูร^{1,2,5} และ วรากร ลิมบุตร^{1,2,4*}

A. Soleh^{1,2,3}, P. Kooni-art⁴, P. Kanatharana^{1,2,3}, P. Thavarungkul^{1,2,5} and W. Limbut^{1,2,4*}

¹Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112,

²Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112,

³Department of chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112

⁴Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112

⁵Department of Physic, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112

*Corresponding author, E-mail: warakorn.l@psu.ac.th, Tel: 074-879955; Fax: 074-446681

บทคัดย่อ

การพัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับตรวจวัดไฮดรอกซีลามีน (NH_2OH , Hydroxylamine) ด้วยขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วย อนุภาคนาโนพาลาเดียม-กลาสคาร์บอนทรงกลม (Palladium nanoparticle – Glassy carbon spherical, PdNPs-GCS) โดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมทรีร่วมกับระบบโพลีอิเล็กโตรด การศึกษาลักษณะสัณฐานของ PdNPs-GCS และศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของไฮดรอกซีลามีนบนขั้วไฟฟ้า PdNPs-GCS ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (Cyclic voltammetry) ตามลำดับ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ปริมาณ PdNPs-GCS ที่ใช้สำหรับปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้า ปริมาตรสารตัวอย่าง และอัตราการไหล ภายใต้สภาวะเหมาะสมพบว่า ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นให้ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 25 – 25,000 ไมโครโมลาร์ มีขีดจำกัดการตรวจวัด เท่ากับ 36 ไมโครโมลาร์ และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 120 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีเสถียรภาพที่ดี (%RSD < 5.3 (n=73))

คำสำคัญ: ไฮดรอกซีลามีน เทคนิคแอมเพอโรเมทรี ระบบโพลีอิเล็กโตรด PdNPs-GCS

Abstract

Electrochemical sensor has been developed for the determination of hydroxylamine by flow injection amperometry based on glassy carbon electrode (GCE) modified with Palladium nanoparticle – Glassy carbon spherical (PdNPs-GCS). The surface morphology and electrochemical behavior of hydroxylamine on PdNPs-GCS modified electrode were characterized by scanning electron microscope and cyclic voltammetry, respectively. The amount of PdNPs-GCS for modified electrode, potential, sample volume and flow rate were optimized. Under the optimal conditions, this sensor provided a wide linear concentration range of 25 to 25,000 μM . The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 36 μM and 120 μM , respectively. Moreover, it provided good stability (%RSD < 5.3 (n=73))

Keywords: Hydroxylamine, Amperometric technique, Flow injection system, PdNPs-GCS

บทนำ

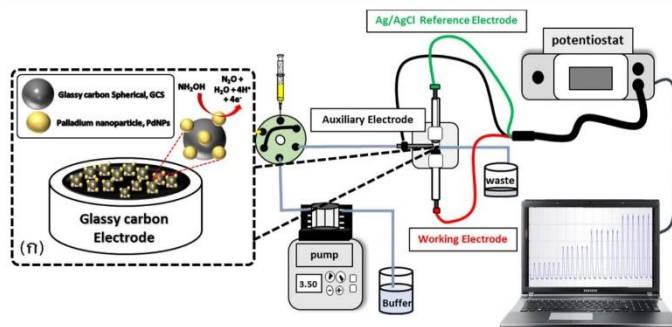
ไฮดรอกซีลามีน (Hydroxylamine, NH_2OH) เป็นสารอนุพันธ์ของแอมโมเนีย รู้จักกันในชื่อสารรีดิวซ์ (Reduce agent) (Hoffman and Lees, 1953) และเป็นสารในกระบวนการทางจุลินทรีย์ที่สำคัญสองขั้นตอนของวัฏจักรไนโตรเจน ที่เกิดระหว่างกระบวนการไนตริฟิเคชันและออกซิเดชันของแอมโมเนียที่ไม่ออกซิเจน (Catroux *et al.*, 2001) ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นวัตถุเติมในอุตสาหกรรมต่างๆ ในกระบวนการผลิตยา และผลิตเคมีภัณฑ์ (Kumasaki *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตาม เป็นที่ทราบกันดีว่าไฮดรอกซีลามีนมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ พิษ และสัตว์ ซึ่งหากสัมผัสอาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจและผิวหนัง เสี่ยงต่อการเกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อดวงตา หรือหากเข้าสู่ร่างกายจะเป็นอันตรายและก่อให้เกิดผลเสียอย่างร้ายแรงต่อสุขภาพจากการได้รับสารพิษเป็นเวลานาน (Prodanchuk *et al.*, 2013) นอกจากนี้ มีรายงานการเสียชีวิต ซึ่งมีสาเหตุมาจากสารไฮดรอกซีลามีนที่เกิดขึ้นในสหรัฐอเมริกา เมื่อเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2542 ทำให้มีผู้เสียชีวิต 5 ราย และเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2543 ในประเทศญี่ปุ่น ทำให้มีผู้เสียชีวิต 4 ราย (Mccoy, 1999) ดังนั้นการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนจึงมีความสำคัญ ทั้งในด้านอุตสาหกรรม สิ่งแวดล้อม และทางการแพทย์

วิธีการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีน โดยทั่วไปมีหลายวิธี เช่น สเปกโตรสโกปี (Spectroscopy) (Afkhani *et al.*, 2006) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) (Liu *et al.*, 2009) แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC) (Guzowski *et al.*, 2003) ถึงแม้ว่าวิธีการตรวจวัดต่างๆ เหล่านี้เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ แต่วิธีการเหล่านี้มีข้อจำกัด เช่น ต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะความชำนาญในการใช้งาน ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เครื่องมือมีราคาแพง จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งเป็นวิธีที่น่าสนใจอย่างมากเนื่องจากมีความไวในการวิเคราะห์สูง มีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ ให้ค่าการตอบสนองที่รวดเร็ว ใช้งานง่าย สะดวก และเครื่องมือมีราคาถูก (Zhang *et al.*, 2010)

อย่างไรก็ตามไฮดรอกซีลามีนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าได้บนขั้วไฟฟ้าจากวัสดุคาร์บอนธรรมดา ดังนั้นจำเป็นต้องมีวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อเร่งปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของไฮดรอกซีลามีนเพื่อให้สามารถตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า วิธีที่สามารถทำได้คือ การใช้อนุภาคพลาเดียม ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี มีความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดี และที่สำคัญสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮดรอกซีลามีน (Lee *et al.*, 2012) และเพื่อให้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไววิเคราะห์สูง และมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำลง วิธีหนึ่งที่สามารถทำได้โดยการเพิ่มอนุภาคพลาเดียมบนวัสดุคาร์บอน เช่น กราฟีน (Graphene) (Lu *et al.*, 2011) ท่อนาโนคาร์บอน (Carbon nanotubes, CNT) (Baghayeri *et al.*, 2014) หรือกลาสคาร์บอนทรงกลม (Glassy carbon spherical, GCS) (Kong *et al.*, 2010) จากที่กล่าวมาข้างต้น งานวิจัยนี้เลือกใช้กลาสคาร์บอนทรงกลมมาสังเคราะห์ร่วมกับอนุภาคนาโนพลาเดียม เนื่องจากกลาสคาร์บอนทรงกลมมีราคาถูกมากเมื่อเทียบกับกราฟีน หรือท่อนาโนคาร์บอน และมีคุณสมบัติเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี มีช่วงศักย์ไฟฟ้าใช้งานกว้าง มีพื้นที่ผิวมาก

ดังนั้นงานวิจัยนี้ต้องการที่จะพัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนโดยใช้ PdNPs-GCS ที่ปรับปรุงบนขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนร่วมกับระบบโพลิวินิลแอลกอฮอล์ (Flow injection) เนื่องจากระบบโพลิวินิลแอลกอฮอล์เป็นระบบที่ใช้งานง่าย ใช้สารเคมีน้อย และสามารถตรวจวิเคราะห์สารได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้ปั๊มในการนำส่งสารละลายและใช้อินเจกชัน-วาล์ว (Injection valve) และไซริง (Syringe) สำหรับการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ (ภาพที่ 1) ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนได้ดียิ่งขึ้น มีความไววิเคราะห์สูง มีการตอบสนองที่รวดเร็ว และมีเสถียรภาพที่ดี

การประชุมวิชาการและประกวดนวัตกรรมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 1
1st National Graduate Research Conference and Creative Innovation Competition
วันที่ 17-18 สิงหาคม 2560 โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 1 แสดงระบบไหลผ่านของเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า (ก) แสดงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮดรอกซีลามีน โดยมี PdNPs บน GCS ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสังเคราะห์ PdNPs-GCS และการเตรียมปรับปรุงผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนด้วย PdNPs-GSC

การสังเคราะห์ PdNPs บน GSC โดยผสม PdCl_2 กับ GCS และใช้สารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) เป็นตัวรีดิวซ์ ซึ่ง Pd^{2+} รับอิเล็กตรอนกลายเป็น PdNPs บนผิว GCS โดย PdNPs-GSC ที่สังเคราะห์ได้จะนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) โดยรูปแบบของ PdNPs ที่เกาะบน GCS ที่จะต้องมีขนาดเล็ก และมีการกระจายสม่ำเสมอ จากนั้นจะนำ PdNPs-GSC ที่สังเคราะห์ได้มาปรับปรุงผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน โดยมีขั้นตอนการเตรียมขั้วไฟฟ้าคือ

ขัดผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนด้วยผงอะลูมินา (Alumina) ขนาด 5, 1 และ 0.05 ไมโครเมตร ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้แห้งโดยเป่าแก๊สไนโตรเจน และนำ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของ PdNPs-GSC ในสารละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ (Dimethylformamide, DMF) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า จากนั้นนำไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที และนำไปตรวจวัดไฮดรอกซีลามีน ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (Cyclic voltammetry) เพื่อดูพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของไฮดรอกซีลามีนโดยจะเปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วย GCS และขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนธรรมดา

2. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีน

2.1 ศึกษาปริมาณ PdNPs-GCS ที่เหมาะสมสำหรับปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

เนื่องจากปริมาณของ PdNPs-GCS ที่ใช้ปรับปรุงผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮดรอกซีลามีน (Lee *et al.*, 2012) และปริมาณ PdNPs-GCS ที่หนาเกินไปจะทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนของสารไปยังขั้วไฟฟ้าจึงยากขึ้นส่งผลให้สัญญาณกระแสที่ได้ลดลง (Li *et al.*, 2015) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาปริมาณของ PdNPs-GCS สำหรับปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนโดยในงานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณของ PdNPs-GCS ตั้งแต่ 20 – 40 ไมโครกรัม โดยมีเกณฑ์ในการเลือกพิจารณา คือ ปริมาณของ PdNPs-GCS ที่ให้ความไววิเคราะห์สูง ซึ่งสามารถหาได้จาก การวัดสารไฮดรอกซีลามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่ากระแสไฟฟ้า ซึ่งความไววิเคราะห์คือความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

2.2 ศึกษาศักยภาพไฟฟ้าที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีโนด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี

เนื่องจากศักยภาพไฟฟ้าที่ใช้สำหรับตรวจวัดไฮดรอกซีลามีโนจะส่งผลต่อสัญญาณกระแสที่ได้ โดยจะต้องเป็นศักยภาพที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮดรอกซีลามีโนได้ดีและให้สัญญาณกระแสของไฮดรอกซีลามีโนสูง ดังนั้นจะศึกษาผลของค่าศักยภาพไฟฟ้าตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.5 โวลต์ โดยมีเกณฑ์ในการเลือกพิจารณาคือ ศักยภาพไฟฟ้าที่ให้ความไววิเคราะห์สูง

2.3 ศึกษาปริมาณของสารตัวอย่างและอัตราการไหลของสารที่เหมาะสมที่ใช้ในระบบโพลีอินเจคชัน

เนื่องจากการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีโนจะใช้ระบบโพลีอินเจคชัน ซึ่งปริมาณของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในระบบและอัตราการไหลของสารที่ผ่านเข้าไปในระบบจะส่งผลต่อสัญญาณกระแสที่ได้ โดยสัญญาณกระแสที่ได้จะคงที่เมื่อปริมาณของสารตัวอย่างมากเกินไปและอัตราการไหลที่เร็วเกินไปจะทำให้เวลาที่สารสัมผัสกับขั้วไฟฟ้าทำงานอาจจะไม่เพียงพอ ซึ่งจะส่งผลให้สัญญาณของไฮดรอกซีลามีโนที่ได้ลดลง (Promsuwan *et al.*, 2017) ดังนั้นจะศึกษาปริมาณของสารตัวอย่างและอัตราการไหลของสารตั้งแต่ 50 ถึง 500 ไมโครลิตร และ 0.25 ถึง 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ โดยมีเกณฑ์ในการเลือกพิจารณาคือ เลือกปริมาณของสารตัวอย่างและอัตราการไหลที่ให้ความไววิเคราะห์สูงและเวลาในการวิเคราะห์สั้น

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นโดย ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range) ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD), ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) และความเสถียรของขั้วไฟฟ้า (Stability)

3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range)

ศึกษาช่วงความเข้มข้นของไฮดรอกซีลามีโนที่สามารถให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่มีความถูกต้อง ศึกษาโดยตรวจวัดค่าสัญญาณกระแสของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีลามีโนที่มีความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีลามีโนและสัญญาณกระแส และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เกณฑ์การยอมรับได้โดยทั่วไปคือค่า r จะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.995-1.000 จึงจะแสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์และสัญญาณกระแสทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและจากสมการเส้นตรงความชันของกราฟแสดงถึงค่าความไวในการวิเคราะห์ (Bruce *et al.*, 1998)

3.2 ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

ขีดจำกัดการตรวจวัดคือความเข้มข้นต่ำสุดหรือน้อยที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ โดยสามารถพิจารณาได้จากอัตราส่วนระหว่างสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนมากกว่าหรือเท่ากับสาม ($S/N \geq 3$) (Swartz and Krull, 1997) สามารถคำนวณจากสมการ $LOD = 3S_a / b$ เมื่อ S_a คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานบนจุดตัดแกน y และ b คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

3.3 ขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)

เป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และหาปริมาณได้ในตัวอย่าง โดยสามารถพิจารณาได้จากอัตราส่วนระหว่างสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนมากกว่าหรือเท่ากับสิบ ($S/N \geq 10$) (Swartz and Krull, 1997) สามารถคำนวณจากสมการ $LOQ = 10S_a / b$ เมื่อ S_a คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานบนจุดตัดแกน y และ b คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

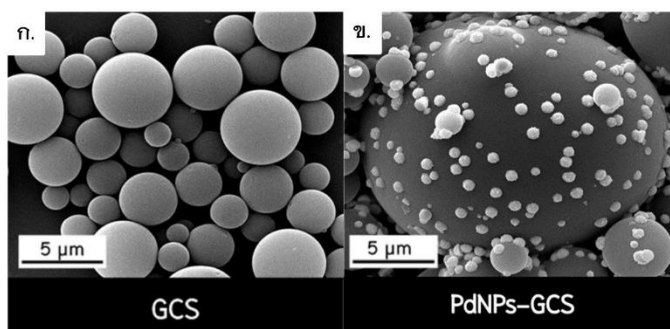
3.4 ศึกษาความเสถียรของขั้วไฟฟ้า (Stability)

ศึกษาอายุการใช้งานของ PdNPs-GCS ที่ปรับปรุงขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนสำหรับการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนในช่วงเวลาต่าง ๆ ซึ่งจะเปรียบเทียบกับค่ากระแสไฟฟ้าหรือความไววิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ กับค่ากระแสไฟฟ้าหรือความไววิเคราะห์ครั้งแรก

ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

1. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ PdNPs-GCS

ลักษณะพื้นฐานวิทยาของ PdNPs-GCS ที่สังเคราะห์ได้ ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ภาพที่ 2 ก. แสดงลักษณะพื้นฐานของกาสีคาร์บอนทรงกลม (GCS) จะมีลักษณะเป็นทรงกลมและพื้นผิวราบเรียบ และในภาพที่ 2 ข. แสดงลักษณะพื้นฐานของ PdNPs-GCS จะเห็นได้ว่ามีอนุภาคขนาดเล็กของพาลาเดียม (PdNPs) เกาะอยู่บริเวณผิวของกาสีคาร์บอนทรงกลม (GCS) ซึ่งมีขนาดเล็กและมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ

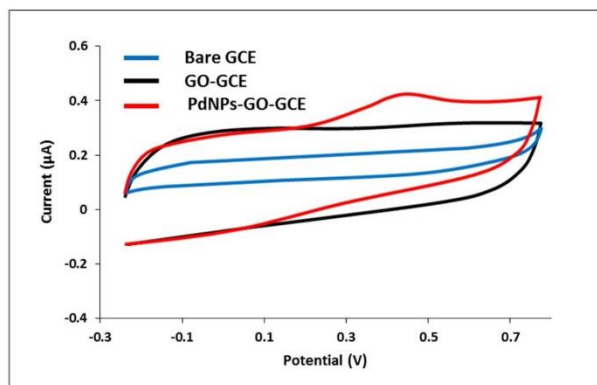


ภาพที่ 2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) แสดงลักษณะพื้นฐานของ GCS ในรูปที่ 2 ก. และ PdNPs-GCS ในรูปที่ 2 ข.

2. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของ PdNPs-GCS

ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของ PdNPs-GCS ที่สังเคราะห์ได้ และทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮดรอกซีลามีน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนของขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วย PdNPs-GCS ขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยกาสีคาร์บอนทรงกลม (GCS) และขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนธรรมดา จากไซคลิกโวลแทมโมแกรม (ภาพที่ 3) พบว่าสัญญาณของไฮดรอกซีลามีนไม่ปรากฏสำหรับขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนธรรมดา และขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยกาสีคาร์บอนทรงกลม (GCS) ในขณะที่ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PdNPs-GCS จะปรากฏสัญญาณของไฮดรอกซีลามีนที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 V เนื่องจาก PdNPs สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮดรอกซีลามีนได้ (Lee *et al.*, 2012)

การประชุมวิชาการและประกวดนวัตกรรมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 1
1st National Graduate Research Conference and Creative Innovation Competition
วันที่ 17-18 สิงหาคม 2560 โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่

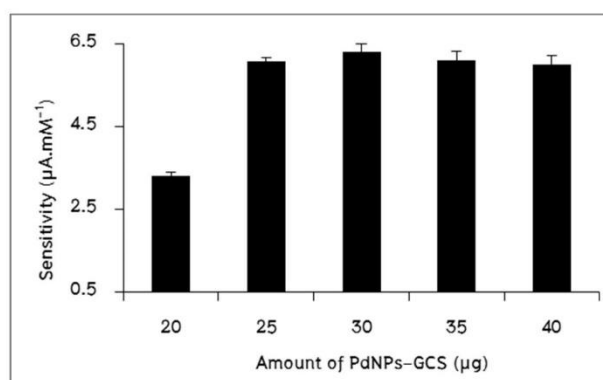


ภาพที่ 3 โครดิกโวลแทมโมแกรมแสดงสัญญาณของไฮดรอกซีลามีน บนขั้วไฟฟ้าถ่านคาร์บอน (-) ขั้วไฟฟ้าถ่านคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยถ่านคาร์บอนทรงกลม (GCS) (-) และขั้วไฟฟ้าถ่านคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยถ่านคาร์บอนทรงกลมร่วมกับอนุภาคนาโนพาลาเดียม (PdNPs-GCS) (-) ที่ช่วงศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง 0.8 โวลต์

3. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีน

3.1 ศึกษาปริมาณ PdNPs-GCS ที่เหมาะสมสำหรับปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าถ่านคาร์บอน

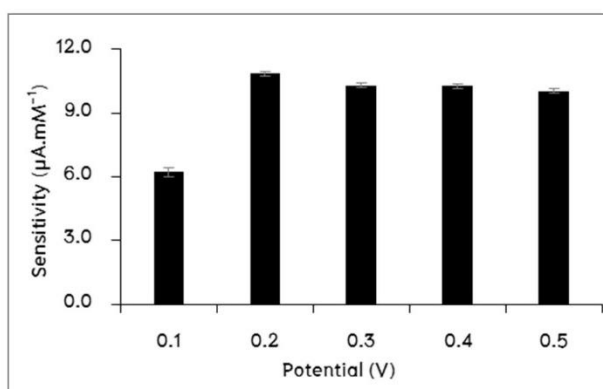
ศึกษาปริมาณ PdNPs-GCS สำหรับปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าตั้งแต่ 20 – 40 ไมโครกรัม (ภาพที่ 4) พบว่าเมื่อปริมาณ PdNPs-GCS เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 20 – 30 ไมโครกรัม ทำให้ค่าความไววิเคราะห์ของการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อปริมาณ PdNPs-GCS มากกว่า 30 ไมโครกรัม ค่าความไววิเคราะห์ลดลงเนื่องจากปริมาณ PdNPs-GCS ที่มากเกินไปทำให้ชั้นของ PdNPs-GCS ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าหนาเกินไปการส่งผ่านอิเล็กตรอนของสารไปยังขั้วไฟฟ้าจึงยากขึ้นส่งผลให้สัญญาณที่ได้ลดลง (Li *et al.*, 2015) ดังนั้นปริมาณ PdNPs-GCS ที่เหมาะสมสำหรับปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้า คือ 30 ไมโครกรัม



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความไววิเคราะห์ของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วย PdNPs-GCS และปริมาณของ PdNPs-GCS ตั้งแต่ 20-40 ไมโครกรัม ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัดที่ 0.1 โวลต์

3.2 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัด

การศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีनด้วยวิธีแอมเพอโรเมทรี ตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้า 0.1 ถึง 0.5 โวลต์ (ภาพที่ 5) พบว่า เมื่อศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัดเพิ่มขึ้นจาก 0.1 ถึง 0.2 โวลต์ ทำให้ค่าความไววิเคราะห์ของการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนเพิ่มขึ้น และเมื่อศักย์ไฟฟ้าที่ใช้มากกว่า 0.2 โวลต์ ค่าความไววิเคราะห์จะลดลงและคงที่ตั้งแต่ 0.3 ถึง 0.5 โวลต์ ดังนั้นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนด้วยวิธีแอมเพอโรเมทรี คือ 0.2 โวลต์ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนด้วยวิธีแอมเพอโรเมทรีกับงานวิจัยก่อนหน้า (Kannan and John 2010, Allibai Mohanan *et al.*, 2016) พบว่ามีค่าน้อยกว่า ซึ่งจะช่วยลดผลของตัวรบกวนที่อาจพบในการตรวจวัดตัวอย่างจริง

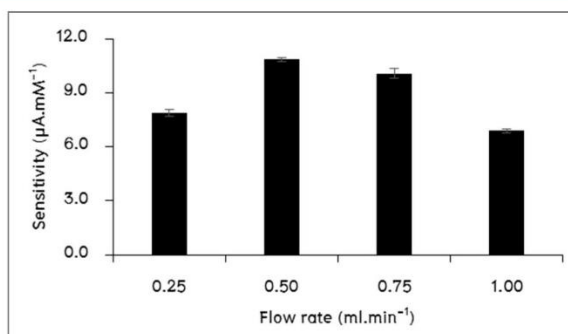


ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความไววิเคราะห์ของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วย PdNPs-GCS และ ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัด ตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.5 โวลต์

3.3 ศึกษาปริมาณของสารตัวอย่างและอัตราการไหลที่เหมาะสมในการตรวจวัด

การศึกษ ปริมาณของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าระบบโพลาร์อินเจคชัน ตั้งแต่ปริมาณ 50 ถึง 500 ไมโครลิตร จากผลการทดลอง เมื่อปริมาณของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้น พบว่าค่าความไววิเคราะห์ของไฮดรอกซีลามีนเพิ่มขึ้นและคงที่หลังจากปริมาณของสารตัวอย่างมากกว่า 200 ไมโครลิตร เนื่องจากเป็นปริมาณที่มากเกินพอของสารตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดในระบบโพลาร์อินเจคชัน และศึกษาอัตราการไหลของสารที่ผ่านเข้าระบบโพลาร์อินเจคชัน ตั้งแต่ที่อัตราการไหล 0.25 ถึง 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที (ภาพที่ 6) จากผลการทดลองเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นจาก 0.25 ถึง 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าค่าความไววิเคราะห์เพิ่มขึ้น และที่อัตราการไหลมากกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าค่าความไววิเคราะห์ลดลง เนื่องจากเมื่ออัตราการไหลที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพการเคลื่อนที่ของไฮดรอกซีลามีนเข้าไปยังผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงานเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามอัตราการไหลที่เร็วเกินไปทำให้เวลาที่สารสัมผัสกับขั้วไฟฟ้าทำงานไม่เพียงพอ ทำให้สัญญาณของไฮดรอกซีลามีนที่ได้ลดลงส่งผลให้ค่าความไววิเคราะห์ที่ได้ลดลง (Promsuwan *et al.*, 2017) ดังนั้นปริมาณสารตัวอย่างและอัตราการไหลของสารที่เหมาะสมสำหรับผ่านเข้าระบบโพลาร์อินเจคชัน สำหรับการตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนคือ 200 ไมโครลิตร และ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

การประชุมวิชาการและประกวดนวัตกรรมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 1
1st National Graduate Research Conference and Creative Innovation Competition
วันที่ 17-18 สิงหาคม 2560 โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่

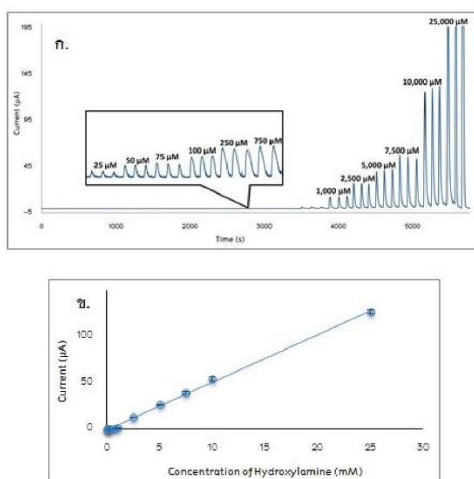


ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความไววิเคราะห์ของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วย PdNPs-GCS และอัตราการไหลของสารที่ผ่านเข้าในระบบไหลเวียนเจคชัน (flow injection)

4. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range)

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยพิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง และขีดจำกัดของการตรวจวัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อที่ 3 จากภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นของไฮดรอกซิลามีน พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 25 – 25,000 ไมโครโมลาร์ มีสมการเส้นตรงคือ $y = (5.16 \pm 0.08)x - (0.5 \pm 0.7)$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9987 มีขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 36 ไมโครโมลาร์ และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 120 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 7 แสดงสัญญาณแอมเพอโรแกรมของไฮดรอกซิลามีน (ก.) และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นของไฮดรอกซิลามีนในช่วงความเข้มข้น 25 – 25,000 ไมโครโมลาร์ (ข.)

4.2 ศึกษาความเสถียรของขั้วไฟฟ้า (Stability)

ผลการศึกษาความเสถียรของ PdNPs-GCS ที่ปรับปรุงบนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซิลามีนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยนำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้แต่ละครั้งเปรียบเทียบกับค่า

กระแสไฟฟ้าที่ได้ในครั้งแรก ผลการทดลองพบว่า ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นสามารถหาปริมาณไฮดรอกซีลามีนได้มากถึง 73 ครั้ง ซึ่งมีค่า %RSD น้อยกว่า 5.3 ตามเกณฑ์กำหนดของ Association of Official Analytical Chemists, AOAC (AOAC, 2016) แสดงให้เห็นว่าขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีเสถียรภาพสูง

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยสามารถพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไฮดรอกซีลามีนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วย PdNPs-GCS และตรวจวัดไฮดรอกซีลามีนด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรีร่วมกับระบบโพลีวีอินแอลเซน ได้ศึกษาคุณสมบัติของ PdNPs-GCS ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และศึกษาพฤติกรรมการทางเคมีไฟฟ้าของไฮดรอกซีลามีนบนขั้วไฟฟ้ากัลลาสซีคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วย PdNPs-GCS ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วย PdNPs-GCS 30 ไมโครกรัม ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัดที่ 0.2 โวลต์ ปริมาตรสารตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร และอัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 25 – 25,000 ไมโครโมลาร์ มีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 36 ไมโครโมลาร์ มีขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 120 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีเสถียรภาพที่ดี (%RSD > 5.3 (n=73)) จากขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีที่พัฒนาขึ้น ซึ่งเพียงพอสำหรับวิเคราะห์ไฮดรอกซีลามีนในตัวอย่างจริงได้ ดังนั้นในอนาคตสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีลามีนในตัวอย่างต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น น้ำบาดาล แม่น้ำ ลำคลอง เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันวิจัยการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไบโอเซนเซอร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ที่ใช้ในการทำการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- AOAC Official Methods of analysis. (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirement.
- Afkhami, A., Madrakian, T., & Maleki, A. (2006). Indirect Kinetic Spectrophotometric Determination of Hydroxylamine Base on Its reaction with Iodate. *Anal. Sci.*, 22, 329–331.
- Allibai Mohanan, V. M., Kacheri Kunnummal, A., & Biju, V. M. N. (2016). Electrochemical sensing of hydroxylamine using a wax impregnated graphite electrode modified with a nanocomposite consisting of ferric oxide and copper hexacyanoferrate. *Microchimica Acta*, 183(6), 2013–2021.
- Baghayeri, M., Veisi, H., Veisi, H., Maleki, B., Karimi-Maleh, H., & Beitollahi, H. (2014). Multi-walled carbon nanotubes decorated with palladium nanoparticles as a novel platform for electrocatalytic sensing applications. *RSC Adv.*, 4(91), 49595–49604.
- Bruce, P., Minkinen, P., & Riekkola, M.-L. (1998). Practical Method Validation Validation Sufficient for an Analysis Method. *Mikrochim. Acta*, 128, 93–106.
- Catroux, G., Hartmann, A., & Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230(1), 21–30.

- Guzowski, J. P., Golanoski, C., & Montgomery, E. R. (2003). A gas chromatographic method for the indirect determination of hydroxylamine in pharmaceutical preparations: conversion into nitrous oxide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(5), 963–974.
- Hoffman, T., & Lees, H. (1953). The biochemistry of the nitrifying organisms. *J. Biochem.*, 54, 579–583.
- Kong, L., Lu, X., Bian, X., Zhang, W., & Wang, C. (2010). Accurately tuning the dispersity and size of palladium particles on carbon spheres and using carbon spheres/palladium composite as support for polyaniline in H₂O₂ electrochemical sensing. *Langmuir*, 26(8), 5985–5990.
- Kannan, P., & John, S. A. (2010). Highly sensitive determination of hydroxylamine using fused gold nanoparticles immobilized on sol-gel film modified gold electrode. *Anal Chim Acta*, 663(2), 158–164.
- Kumasaki, M., Fujimoto, Y., & Ando, T. (2003). Calorimetric behaviors of hydroxylamine and its salts caused by Fe(III). *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 16(6), 507–512.
- Lee, E., Kim, D., You, J.-M., Kim, S. K., Yun, M., & Jeon, S. (2012). Electrocatalytic Oxidation of Hydrazine and Hydroxylamine by Graphene Oxide-Pd Nanoparticle-Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(12), 8886–8892.
- Li, C., Zhao, J., Yan, X., Gu, Y., Liu, W., Tang, L., . . . Zhang, Z. (2015). Tremella-like graphene-Au composites used for amperometric determination of dopamine. *The Analyst*, 140(6), 1913–1920.
- Liu, L., Papadaki, M., Pontiki, E., Stathi, P., Rogers, W. J., & Mannan, M. S. (2009). Isothermal decomposition of hydroxylamine and hydroxylamine nitrate in aqueous solutions in the temperature range 80–160 degrees C. *J Hazard Mater*, 165(1–3), 573–578.
- Lu, L. M., Li, H. B., Qu, F., Zhang, X. B., Shen, G. L., & Yu, R. Q. (2011). In situ synthesis of palladium nanoparticle-graphene nanohybrids and their application in nonenzymatic glucose biosensors. *Biosens Bioelectron*, 26(8), 3500–3504.
- Mcco, M. (1999). Antitrust agencies eye bromine industry. *Chem. Eng. News*, 77(25), 11–12.
- Prodanchuk, M. G., Tsatsakis, A. M., Prodanchuk, G. M., & Tsakalof, A. K. (2013). Investigation of in vivo toxicity of hydroxylamine sulfate and the efficiency of intoxication treatment by α -tocopherol acetate and methylene blue. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 227–232.
- Promsuwan, K., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., & Limbut, W. (2017). Flow injection amperometric nitrite sensor based on silver microcubics-poly (acrylic acid)/poly (vinyl alcohol) modified screen printed carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 232, 357–369.
- Swartz, M. E., & Krull, I. S. (1997). *Analytical Method Development and Validation*. New York: Marcel Dekker.
- Zhang, C., Wang, G., Liu, M., Feng, Y., Zhang, Z., & Fang, B. (2010). A hydroxylamine electrochemical sensor based on electrodeposition of porous ZnO nanofilms onto carbon nanotubes films modified electrode. *Electrochimica Acta*, 55(8), 2835–2840.

Paper II

Novel electrochemical sensor using a dual working electrode system for simultaneous determination of glucose, uric acid and dopamine.

Soleh, A., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Limbut, W.

Submitted manuscript

Cover Letter (including Suggested Referees)

Faculty of Science, Prince of Songkla University
Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

28 June 2019

Dear Editor,

We would like to submit the manuscript by Asamee Soleh, Proespichaya Kanatharana, Panote Thavarungkul and Warakorn Limbut entitled “Novel electrochemical sensor using a dual working electrode system for simultaneous determination of glucose, uric acid and dopamine” for publishing in *Electrochimica Acta*. The manuscript was submitted online on 28 June 2019.

This research aimed to design and construct a novel dual working electrode electrochemical sensor system for the simultaneous determination of glucose, UA, and DA. GO/GCE was used as working electrode 1 (WE1) for DA and UA detection using adsorptive anodic stripping voltammetry. Chi/GOx/PB-G/GCE was used as working electrode 2 (WE2) for the chronoamperometry detection of glucose. The fabrication and operating condition were optimized to obtain the highest sensitivity of the sensor. The sensor was evaluated for its analytical performance before applying DA, UA and glucose in real blood plasma samples.

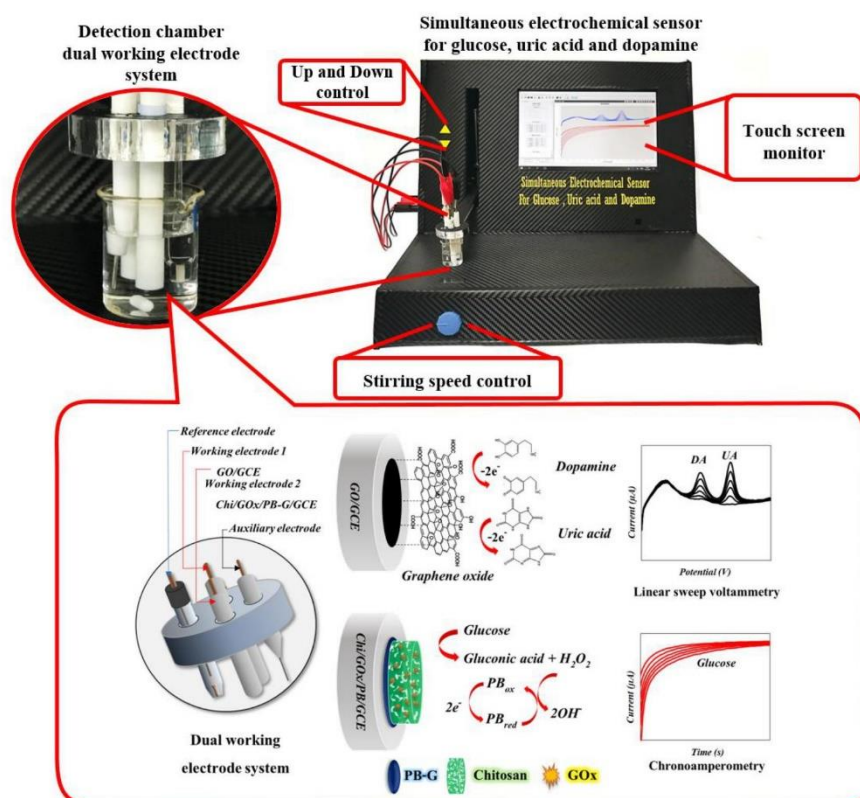
Your consideration of this manuscript is appreciated.

Yours sincerely,

Warakorn Limbut, Ph.D.
Department of Applied Science, Faculty of Science
Prince of Songkla University,
Hat Yai, Songkhla, 90112
THAILAND.
Tel.: +66 74 288561
Fax: +66 74 446681

Graphical Abstract (for review)

Graphical Abstract



Research Highlights

Highlights

- First lab built simultaneous electrochemical sensor system based on dual working electrodes
- Novel electrochemical sensors for simultaneous determination of glucose, uric acid, and dopamine
- Two electrochemical techniques, adsorptive anodic stripping voltammetry and chronoamperometry are utilized
- The sensor has good linearity, low detection limit and good reproducibility
- This sensor can determine DA, UA and glucose in blood samples with excellent accuracy
- The developed method open up a new path for further simultaneous electrochemical sensing

***Manuscript (including Abstract)**
[Click here to view linked References](#)

1

1
2
3
4 **Novel electrochemical sensor using a dual working electrode system**
5 **for simultaneous determination of glucose, uric acid and dopamine**
6
7
8
9

10
11 Asamee Soleh^{a,b,c}, Proespichaya Kanatharana^{b,c}, Panote Thavarungkul^{a,b,d},

12
13
14 Warakorn Limbut^{a,b,e*}
15

16
17 *^aCenter of Excellence for Trace Analysis and Biosensor, Prince of Songkla University, Hat Yai,*
18 *Songkhla 90112, Thailand*
19

20
21 *^bCenter of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla*
22 *University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand*
23

24
25 *^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla*
26 *90112, Thailand*
27

28
29 *^dDepartment of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla*
30 *90112, Thailand*
31

32
33 *^eDepartment of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai,*
34 *Songkhla 90112, Thailand*
35

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

** Corresponding author:* Department of Applied Science, Faculty of Science,

Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112,

Thailand. Tel.: +66 74 288563; Fax: +66 74 446681

E-mail addresses: warakorn.l@psu.ac.th (W. Limbut)

Abstract

Dual working electrodes were constructed for the simultaneous determination of three analytes. A graphene oxide-modified glassy carbon electrode (GO/GCE) was used for adsorptive anodic stripping voltammetry to detect uric acid and dopamine while a chitosan/glucose oxidase/prussian blue-graphite modified glassy carbon electrode (Chi/GOx/PB-G/GCE) was used for chronoamperometric glucose detection. The fabrication and operation conditions for both electrodes were optimized. Linearity was obtained in the ranges of 0.10-30 μM and 30-80 μM for dopamine, 0.20-10 μM and 10-30 μM for uric acid and 15-1,500 μM for glucose. The system provide detection limits ($\text{LOD} = 3\sigma/\text{S}$) of 0.080 μM , 0.11 μM , and 5.7 μM for dopamine, uric acid and glucose, respectively. This dual working electrode system showed good reproducibility and excellent recovery for the simultaneous determination of dopamine, uric acid, and glucose. When used to analyze dopamine, uric acid, and glucose in blood plasma samples, the results agreed well with those from the conventional methods ($P > 0.05$), indicating the potential of this system to simultaneously determine these three analytes in real samples.

Keywords dual working electrodes; adsorptive anodic stripping voltammetry; chronoamperometry; dopamine; uric acid; glucose

1. Introduction

Point-of-care (POC) testing for an aging society has become increasingly important [1, 2]. Common diseases in elderly patients such as diabetes, gout, kidney, Parkinson's and Alzheimer's [3, 4] can be diagnosed based on the levels of certain markers, i.e., glucose, uric acid (UA) and dopamine (DA), respectively. Independent detection of these three disease markers can be easily achieved by three individual assays. Nevertheless, a single assay that can simultaneously detect these three analytes from a single sample, is still lacking.

Electrochemical sensor is an interesting assessment technique due to its simplicity, high sensitivity, rapid, low cost and has been extensively explored for the detection of glucose, UA and DA. Since these three biomarkers coexist in samples, their simultaneous determination is challenging. For glucose detection, it can be by both nonenzymatic and enzymatic processes. The nonenzymatic process involves the direct oxidation of glucose and has been detected based on a variety of materials as well as electrode structures in an alkaline pH solution [5]. However, in an alkaline solution DA is self-polymerized to polydopamine [6, 7] and UA is deprotonated (pK_a of UA = 5.6) [8] thus, affecting their current responses. Thus, for simultaneous detection the enzymatic process is considered. This involves the use of glucose oxidase enzyme (GOx) to catalyze glucose oxidation and measures the glucose level by detecting H_2O_2 generates in the reduction [9].

In the case of DA and UA detection, when traditional bare electrodes are employed the oxidation peaks of DA and UA appear at potentials very close to each other resulting in an overlapping voltammetric response [10]. The situation could be improved using carbon nanomaterials modified electrode, thus, allowing the simultaneous detection of DA and UA. In addition there was no oxidation peak of glucose [11]. Therefore, it would be possible to detect

1
2
3
4 these three analytes from a single sample using two electrodes, one for DA and UA and another
5 for glucose. Dual working electrodes have been applied, for example, for the simultaneous
6 determination of; glucose and lactate [12], cytochrome c (CYC) and vascular endothelial growth
7 factor (VEGF165) tumor markers [13]. Thus, electrochemical dual working electrode systems
8 have great potential for the development of POC diagnostics. To the best of our knowledge, the
9 simultaneous determinations of three analytes using a dual working electrode system have not
10 yet been reported.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21 To simultaneously detecting multiple analytes, suitable techniques and electrode-
22 modification materials that can provide clear signals for each analyte are necessary. For UA and
23 DA detection, electrodes modified with carbon nanotubes [14], ordered mesoporous carbon [15],
24 and graphene oxide (GO) [16] have shown to improve the electrochemical detection performance
25 and enhance the detection limit and sensitivity. GO is interesting due to its excellent
26 hydrophobicity, large surface-to-volume ratio, good stability, biocompatibility, low cost and a
27 large number of oxygen species, which enhances the adsorption of UA and DA on the electrode
28 surface via hydrogen bonding [17-20]. This feature would be beneficial for their detection by
29 adsorptive anodic stripping voltammetry.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 For glucose detection, a biosensor of chitosan/glucose oxidase/Prussian blue-graphite
42 composite-modified glassy carbon electrode (Chi/GOx/PB-G /GCE) was investigated to improve
43 the sensor performance in terms of stability, sensitivity and selectivity. Chitosan (Chi) is a
44 natural polymer that has been widely used as a matrix for enzyme immobilization due to its
45 excellent film forming ability and biocompatibility, high mechanical strength, and nontoxicity.
46 The enzyme GOx catalyzes the oxidation of glucose to H₂O₂ and gluconolactone [21]. PB (Fe₄^{III}
47 [Fe^{II}(CN)₆]₃) acts an electron mediator through the electrocatalysis of H₂O₂ reduction at a low
48 applied potential [9]. The low potential can alleviate interferences from common coexisting
49 species in blood samples, i.e., ascorbic acid (AA), UA, and DA) [22].
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

This research aimed to design and construct a novel dual working electrode electrochemical sensor system for the simultaneous determination of glucose, UA, and DA (Fig. 1A and B). GO/GCE was used as working electrode 1 (WE1) for DA and UA detection using adsorptive anodic stripping voltammetry. Chi/GOx/PB-G/GCE was used as working electrode 2 (WE2) for the chronoamperometry detection of glucose. The fabrication and operating condition were optimized to obtain the highest sensitivity of the sensor. The sensor was evaluated for its analytical performance before applying DA, UA and glucose in real blood plasma samples.

2. Materials and methods

2.1 Materials

GO was from Cheap Tubes (Brattleboro, USA). PB-Graphite was from GWENT (Mamhilad, Pontypool, UK). Acetic acid, potassium chloride and sodium chloride were from Merck (Darmstadt, Germany). DA, chitosan, D-(+)-glucose, sucrose, glutaraldehyde, GOx (127,000 units/g), potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), urea and UA were from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA). N,N-Dimethylformamide (DMF), ascorbic acid and sodium acetate were from Ajax Finechem (Taren Point, Australia).

2.2 Instrumentation

Surface morphology of the GCE, GO/GCE, PB-G/GCE, Chi/PB-G/GCE and Chi/GOx/PB-G/GCE were observed by scanning electron microscopy (SEM) (Quanta 400, FEI, USA). All electrochemical techniques were carried out using a lab built simultaneous electrochemical sensor system based on dual working electrodes (Fig. 1A). The system consists of an instrumentation part and a detection chamber. The instrumentation contains a potentiostat (μ Stat 400 BiPotentiostat/ Galvanostat, DropSens, Asturias, controlled by dropView 8400 software), a stirrer, a touch screen monitor and a step motor to control the electrode vertical

1
2
3
4 movement. The detection chamber is an electrochemical batch cell for the dual working
5 electrode system. There are four electrodes, a GO/GCE working electrode 1 (WE1), a
6
7 Chi/GOx/PB-G/GCE working electrode 2 (WE2), a Ag/AgCl reference electrode, and a platinum
8
9 wire auxiliary electrode. They are inserted into the four slots of the stand (Fig. 1B). Electrode
10
11 configuration plays a critical role in electrochemical measurement and current response of three
12
13 arrangements of the four electrodes, i.e., Y, T and Sq (square), (Supplementary Fig. S1A) were
14
15 compared. The stand with these slots arrangements were designed using the Art Cam Pro 9 (a
16
17 software program). The stands were then fabricated using a computer numerical control (CNC)
18
19 drilling system (Mini CNC 3040, Panmanee CNC Shop, Thailand) with the Art Cam Pro 9
20
21 software (Supplementary Fig. S.1B).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **2.3 Electrode preparation**

33 **2.3.1 Preparation of GO/GCE (WE1)**

34
35 A GCE was polished using alumina slurries (5.0, 1.0, and 0.5 μm , sequentially) and
36
37 rinsed with distilled water. It was then modified by drop casting 25 μg of GO (2 mg/mL in DMF)
38
39 on the electrode surface and allowing the suspension to dry in an air oven at 60 $^{\circ}\text{C}$.
40
41
42
43
44
45

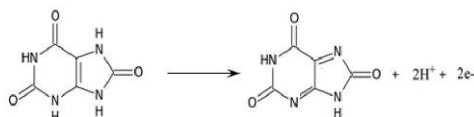
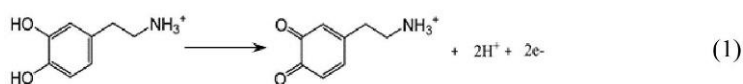
46 **2.3.2 Preparation of Chi/GOx/PB-G/GCE (WE2)**

47
48 Chi/GOx/PB-G/GCE preparation was adapted from a reported procedure [23]. Briefly, a
49
50 PB-modified graphite solution (0.050 g mL⁻¹ in DMF) was drop casted onto a polished GCE and
51
52 left to dry in an air oven at 60 $^{\circ}\text{C}$. One hundred microliters of chitosan (1.5 mg mL⁻¹ in 1.0% v/v
53
54 acetic acid) was mixed with 2.0 μL of 5.0% glutaraldehyde before drop casting 2.5 μL of this
55
56 mixture on top of the PB-G layered GCE. It was immediately stored at -20 $^{\circ}\text{C}$ overnight, thawed
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 at 4 °C for 1 h and rinsed with deionized water to from the chitosan cryogel. To immobilize the
5 enzyme, 10 μL of 5.0 % glutaraldehyde was dropped onto the modified electrode, left for 20
6 min, and rinsed with deionized water. Then, 2.5 μL of GOx (10 unit μL⁻¹ in 100 mM phosphate
7 buffer, pH 7.00) was dropped onto the modified electrode. The crosslinking between the amine
8 group of the GOx and the amino group of chitosan activated with glutaraldehyde was allowed to
9 proceed at 4 °C overnight. The Chi/GOx/PB-G/GCE, when not in used, was stored at 4 °C in 2
10 mL of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.00) containing 0.02% of sodium azide to prevent
11 contamination by microorganisms.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

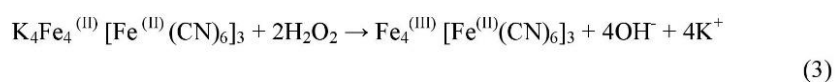
24 **2.4 Electrochemical measurements**

25
26
27 Simultaneous determination of DA and UA was performed with adsorptive anodic
28 stripping voltammetry (WE1, GO/GCE) and chronoamperometry (WE2, Chi/GOx/PB/GCE) for
29 glucose. In the accumulation step, DA and UA in the solution were adsorbed on WE1 at an
30 appropriate accumulation potential and time while stirring. During this time WE2 is turned off.
31 For the measuring step, stirring is stopped and the detection procedure started 10 s later when the
32 solution is motionless. DA and UA were stripped from the WE1 into the solution by applying
33 anodic scans between 0.00 and 0.70 V (vs. Ag/AgCl). The oxidation peak currents of DA
34 (reaction (1)) and UA (reaction (2)) on WE1 were recorded. They are directly proportional to the
35 concentrations of DA and UA (Fig. 1B-a).
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

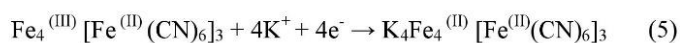


(2)

WE2 detected glucose by the chronoamperometry technique as shown in reactions (3) to (5):



(4)



The oxidized form of $\text{PB}_{\text{ox}} (\text{Fe}_4^{(\text{III})} [\text{Fe}^{(\text{II})}(\text{CN})_6]_3)$ is electrochemically reduced on WE2, resulting in a negative current that is directly proportional to glucose concentration (Fig. 1B-b).

2.5 Optimization of the electrode condition

To achieve the highest efficiency of the developed dual working electrode system, optimal electrodes conditions were investigated. Optimizations were carried out by changing one parameter and keeping the others constant. The sensitivity (slope of the linear relationship between the current signal and the analyte's concentration) obtained at each condition was compared and the optimum condition was considered to be the one that provided a high sensitivity.

For WE1, the electrode conditions of the adsorptive anodic stripping voltammetry were optimized for amount of GO (0.00 to 40.0 μg), accumulation potential (0.20 to -0.30 V) and accumulation time (60 to 360 s) by analyzing a series of DA and UA standard solutions in the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

concentration range of from 2.00 to 10.0 μM . The responses were anodic peak current of the adsorptive anodic stripping voltammogram at 0.32 V for DA and 0.48 V for UA. The effect of the amount of GO were first tested with conditions; 0.00 V accumulation potential, 60 s accumulation time.

In the case of WE2, the electrode conditions of the chronoamperometry to detect glucose were optimized for amount of PB-G (0.050 to 0.60 mg), amount of GOx (5.0 to 50 unit) and applied potential (-0.30 to 0.20 V). The effect of the amount of PB-G were tested with conditions; 25 unit GOx, -0.10 V applied potential. The effect of the amount of GOx was first tested with 0.30 mg of PB-G at an applied potential of -0.10 V. These parameters were investigated by analyzing a series of glucose standard solutions in the concentration range of from 100 to 500 μM . The running buffer used throughout all experiments was a 0.10 M acetate buffer solution at pH 5.00 containing 0.10 M KCl. For glucose, the current signal was obtained from faradaic current generated at $t=1$ s of chronoamperometric curve. All measurements were performed in triplicate.

2.6 Real sample analysis

Six blood samples were collected from Hatyai Hospital, Hat Yai, Songkhla, Thailand. The matrix of the samples were first studied by spiking them with five concentrations of UA, DA, and glucose and diluted 200 times with acetate buffer at pH 5.00 (to reduce the matrix effect). The slopes of the matrix-matched calibration curve and the standard curve were statistically compared (two-way ANOVA). If the dilution provided no significant difference ($P>0.05$), the matrix had no effect on the analysis and the standard calibration curve could be

1
2
3
4 used to calculate the concentrations of the analytes. A recovery test was also performed by
5
6
7 spiking different concentrations of UA, DA, and glucose into blood samples.
8
9

10 11 12 13 14 15 16 17 18 **3. Results and discussion**

19 20 21 **3.1 Effect of electrodes configuration**

22
23
24 The cyclic voltammetric responses of the three electrode configurations Y, T, Sq, with
25 hydroquinone as a redox marker (10, 20, 30, 40 and 50 ppm) all exhibited good oxidation and
26 reduction responses (Supplementary Fig. S2). Both oxidation and reduction sensitivities (slopes
27 of the calibration plots) were best with the Sq configuration followed by the Y and T. This is
28 likely because the Sq has a symmetric configuration with a minimum IR drop and this was used
29 in further experiments.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **3.2 Characterization**

44
45 Surface morphologies of the two modified working electrodes were investigated using
46 SEM. For WE1, the GCE showed a smooth surface (Fig. 2a). When modified with graphene
47 oxide (GO), the GO flakes were regularly distributed on the GCE surface (Fig. 2b). In the case of
48 WE2, the smooth GCE surface (Fig. 2c) was first covered with a layer of PB-G (Fig. 2d). With
49 the cryogel layer, the Chi/PB-G/GCE surface showed a porous structure (Fig. 2e). A GOx film
50 could be seen covered the outer surface of the cryogel after the immobilization of GOx
51 (Fig. 2f).
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 The electrochemical behavior of the dual working electrode system was performed using
5 CV. In this system, the auxiliary electrode (AE) and reference electrode (RE) were equally
6 shared, and the connections for all electrodes were of the same length. For WE1 (GO/GCE), the
7 electrochemical behavior of the stepwise fabrication process was studied with 5.0 mM
8 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ in 0.10 M KCl. When the GCE was modified with GO a pair of well-defined
9 redox peaks for $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ were observed with higher peak currents and smaller peak-to-peak
10 separation (ΔE_p) than those of the GCE (Fig. 3a), indicated that a larger surface area and better
11 electrical conductivity of the GO effectively enhanced the electron transfer.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 The electrochemical behavior of UA and DA were studied with 0.10 M acetate buffer
25 solution at pH 5.00 containing 0.10 M KCl. When 100 μM of UA and DA were added into the
26 electrolyte solution a pair of anodic and cathodic peak currents of DA and one anodic peak
27 current of UA were clearly observed at 0.30 and 0.28, and 0.46 V vs Ag/AgCl, respectively (Fig.
28 3b). The GO/GCE peak currents became much higher than those of the GCE (Fig. 3b). This was
29 likely due to the additional surface area and electrical conductivity of the GO that improved the
30 adsorption of UA and DA and electrochemical detection of UA and DA on the electrode surface.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 In the case of WE2, the electrochemical behavior of the GCE, Chi/PB-G/GCE, GOx/
43 Chi/PB-G/GCE, and GOx/Chi/PB-G/GCE with glucose was studied by CV in a 0.10 M acetate
44 buffer solution at pH 5.00 containing 0.10 M KCl (Fig. 3c). No peak current was observed on the
45 bare GCE (Fig. 3c.i). A pair of well-defined redox peaks of PB at the potential in the range of -
46 0.10 to 0.50 V (vs Ag/AgCl) was observed with the Chi/PB-G/GCE (Fig. 3c.ii), indicated the
47 Chi/PB-G layer electroactivity. The redox peak currents decreased while the peak-to-peak
48 separation (ΔE_p) increased in Fig. 3c.iii, indicating that the GOx was immobilized. This may be
49 attributed to the poor conductivity of the enzyme layer, which hindered the electron transfer
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 toward the electrode surface. After 1.0 mM of glucose was added, the cathodic peak current
5
6 (+0.10 V) increased while the anodic peak current (+0.15 V) decreased (Fig. 3c.iv). This is
7
8 because the reduction of H₂O₂ (reactions (4)), produced by the GOx (reactions (3)), was
9
10 electrocatalysed by PB, hence, the larger cathodic peak current (+0.10 V).
11
12

13
14 The electrochemical behavior of glucose, between 100 and 500 μM, on the GOx/Chi/PB-
15
16 G/GCE (WE2) was then studied by chronoamperometry (at +0.10 V vs Ag/AgCl) with 0.10 M
17
18 acetate buffer pH 5.00 containing 0.10 M KCl. The cathodic current change at t=1 s of the
19
20 chronoamperometric curve increased with the concentration (Fig. 3d). These results indicated the
21
22 ability of the GO/GCE and Chi/GOx/PB-G/GCE as a dual working electrode system for the
23
24 simultaneous determination of glucose, uric acid, and dopamine.
25
26
27
28
29
30

31 32 **3.3 Optimization of the electrode conditions**

33 34 **3.3.1 GO/GCE for DA and UA**

35 36 *The amount of GO*

37
38 The amount of oxygen species enhances the adsorption process and/or hydrogen bonding
39
40 of UA and DA on the electrode surface [20]. By varying the amount of GO on the GCE, the DA
41
42 sensitivity increased with the GO loading up to 25.0 μg then decreased (Fig. 4a) while the
43
44 increase of UA sensitivity was observed only up to 15.0 μg before decreasing. This increase at
45
46 low loading can be explained by an insufficient amount of GO on the GCE to adsorb the
47
48 analytes. However, at higher loadings, the decrease of sensitivity may be due to a large number of
49
50 oxygen-containing groups in an excessive amount of GO hinder the electron transfer on the
51
52 electrode surface [24]. Since the DA concentration in real samples is less than that of UA, and
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 the UA sensitivity with the GO loading at 25.0 μg is not much different from its best at 15.0 μg ,
5
6
7 25.0 μg of GO was used for further studies.
8
9

10 11 12 13 14 15 16 *The accumulation potential and time*

17
18
19 The accumulation step of the adsorptive anodic stripping voltammetry method increased
20
21 the amount of DA and UA adsorbed on the electrode surface, hence improved the sensitivity and
22
23 detection limit of the sensor. The accumulation potential with the highest sensitivity was
24
25 obtained at 0.00 V and -0.2 V for DA and UA, respectively (Fig. 4b). Due to the DA
26
27 concentration in real samples is less than that of UA, then the accumulation potential of 0.00 V
28
29 was used for further studies. The accumulation time was then investigated between 60 and 360 s
30
31 at 0.00 V. The UA sensitivity increased all the way up to 360 s (Fig. 4c). The DA sensitivity
32
33 gradually increased with accumulation time from 60 to 240 s, no significant changes were
34
35 observed for longer times, indicated the saturation of DA on the GO/GCE surface. An
36
37 accumulation time of 240 s was then selected because it was the shortest time that produced the
38
39 highest sensitivity for DA with sufficient sensitivity for UA.
40
41
42
43
44
45

46 **3.3.2 Chi /GOx/PB-G/GCE for glucose**

47 48 49 *The amount of PB-G*

50
51
52 Fig. 4d shows the increase in glucose sensitivity with increasing PB-G loading up to 0.30
53
54 mg, after which the sensitivity decreased. That is, when the amount of PB-G on the GCE is low
55
56 it is insufficient to catalyze the electrochemical reduction of H_2O_2 . When the amount of PB-G is
57
58 too much the sensitivity decreased most likely due to the layer on the modified electrode is
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 becoming too thick and impeded electron transfer. Therefore, loading with 0.30 mg of PB-G on
5
6
7 the GCE was used for further studies.
8
9

10 11 12 13 14 15 ***The amount of GOx*** 16

17
18 The effect of the amount of GOx is shown in Fig. 4e. The biosensor sensitivity increased
19
20 with the amount of GOx, reaching the maximum at 25 unit. This trend can be explained by the
21
22 insulating nature of the enzyme molecules. When a larger amount of GOx was immobilized there
23
24 will be a larger decrease in the electrical conductivity of the biosensor surface [25, 26].
25
26 Therefore, 25 unit was used for further studies.
27
28

29 30 31 ***The detection potential*** 32 33

34 The choice of detection potential is important for achieving a low detection limit and
35
36 avoiding interference from other species. The influence of the applied potential covering the
37
38 reduction peak was investigated in the range from -0.30 to 0.20 V vs Ag/AgCl. The sensitivity
39
40 of the responses increased with the detection potential from -0.30 to 0.10 V (Fig. 4f),
41
42 corresponded well with the CV (Fig. 3c.iv). At the applied potential of 0.20 V there was no
43
44 response (NR). This is as expected since the oxidation reaction of PB began at 0.15 V onwards.
45
46 Therefore, a detection potential of 0.10 V was selected.
47
48

49 50 51 **3.3 Analytical performance** 52

53 54 55 ***3.3.1 Linear dynamic range, limit of detection and limit of quantification*** 56

57 Under the optimal conditions, simultaneous determination of DA, UA, and glucose was
58
59 performed using a dual working electrode system. Fig. 5a displays the responses where the
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 anodic peak current at 0.32 V for DA and 0.48 V for UA increased with concentration. In the
5
6 case of glucose, the cathodic current change at $t=1$ s of the chronoamperometric curve increases
7
8 with the concentration of glucose.
9

10
11
12 Fig. 5b shows two linear response ranges for DA, 0.10-30 μM and 30-80 μM . The limit
13
14 of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated as $\text{LOD} = 3S_a/b$ and LOQ
15
16 $= 10S_a/b$, where S_a is the standard deviation of the intercept and b is the slope of the calibration
17
18 curve and were found to be 0.080 μM and 0.27 μM , respectively. A more narrow two linear
19
20 response ranges of 0.20-10 μM and 10-30 μM were obtained for UA (Fig. 5c). The LOD is 0.11
21
22 μM and the LOQ is 0.38 μM . The appearance of two linear ranges with different sensitivities
23
24 was likely caused by the nature of the adsorbed DA and UA. At low concentrations, DA and UA
25
26 can directly adsorb as a monolayer on the GO/GCE surface, resulting in the linear ranges with
27
28 higher sensitivities; however, at higher concentrations, DA and UA adsorb in multilayers,
29
30 providing the linear ranges with lower sensitivities [27].
31
32
33
34
35

36
37 For glucose a linear range of 15-1,500 μM was obtained (Fig. 5d), with a LOD and LOQ
38
39 of 5.7 μM and 19.2 μM , respectively.
40
41

42 **3.3.2 Reproducibility**

43

44
45 The reproducibility of the two electrodes for the simultaneous determination of DA, UA
46
47 glucose and was studied by comparing the current responses of different preparations of
48
49 electrodes to 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10 μM UA and DA and 100, 200, 300, 400 and 500 μM
50
51 glucose. The six electrode preparations provided relative standard deviations (RSDs) between
52
53 1.4 and 5.0 %, 1.1% and 3.6%, and 1.0% and 2.7% for DA, UA, and glucose, respectively
54
55 (Supplementary Fig. S3). Thus, both electrodes show good repeatability and are acceptable for
56
57 simultaneous determination of DA, UA and glucose according to AOAC guidelines, i.e., 7.3%
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 for 10 mg L⁻¹ and 5.3% for 100 mg L⁻¹ (10 μM DA = 1.9 mg L⁻¹, 10 μM UA = 1.7 mg L⁻¹, 500
5 μM glucose = 90 mg L⁻¹) [28].
6
7
8
9

10 11 12 **3.3.3 Effect of interference**

13
14
15 To apply the developed sensor for the determination of DA, UA and glucose in blood
16 plasma samples, the influence of various possible interference species present in plasma was
17 investigated. The effect of different concentrations of ascorbic acid, urea, sucrose, K⁺, Na⁺ and
18 Cl⁻ on the analytical signal of a standard solution of 5.0 μM DA, 5.0 μM UA and 100 μM
19 glucose was evaluated. Three replicate measurements were performed for each interference
20 concentration. The tolerance limit for interfering species, defined as the amount in the standard
21 solution that produced a signal that deviated from the signal produced by the standard solution
22 by more than 5% was determined. For DA and UA, no interference was detected in the presence
23 of: 20,000-fold of urea and sucrose; 10,000-fold of Na⁺, K⁺ and Cl⁻; and 40-fold of ascorbic acid.
24 In the case of glucose, no interference was detected in the presence of 1,000-fold of urea and
25 sucrose; 500-fold of Na⁺, K⁺ and Cl⁻; and 2-fold of ascorbic acid. For ascorbic acid, at a
26 concentration higher than 200 μM (2-fold), interference was observed on the cathodic current
27 change of 100 μM glucose. However, this should not affect glucose detection in real plasma
28 samples. Since the concentration of ascorbic acid in normal blood is approximately 50 μM. In
29 addition the analysis of plasma sample will be carried out at a 200 times dilution (with the
30 supporting electrolyte acetate buffer pH 5.00) which will lower the effect of all interferences (see
31 3.3.4). These results suggest that this method can be successfully applied for the simultaneous
32 measurement of DA, UA and glucose in real samples.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

60 **3.3.4 Real sample analysis**

1
2
3
4 The effect of the matrix of the plasma sample was first studied by comparing the
5 calibration plot obtained from standard DA solutions of 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 μM , standard
6 UA solutions of 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 μM and standard glucose solutions of 50, 100, 150, 200
7 and 250 μM to that of the spiked samples. The samples were diluted 200 fold (dilution after
8 spiked) with the supporting electrolyte (acetate buffer at pH 5.00) before detection. The slopes of
9 the standard DA, UA and glucose and those of spiked samples showed no significant difference
10 ($P > 0.05$), thus, there was no matrix effect.

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22 Table 1 shows the results from the dual working electrode sensor compared to those of
23 the standard hexokinase-spectrophotometric method for glucose measurement and uricase
24 method for UA measurement used by the hospital. Using the Wilcoxon Signed-Rank test, these
25 results showed no significant difference ($P > 0.05$) between the two methods. Although DA in
26 real samples were not detectable because of the low concentration of DA in blood (0.01-1 μM)
27 [29], future improvement by different modified materials may allow lower concentration of DA
28 to be measured.

29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40 To confirm the reliability of this sensor, known concentrations of glucose, UA and DA
41 were added to the plasma samples to study the sensor recovery and the results are summarized in
42 Table 1. The system demonstrated good accuracy for glucose, UA and DA detection with
43 satisfactory recoveries from $99.2 \pm 0.4\%$ to $100.1 \pm 1.2\%$, $98.0 \pm 0.5\%$ to $101.0 \pm 1.0\%$ and 97.1
44 $\pm 1.1\%$ to $101.9 \pm 2.3\%$, respectively. These recoveries are acceptable according to AOAC
45 guidelines, i.e., 90-107% for 100 mg.L^{-1} and 80-110% for 10 mg.L^{-1} ($120 \mu\text{M}$ Glucose = 21.62
46 mg.L^{-1} , $6 \mu\text{M}$ UA = 1.01 mg.L^{-1} , $6 \mu\text{M}$ DA = 0.92 mg.L^{-1}) [28].

4. Conclusion

57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A novel electrochemical sensor was developed based on a dual working electrode system and used for the simultaneous detection of DA, UA and glucose using adsorptive stripping voltammetry and chronoamperometry. Under the optimal conditions, this sensor has good linearity, low detection limits and good reproducibility. The preparation of the dual working electrode sensors is relatively simple. This sensor can determine glucose, UA and DA in blood samples with excellent accuracy (99.2 % to 100.1 %, 98.0 % to 101.0 % and 97.1 % to 101.9 %, respectively.), providing an alternative diagnostic tool for medicine. This system may open up a new path for further simultaneous electrochemical sensing.

Acknowledgments

This work was supported by The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Commission of Higher Education. Financial support from Faculty of Science Research Fund, Prince of Songkla University (Contract No. 1-2558-02-002) and partial support from Center of Excellence for Trace Analysis and Biosensor (TAB-CoE), Graduate School and Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand are gratefully acknowledged.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

- [1] R. Wittenberg, L. Sharpin, B. McCormick, J. Hurst, The ageing society and emergency hospital admissions, *Health Policy*, 121 (2017) 923-928.
- [2] L. Syedmoradi, M. Daneshpour, M. Alvandipour, F.A. Gomez, H. Hajghassem, K. Omidfar, Point of care testing: The impact of nanotechnology, *Biosensors and Bioelectronics*, 87 (2017) 373-387.
- [3] S.X.X. Hu, W.I. Lei, K.K. Chao, B.J. Hall, S.F. Chung, Common chronic health problems and life satisfaction among Macau elderly people, *International Journal of Nursing Sciences*, 3 (2016) 367-370.
- [4] L. Jacob, J. Breuer, K. Kostev, Prevalence of chronic diseases among older patients in German general practices, *GMS German Medical Science*, 14 (2016) Doc03.
- [5] T. Unmüssig, A. Weltin, S. Urban, P. Daubinger, G.A. Urban, J. Kieninger, Non-enzymatic glucose sensing based on hierarchical platinum micro-/nanostructures, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 816 (2018) 215-222.
- [6] H. Lee, Y. Lee, A.R. Statz, J. Rho, T.G. Park, P.B. Messersmith, Substrate-Independent Layer-by-Layer Assembly by Using Mussel-Adhesive-Inspired Polymers, *Advanced Materials*, 20 (2008) 1619-1623.
- [7] X. Zhou, P. Ma, A. Wang, C. Yu, T. Qian, S. Wu, J. Shen, Dopamine fluorescent sensors based on polypyrrole/graphene quantum dots core/shell hybrids, *Biosensors & bioelectronics*, 64 (2015) 404-410.
- [8] K. Income, N. Ratnarathorn, N. Khamchaiyo, C. Srisuvo, L. Ruckthong, W. Dungchai, Disposable Nonenzymatic Uric Acid and Creatinine Sensors Using muPAD Coupled with Screen-Printed Reduced Graphene Oxide-Gold Nanocomposites, *International journal of analytical chemistry*, 2019 (2019) 3457247.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- [9] A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, L. Gorton, On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes, *Electrochemistry Communications*, 1 (1999) 78-82.
- [10] S.-M. Chen, Simultaneous Determination of AA, DA, And UA Based on Bipolymers by Electropolymerization of Luminol And 3,4-Ethylenedioxythiophene Monomers, 2011.
- [11] E. Alipour, M.R. Majidi, A. Saadatirad, S.m. Golabi, A.M. Alizadeh, Simultaneous determination of dopamine and uric acid in biological samples on the pretreated pencil graphite electrode, *Electrochimica Acta*, 91 (2013) 36-42.
- [12] F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze, P.G. Zambonin, Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin film, *Biosensors & bioelectronics*, 15 (2000) 531-539.
- [13] M. Amouzadeh Tabrizi, M. Shamsipur, R. Saber, S. Sarkar, Simultaneous determination of CYC and VEGF 165 tumor markers based on immobilization of flavin adenine dinucleotide and thionine as probes on reduced graphene oxide-poly(amidoamine)/gold nanocomposite modified dual working screen-printed electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 240 (2017) 1174-1181.
- [14] R. Cui, X. Wang, G. Zhang, C. Wang, Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using helical carbon nanotubes modified electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 161 (2012) 1139-1143.
- [15] D. Zheng, J. Ye, L. Zhou, Y. Zhang, C. Yu, Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid on ordered mesoporous carbon/Nafion composite film, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 625 (2009) 82-87.
- [16] M.Z.H. Khan, Graphene Oxide Modified Electrodes for Dopamine Sensing, *Journal of Nanomaterials*, 2017 (2017) 11.
- [17] Y. Zeng, Y. Zhou, L. Kong, T. Zhou, G. Shi, A novel composite of SiO₂-coated graphene oxide and molecularly imprinted polymers for electrochemical sensing dopamine, *Biosensors & bioelectronics*, 45 (2013) 25-33.
- [18] L. Yu, P. Li, X. Ding, Q. Zhang, Graphene oxide and carboxylated graphene oxide: Viable two-dimensional nanolabels for lateral flow immunoassays, *Talanta*, 165 (2017) 167-175.
- [19] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chem Soc Rev*, 39 (2010) 228-240.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- [20] D.A.C. Brownson, G.C. Smith, C.E. Banks, Graphene oxide electrochemistry: the electrochemistry of graphene oxide modified electrodes reveals coverage dependent beneficial electrocatalysis, *Royal Society Open Science*, 4 (2017) 171128.
- [21] D. Jiang, Z. Chu, J. Peng, W. Jin, Screen-printed biosensor chips with Prussian blue nanocubes for the detection of physiological analytes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228 (2016) 679-687.
- [22] N. Chandra Sekar, S.A. Mousavi Shaegh, S.H. Ng, L. Ge, S.N. Tan, A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204 (2014) 414-420.
- [23] A. Fatoni, A. Numnuam, P. Kanatharana, W. Limbut, C. Thammakhet, P. Thavarungkul, A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185 (2013) 725-734.
- [24] C. Fenglian, T. Cheng-an, L. Yujiao, Y. Wenchang, W. Xueye, W. Jianfang, Effects of amount of graphene oxide and the times of LightScribe on the performance of all-solid-state flexible graphene-based micro-supercapacitors, *Materials Research Express*, 4 (2017) 036304.
- [25] Z. Wang, S. Liu, P. Wu, C. Cai, Detection of Glucose Based on Direct Electron Transfer Reaction of Glucose Oxidase Immobilized on Highly Ordered Polyaniline Nanotubes, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 1638-1645.
- [26] D. Agustini, M.F. Bergamini, L.H. Marcolino-Junior, Tear glucose detection combining microfluidic thread based device, amperometric biosensor and microflow injection analysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 98 (2017) 161-167.
- [27] E. Desimoni, B. Brunetti, Data Treatment of Electrochemical Sensors and Biosensors, *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors 2015*, pp. 1137-1151.
- [28] AOAC, Guidelines for Standard Method Performance Requirements, (2016) 1-16.
- [29] J. Zheng, X. Zhou, Sodium dodecyl sulfate-modified carbon paste electrodes for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid, *Bioelectrochemistry*, 70 (2007) 408-415.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table legend

Table 1.

Results from the sensor (n=3) and the conventional methods for glucose, UA and DA detection (N.D.: Not detected, a: Value provided by the hospital (Uricase method for UA measurement, Hexokinase method for glucose measurement), b: Value determined by the dual working electrode system) Recovery of the proposed sensor for the detection of glucose, UA and DA in blood samples (n=3).

Table 1.

Sample Number	Referenced values ^a (mM)			Sensor ^b (mM)			Sensor recovery								
	Glucose	UA	DA	Glucose	UA	DA	Spike glucose/ μ M			Spike UA/ μ M			Spike DA/ μ M		
							24	60	120	0.6	2.4	6.0	0.6	2.4	6.0
1	19.43	0.321	-	20.17 \pm 0.21	0.330 \pm 0.008	N.D.	99.9 \pm 0.6	99.4 \pm 0.5	99.2 \pm 0.2	99.0 \pm 0.4	99.2 \pm 0.8	99.5 \pm 1.1	101.4 \pm 1.1	98.3 \pm 2.8	101.1 \pm 1.5
2	10.05	0.428	-	10.15 \pm 0.26	0.423 \pm 0.019	N.D.	99.6 \pm 0.5	99.7 \pm 1.1	99.5 \pm 0.5	99.6 \pm 0.7	100.7 \pm 0.7	100.0 \pm 1.0	100.8 \pm 2.7	99.9 \pm 3.4	99.1 \pm 1.1
3	17.04	0.327	-	17.88 \pm 0.94	0.336 \pm 0.044	N.D.	99.7 \pm 0.9	99.7 \pm 0.4	100.1 \pm 1.0	100.2 \pm 1.3	100.4 \pm 0.8	99.9 \pm 0.7	97.1 \pm 1.1	101.9 \pm 2.3	98.5 \pm 0.9
4	9.55	0.482	-	9.97 \pm 0.18	0.483 \pm 0.066	N.D.	99.8 \pm 0.9	99.9 \pm 0.8	99.7 \pm 0.9	98.9 \pm 0.4	98.5 \pm 0.7	98.8 \pm 0.4	99.4 \pm 2.6	99.4 \pm 2.0	101.2 \pm 4.6
5	9.16	0.434	-	9.23 \pm 0.48	0.438 \pm 0.024	N.D.	99.7 \pm 0.5	100.0 \pm 1.2	100.0 \pm 0.9	99.5 \pm 0.6	98.3 \pm 1.7	99.1 \pm 1.7	100.2 \pm 4.7	100.6 \pm 3.4	98.1 \pm 1.3
6	8.38	0.291	-	8.26 \pm 0.05	0.287 \pm 0.006	N.D.	100.1 \pm 1.2	99.8 \pm 0.5	99.9 \pm 0.1	99.1 \pm 0.9	99.9 \pm 1.2	98.6 \pm 0.9	99.0 \pm 0.6	100.9 \pm 2.0	100.8 \pm 0.5
7	6.99	0.416	-	6.91 \pm 0.18	0.418 \pm 0.013	N.D.	99.5 \pm 0.7	99.8 \pm 0.9	99.8 \pm 0.4	100.6 \pm 0.4	101.0 \pm 1.0	99.6 \pm 1.6	97.8 \pm 3.6	99.2 \pm 1.3	101.0 \pm 3.0
8	6.94	0.369	-	6.96 \pm 0.06	0.374 \pm 0.010	N.D.	99.7 \pm 0.4	100.1 \pm 0.9	99.4 \pm 0.3	98.7 \pm 1.3	99.5 \pm 0.8	99.2 \pm 1.5	99.1 \pm 2.0	102.2 \pm 3.6	101.8 \pm 2.1
9	9.33	0.280	-	9.45 \pm 0.26	0.284 \pm 0.002	N.D.	99.2 \pm 0.4	99.4 \pm 0.3	99.7 \pm 0.5	98.0 \pm 0.5	100.4 \pm 0.6	98.2 \pm 1.6	98.3 \pm 2.8	101.8 \pm 4.0	99.8 \pm 2.6
10	7.60	0.404	-	8.00 \pm 0.23	0.405 \pm 0.005	N.D.	99.4 \pm 0.3	100.1 \pm 0.4	100.1 \pm 0.4	98.5 \pm 1.4	100.1 \pm 0.8	98.9 \pm 0.5	97.3 \pm 2.7	100.7 \pm 0.9	97.2 \pm 2.3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure captions:

Fig. 1. A lab built simultaneous electrochemical sensor system with dual working electrode (A) and the scheme of the GO/GCE (WE1) and Chi/GOx/PB-G/GCE (WE2) preparation (B). Inset shows the adsorptive anodic stripping voltammogram of dopamine (DA) and uric acid (UA) on the GO/GCE (a.) the chronoamperogram of glucose on Chi/GOx/PB-G/GCE in the presence of dopamine, uric acid and glucose at different concentrations.

Fig. 2. SEM images of WE1; (a) GCE, (b) GO-modified GCE (inset at 30,000x magnification) and WE2; (c) GCE, (d) PB-G modified GCE, (e) chitosan cryogel modified on a PB-G layer and (f) chitosan cryogel with immobilized GOx.

Fig. 3. Electrochemical behavior (a) CVs of the GCE and GO/GCE in a 0.10 M KCl solution containing 5.0 mM of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. (b) CVs of the GCE and GO/GCE 0.10 M acetate buffer solution at pH 5.00 containing 0.10 M KCl with 100 μM UA and 100 μM . (c) CVs of PB/GCE (i), Chi/PB-G/GCE (ii), GOx/Chi/PB-G/GCE (iii) and GOx/Chi/PB-G/GCE with 1.0 mM glucose (iv) in a 0.10 M acetate buffer solution at pH 5.00 containing 0.10 M KCl. (d) Chronoamperogram response of the GOx/Chi/PB-G/GCE after adding with various concentration of glucose (100 to 500 μM) in 0.10 M acetate buffer solution at pH 5.00 containing 0.10 M KCl.

Fig. 4. Optimization of electrode conditions (n=3): WE1 (a) the amount of GO on the GCE and (b) the accumulation potential. (c) the accumulation time. WE2 (d) the amount of PB-G on the GCE. (e) the amount of GOx loading. (f) Effect of the applied potential (NR: no response).

Fig. 5. (a) Responses of the sensor in the presence of 0.1 – 80 μM DA, 0.2 – 30 μM UA and 15 – 1,500 μM glucose. (b) Calibration curve of concentration of DA in the range from 0.1 to 80 μM

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(n=3). (c) Calibration curve of concentration of UA in the range from 0.2 to 30 μM (n=3). (d)

Calibration curve of concentration of glucose in the range from 15 to 1,500 μM (n=3).

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

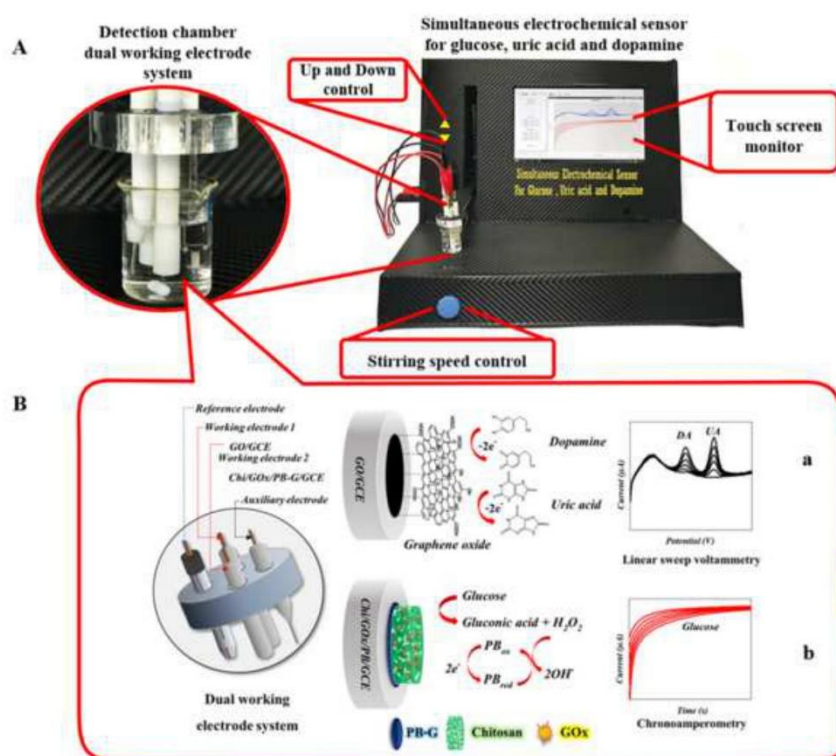


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

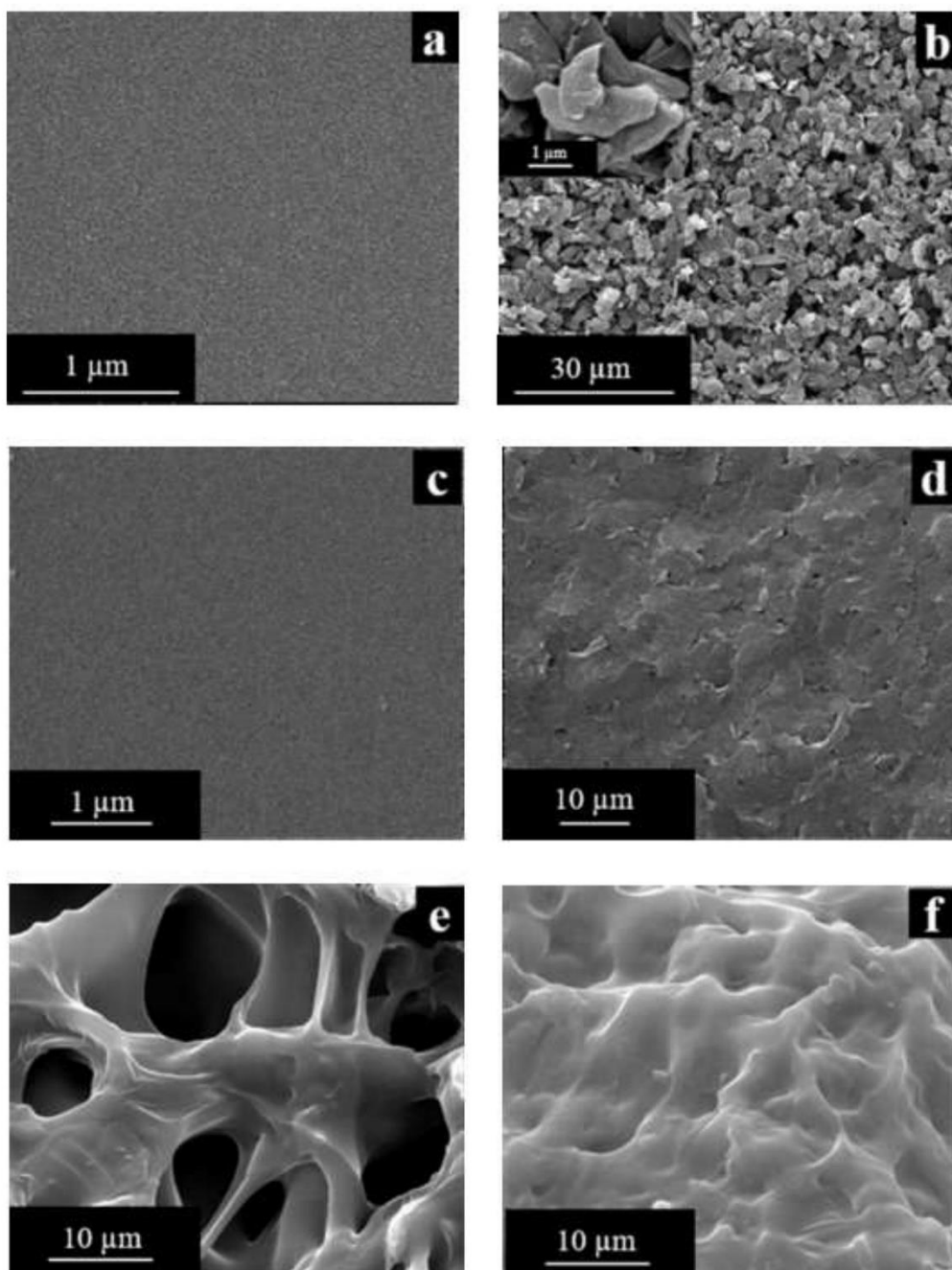


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

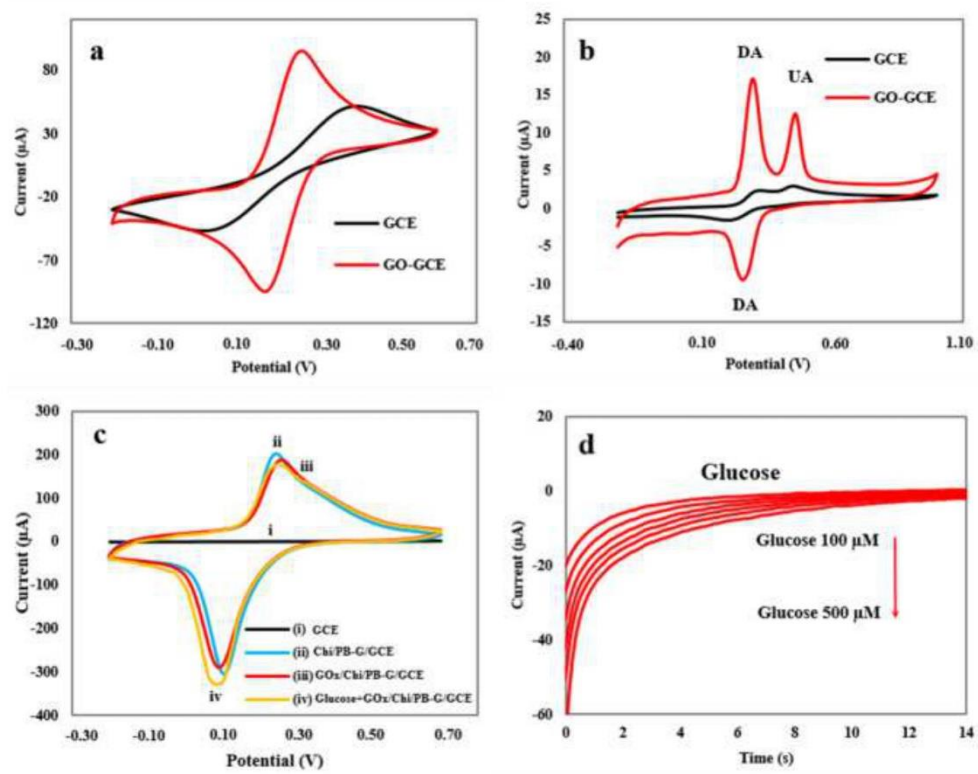


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

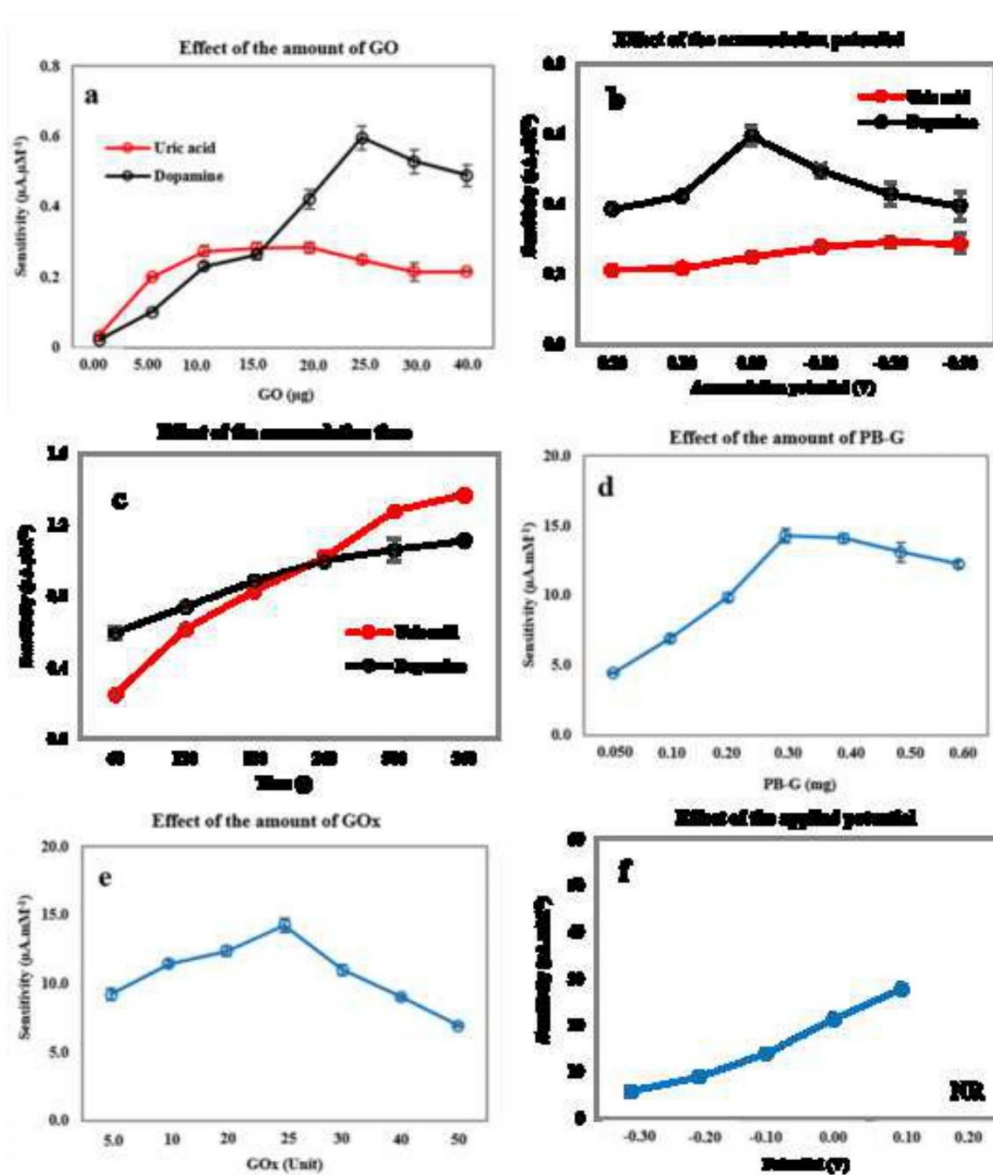
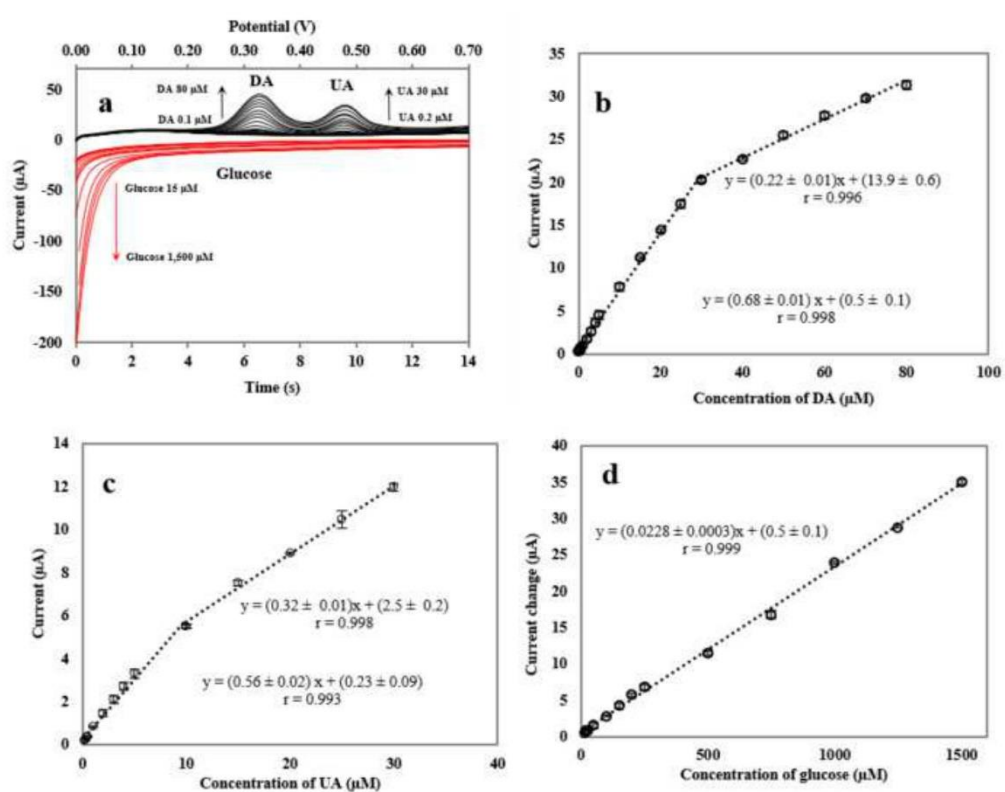


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)



Supplementary Materials

[Click here to download Supplementary Materials: Appendix. Supporting-information. Limbut et al. 2019.docx](#)

Supporting information file

Novel electrochemical sensor using a dual working electrode system for simultaneous determination of glucose, uric acid and dopamine

Asamee Soleh^{a,b,c}, Proespichaya Kanatharana^{b,c}, Panote Thavarungkul^{a,b,d},

Warakorn Limbut^{a,b,e*}

^aCenter of Excellence for Trace Analysis and Biosensor, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^bCenter of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^dDepartment of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

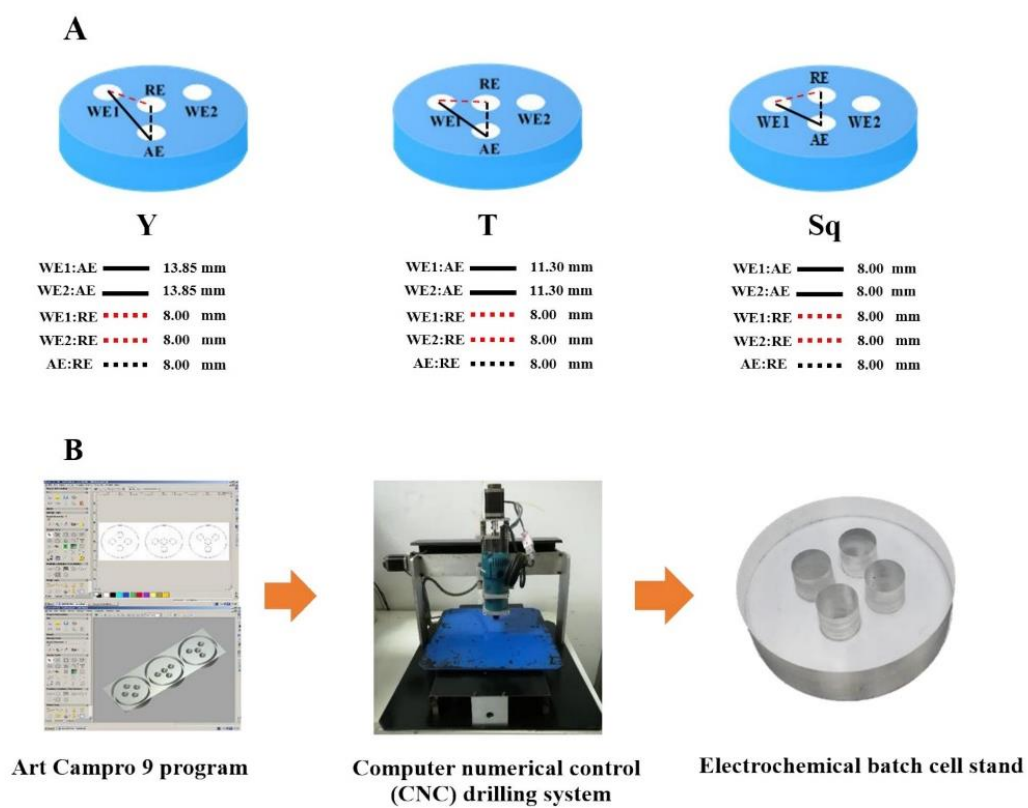
^eDepartment of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

** Corresponding author: Department of Applied Science, Faculty of Science,*

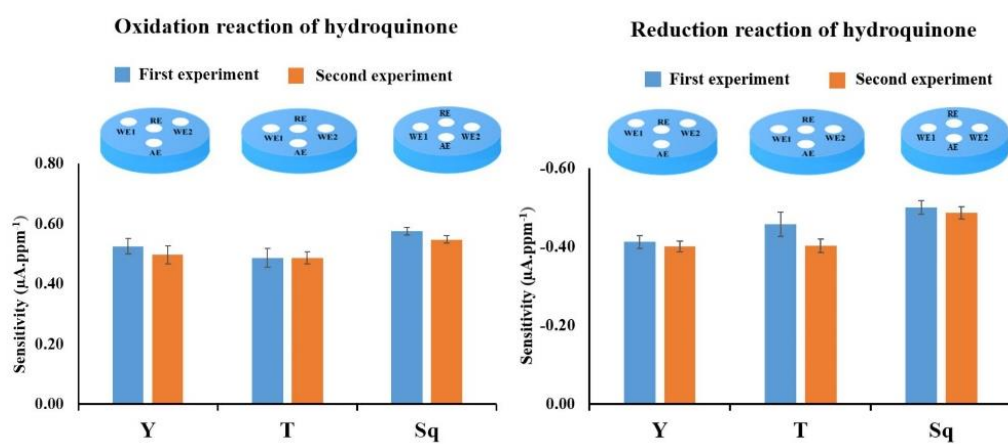
Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112,

Thailand. Tel.: +66 74 288563; Fax: +66 74 446681

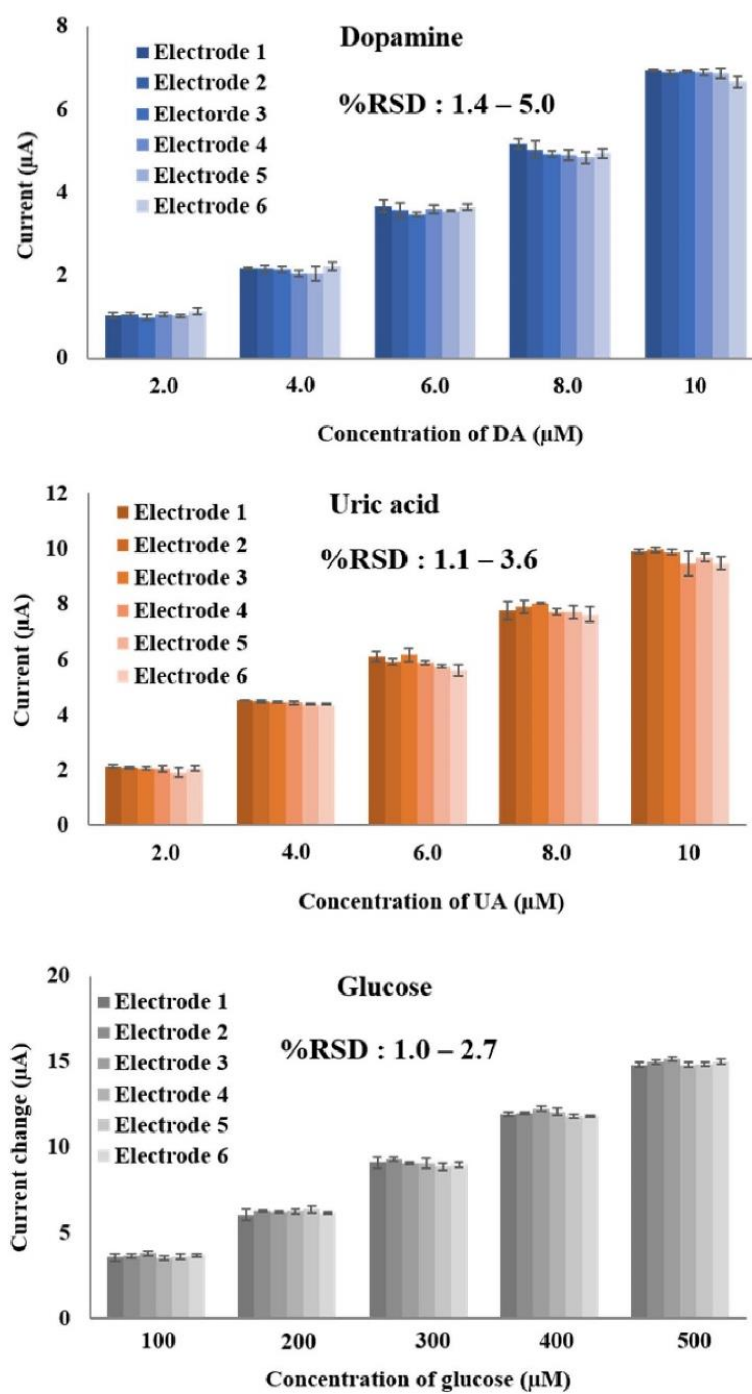
E-mail addresses: warakorn.l@psu.ac.th (W. Limbut)



Supplementary Fig. S1 (A) Configuration of the three electrode stand configurations, i.e., Y, T and Sq (square). (B) Process for fabrication of the electrode stand.



Supplementary Fig. S2 The sensitivities of hydroquinone oxidation and reduction (10, 20, 30, 40 and 50 ppm) of the Y, T and Sq (square) electrodes configurations for the dual working electrode system.



Supplementary Fig. S3. The reproducibility of GO/GCE and Chi/GOx/PB-G/GCE for simultaneous determination of DA UA and glucose.

Supplementary Table 1. Tolerance limit of possible interfering species for simultaneous determination of DA, UA and glucose.

Interferences species	Tolerance ratio		
	Dopamine: interference	Uric acid : interference	glucose : interference
Glucose	1:5,000	1:5,000	-
Uric acid	1:300	-	1:300
Dopamine	-	1:400	1:100
Urea	1:20,000	1:20,000	1:1,000
Sucrose	1:20,000	1:20,000	1:1,000
K⁺	1:10,000	1:10,000	1:500
Na⁺	1:10,000	1:10,000	1:500
Cl⁻	1:10,000	1:10,000	1:500
Ascorbic acid	1:40	1:40	1: 2

Patent I

“Process of simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine”

Limbut, W., Soleh, A., Kanatharana, P., Thavarungkul, P.

Patent Pending

ใบตอบแบบท้าย _____

5. ตัวแทน

ชื่อ นายจิตติยุทธ เข็มขยกุล หมายเลขตัวแทน 2266

ที่อยู่ อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110 ประเทศไทย

อีเมล jittiyut.y@gmail.com

เลขประจำตัวประชาชน 3 9599 00384 18 7

6. ผู้ประติษฐาน/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์

2. นางสาวเพริศพิชญ์ คุณาธารณา หมายเลขบัตรประชาชน 3 1002 00250 37 3

ที่อยู่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

3. นางสาวปณิต ถาวรังกูร หมายเลขบัตรประชาชน 3 1014 01033 66 4

ที่อยู่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

4. นายฮัสมี สอและ หมายเลขบัตรประชาชน 1 9105 00104 35 2

ที่อยู่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

Patent II

“Glucose, uric acid and dopamine sensor”

Limbut, W., Soleh, A., Kanatharana, P., Thavarungkul, P.

Patent Pending



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทร.9337

ที่ มอ 164.3/310

วันที่ 26 มิถุนายน 2561

เรื่อง แจ้งยืนยันการขอรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา ในผลงานการประดิษฐ์

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรากร ลิ้มบุตร

ตามที่ท่าน ได้ประดิษฐ์ผลงานวิจัยภายใต้ชื่อ เครื่องตรวจวัดกลูโคส กรดยูริกและโดพามีน และมีความประสงค์ยื่นขอรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา มายังศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งขณะนี้ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญาได้รับเรื่องดังกล่าวแล้วและพิจารณาแล้วเห็นว่ามีศักยภาพในการขอรับความคุ้มครองได้ นั้น

ในการนี้ ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญาฯ จึงขอแจ้งผลการดำเนินงานขอรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาผลงานดังกล่าวข้างต้น อยู่ระหว่างการดำเนินการตรวจสอบโดยนักทรัพย์สินทางปัญญา ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญาฯ พร้อมการจัดเตรียมเอกสารเพื่อขอรับความคุ้มครองไปยังกรมทรัพย์สินทางปัญญาตามขั้นตอน และหลังจากได้รับหมายเลขคำขอจะดำเนินการแจ้งท่านในลำดับต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(นายจิตติยุทธ์ เยี่ยมมงคล)

ผู้จัดการศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

โทร 0-7428-9337

อีเมลล์ weerayut.sr@psu.ac.th

Patent III

“Device for simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine”

Limbut, W., Soleh, A., Kanatharana, P., Thavarungkul, P.

Patent Pending



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทร.9337

ที่ มอ 164.3/309

วันที่ 26 มิถุนายน 2561

เรื่อง แจ้งยืนยันการขอรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา ในผลงานการประดิษฐ์

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรากร ลิ้มบุตร

ตามที่ท่าน ได้ประดิษฐ์ผลงานวิจัยภายใต้ชื่อ อุปกรณ์ตรวจวัดกลูโคส กรดยูริก และโดพามีน แบบพร้อมกัน และมีความประสงค์ยื่นขอรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา มายังศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งขณะนี้ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญาได้รับเรื่องดังกล่าวแล้ว และพิจารณาแล้วเห็นว่ามีความสำคัญภาพในการขอรับความคุ้มครองได้ นั้น

ในการนี้ ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา จึงขอแจ้งผลการดำเนินงานขอรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาผลงานดังกล่าวข้างต้น อยู่ระหว่างการดำเนินการตรวจสอบโดยนักทรัพย์สินทางปัญญา ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา พร้อมการจัดเตรียมเอกสารเพื่อขอรับความคุ้มครองไปยังกรมทรัพย์สินทางปัญญา ตามขั้นตอน และหลังจากได้รับหมายเลขคำขอจะดำเนินการแจ้งท่านในลำดับต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(นายจิตติยุทธ์ เยี่ยมยกกุล)

ผู้จัดการศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

โทร 0-7428-9337

อีเมลล์ weerayut.sr@psu.ac.th

Patent IV

“Single drop device for simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine”

Limbut, W., Soleh, A., Kanatharana, P., Thavarungkul, P.

Patent Pending



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทร.9338

ที่ มอ 164.3/153

วันที่ 30 เมษายน 2562

เรื่อง แจ้งยืนยันการขอรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา ในผลงานการประดิษฐ์

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรากร ลิ้มบุตร

ตามที่ท่าน ได้ประดิษฐ์ผลงานภายใต้ชื่อ เครื่องตรวจวัดแบบหยด สำหรับกลูโคส กรดยูริก และโดพามีนพร้อมกัน และได้ยื่นขอรับความคุ้มครองสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์ มายังศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา ซึ่งขณะนี้ผลงานดังกล่าวอยู่ระหว่างการดำเนินการตรวจสอบ และเตรียมคำขอรับความคุ้มครอง โดยศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นั้น

ในการนี้ ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา จึงขอรับรองว่าผลงานดังกล่าวได้มีการยื่นคำขอรับความคุ้มครองสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์จริง ภายใต้ชื่อการประดิษฐ์ “เครื่องตรวจวัดแบบหยด สำหรับกลูโคส กรดยูริก และโดพามีนพร้อมกัน” และกำลังอยู่ระหว่างการดำเนินการตามขั้นตอนการพิจารณาของศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญา

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

วรากร วันบุ

(นางสาวเสาวรส วันบุ)

เจ้าหน้าที่บริหารทรัพย์สินทางปัญญา

อุทยานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

VITAE

Name Mr. Asamee Soleh

Student ID 5910220079

Education Attainment

Degree	Name of Institute	Year of Graduation
Bachelor of Science (Chemistry-Biology)	Prince of Songkla University	2016

Scholarship Awards during Enrolment

1. Financial support from Faculty of Science Research Fund, Prince of Songkla University Contract no 1-2558-02-002.
2. Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Commission of Higher Education.
3. PSU Graduate School Financial support for Thesis.

List of Publication

Soleh, A., Kooni-art, P., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Limbut, W. Electrochemical sensor for hydroxylamine detection based on palladium nanoparticle –glassy carbon spherical (PdNPs-GCS) modified on glassy carbon electrode. 1st National Graduation Research Conference and Creative Innovation Competition. 17-18 August, 2017, Chiang Mai, Thailand.

Soleh, A., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Limbuta, W. “Novel electrochemical sensor using a dual working electrode system for simultaneous determination of glucose, uric acid and dopamine” Submitted manuscript.

Poster Presentations

Soleh, A., Kooni-art, P., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Limbut, W. Electrochemical sensor for hydroxylamine detection based on palladium

nanoparticle –glassy carbon spherical (PdNPs-GCS) modified on glassy carbon electrode. 1st National Graduation Research Conference and Creative Innovation Competition. 17-18 August, 2017, Chiang Mai, Thailand.

Soleh, A., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Limbut, W. Simultaneous electrochemical detection of glucose, uric acid and dopamine using dual working electrode system. PERCH-CIC Congress X: 2018 International Congress for Innovation in Chemistry. 4-7 July, 2018, Pattaya, Chonburi, Thailand.

List of Patent

Limbut, W., **Soleh, A.,** Kanatharana, P., Thavarungkul, P. “Process of simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine” (Patent Pending).

Limbut, W., **Soleh, A.,** Kanatharana, P., Thavarungkul, P. “Glucose, uric acid and dopamine sensor” (*Patent Pending*).

Limbut, W., **Soleh, A.,** Kanatharana, P., Thavarungkul, P. “Device for simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine” (*Patent Pending*).

Limbut, W., **Soleh, A.,** Kanatharana, P., Thavarungkul, P. “Single drop device for simultaneous detection of glucose, uric acid and dopamine” (*Patent Pending*).