รายงานฉบับสมบูรณ์

อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับอัลฟาฟีโตโปรตีน

IMMUNOSENSOR FOR ALPHA-FETOPROTEIN (AFP)

รศ.ดร. สุวรรณ ไชยสิทธิ์

Assoc. Prof.Dr. Suwan Chaiyasith

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินหรือรายได้ ประจำปี

งบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานฉบับสมบูรณ์

อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับอัลฟาฟีโตโปรตีน

IMMUNOSENSOR FOR ALPHA-FETOPROTEIN (AFP)

รศ.ดร. สุวรรณ ไชยสิทธิ์

Assoc. Prof.Dr. Suwan Chaiyasith

RCH
R
854
.854
ส869อ
ฉ.2

ตชหมู่.....
เลขทะเบียน 115496
วัน,เดือน,ปี 15 มี.ค. 2554

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินหรือรายได้ ประจำปี

งบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.12311935
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับอัลฟาฟีโตโปรตีน

ชื่อโครงการ(ภาษาอังกฤษ) IMMUNOSENSOR FOR ALPHA-FETOPROTEIN (AFP)

แหล่งเงิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2552 ถึง กันยายน 2553

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัดและ อีเมล์

รศ.ดร. สุวรรณ ไชยสิทธิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำสำคัญ (Keywords) sensor, immunosensor, Alpha-fetoprotein, voltammetry

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด (Screen-Printed Electrode) เป็นหัววัดอิมมูโนเซนเซอร์โดยใช้เทคนิคโพเทนชิออเมตรี (Potentiometric immunosensor) เพื่อความรวดเร็วในการวัด Alpha -fetoprotein (AFP) ในซีรัมมนุษย์ อิมมูโนเซนเซอร์ถูกเตรียมขึ้นโดยการตรึงแอนติบอดีกับไบโอตินซึ่งเคลือบบนขั้วสกรีน-ปริ้นท์ และทำการดัดแปรด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยสารดังกล่าวเป็นสารไบฟังก์ชันนอล ทำหน้าที่เชื่อมไขว้ทางไบโอเซนเซอร์ โดยปลายทั้งสองของกลูตารัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของอัลฟ่าฟีโตโปรตีน เกิดเป็นชั้นฟิล์มบนขั้วอิมมูโนเซนเซอร์ แล้วทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวัด AFP โดยสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรดที่สร้างขึ้น เปรียบเทียบกับเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ตลอดจนสามารถตรวจวิเคราะห์หาระดับสาร AFP ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจริง เพื่อคัดกรอง วินิจฉัย และติดตามผลการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง

Abstract

This research focused on potentiometric immunosensor for the determination of human Alpha – fetoprotein (AFP) by screen-printed electrode (SPCE). The effective immobilization of the antibody comes from the entrapment by biotin on screen-printed carbon electrode and then modified by bifunctional glutaradehyde. As well as the amines of antibody will be cross-linked by glutaradehyde and became compact film. Optimization condition for potentiometric detection of AFP were studied comparison with electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA). Thus , the developed immunoassay may provide a feasible alternative tool for determining AFP in human serum in clinical laboratory.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้การสนับสนุน และอนุเคราะห์สารเคมีในการวิจัย

รศ.ดร. สุวรรณ ไชยสิทธิ์
หัวหน้าโครงงานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....I
กิตติกรรมประกาศ.....II
สารบัญ.....III
อักษรย่อที่ใช้ในงานวิจัยเล่มนี้.....IV
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....4
2.1หลักการของเทคนิคโพเทนชิออเมทรี.....4
2.1.1 กลไกการเกิดศักย์ไฟฟ้าที่ขั้ว.....5
2.2 ไบเซนเซอร์และอิมมูโนเซนเซอร์.....6
2.2.1 ไบโอเซนเซอร์ (biosensor).....6
2.2.2 อิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor).....7
2.2.3 การตรึงสารแอนติบอดีบนทรานส์ดิวเซอร์.....9
2.2.4 เซนเซอร์ที่อาศัยการวัดแบบโพเทนทิโอเมตริก.....9
2.3 สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด screen-printed carbon electrode (SPCE).....10
2.4 อัลฟาฟีโทโปรตีน.....11
2.4.1 องค์ประกอบทางเคมีแอลฟาฟีโตโปรตีน.....13
2.4.2 แอนติบอดี (Ab).....13
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....14
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....16
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....16
3.1.1 อุปกรณ์.....16
3.1.2 สารเคมี.....16
3.2 การเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด.....17
3.2.1 การสร้างขั้วไฟฟ้าสกรีน-ปริ้นท์.....17
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพขั้วไฟฟ้า.....18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง....18
3.4.1 การเตรียมสกิน-ปริ้น อิเล็กโทรด ที่ตรึงด้วย AFP....18
3.4.2 การหาสภาวะทางเคมีไฟฟ้าของขั้วที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP....19
3.4.2.1 การหา pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์....19
3.4.2.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์....20
3.4.2.3 การศึกษาอัตราเร็วในการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม....19
3.4.3 การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP....19
3.4.3.1 การศึกษาสภาพไวของขั้ว (sensitivity) 19
3.4.3.2 การศึกษาความเที่ยง....20
3.4.3.3 การศึกษาขีดจำกัดในการวิเคราะห์....20
3.4.3.4 การหาอายุการใช้งานของขั้ว....20
3.4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP....20
3.4.3.5.1 การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์....20
3.4.3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่าง....21
3.4.3.5.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP....21

บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล....22
4.1 การสร้างสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด โดยการตรึงสาร anti-AFP และ ปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde....22
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP....23
4.2.1 ค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด AFP....23
4.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์....24
4.2.3 อัตราเร็วที่เหมาะสมในการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า....25
4.3 การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP....26
4.3.1 การศึกษาสภาพไวของขั้ว....26
4.3.2 การศึกษาความเที่ยง....27
4.3.3 การศึกษาขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP....28
4.3.4 อายุการใช้งานของขั้ว....29
4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่าง ด้วยเทคนิค....29
4.3.6 โพเทนซิออเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์....29

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ....31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 สรุปผลการวิจัย.....31
5.2 ข้อเสนอแนะ.....32

เอกสารอ้างอิง.....33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อที่ใช้ในงานวิจัยเล่มนี้

Ab	Antibody
AFP	Alpha fetoprotein (AFP) (Tumor markers)
Ag	Antigen
CA	Cancer antigen (Tumor markers)
CEA	Carcinoembryonic antigen (Tumor markers)
CV	Cyclic voltammograme
ECLIA	Electrochemiluminescence immunoassay
EIS	Electrochemical impedance spectroscopy
ELISA	Enzyme-linked impedance assay
IRMA	Immunoradiometric assay
MA	Immunoassay
Min	Minute
PBS	Phosphate buffer solution
PSA	Prostate – specific antigen (Tumor markers)
%RSD	Percent of Relative Standard Delviation
SPCE	Screen – printed carbon electrode
SD	Standard delviation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ตับเป็นอวัยวะที่มะเร็งจากอวัยวะต่างๆ แพร่กระจายมามากที่สุดเนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีเลือดมาเลี้ยงมาก และลักษณะของโพรงเส้นเลือดในตับ (hepatic sinusoid) ที่มีช่อง (fenestration) ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถผ่านเข้าไปในเนื้อตับได้ง่าย มะเร็งแพร่กระจายมาที่ตับพบได้ประมาณร้อยละ 40-50 ของเนื้องอกของตับ [1][4]. มะเร็งแพร่กระจายมาที่ตับที่ได้บ่อยคือ มะเร็งของอวัยวะในช่องท้องที่เลือดระบายผ่านเส้นเลือดดำพอร์ตัล (portal vein) เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ ตับอ่อนและกระเพาะอาหาร ส่วนที่เหลือมาจากอวัยวะอื่นเช่น มะเร็งปอด เต้านมและผิวหนัง (melanoma) เป็นต้น [2-3]. มะเร็งเซลล์ตับ (Hepatocellular carcinoma ; HCC) เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงของเซลล์ตับ พบได้บ่อยและพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะจีน ญี่ปุ่น เกาหลีและประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบว่าเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดของมะเร็งในเพศชายและเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดของมะเร็งอวัยวะระบบทางเดินอาหาร พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงประมาณ 4.5 เท่า อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยประมาณ 48 ปี สารบ่งชี้มะเร็ง (Tumor markers) คือตัวบ่งชี้ ทางชีวเคมีที่จะบอกว่ามีมะเร็งหรือไม่ อาจเป็นสารที่ไม่พบในภาวะปรกติ หรือเป็นสารปรกติในร่างกายเราแต่มีปริมาณเพิ่มสูงมากผิดไปจากปรกติ สามารถตรวจพบได้ทั้งในเลือด หรือสารคัดหลั่ง (biological fluid) มี 2 ประเภท คือ สารที่ไม่พบในภาวะปกติ และเป็นสารที่ผลิตมาจากเซลล์มะเร็งโดยตรง เช่น CEA , AFP, PSA, CA 19-9 เป็นต้น และสารที่มีอยู่แล้วในร่างกายซึ่งผลิตโดยเซลล์ปกติ แต่กลับเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อเซลล์นั้นกลายเป็นเซลล์มะเร็ง สารดังกล่าวได้แก่ฮอร์โมนต่างๆเช่น HCG, Calcitonin, ACTH เป็นต้น หรือเอนไซม์เช่น PAP, ALP, LDH, GGT เป็นต้น ประโยชน์ของการตรวจหา Tumor marker ได้แก่ ช่วยในการวินิจฉัย ช่วยในการวางแผนการรักษา และ ช่วยบอกว่ามะเร็งหมด และมีการกลับมาเป็นใหม่หรือไม่หลังรักษาแล้ว

Alpha fetoprotein (AFP) เป็น fetal serum protein ตรวจพบในปี 1956 เป็น glycoprotein หลัก ในซีรั่มของทารกในครรภ์ มีขนาด 720 Kd ถูกสังเคราะห์จาก yolk sac /Liver/ ทางเดินอาหาร แล้วผ่านเข้าสู่น้ำคร่ำโดยผ่านทางเลือดของทารก ข้าม placental barrier เข้าสู่เลือดของมารดา ดังนั้นจึงทำให้ซีรั่มของสตรีมีครรภ์มีค่า AFP สูงขึ้นบ้างและจะแปรผันตามอายุครรภ์ด้วย AFP มิได้มีความจำเพาะต่ออวัยวะใดอวัยวะหนึ่งเพียงอย่างเดียว แต่จะพบค่าขึ้นสูงมากและพบได้บ่อยใน มะเร็งของตับ (hepatocellular carcinoma / hepatoma) ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยประมาณ 70% และพบได้บ้างแต่ค่าไม่สูงมากนักใน มะเร็งรังไข่/อัณฑะ มะเร็งปอด มะเร็งทางเดินอาหารและโรคตับอื่นๆ เป็นต้น [2] AFP ในปัจจุบันใช้เป็น tumor markers ในการตรวจกรองตรวจหาผู้ป่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะเร็งตับ (hepatoma)ในระยะเริ่มแรกก่อนที่จะมีอาการทางคลีนิค ใช้ตรวจในประชากรที่มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับสูง เช่น ผู้ที่เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบ บี / ตับอักเสบเรื้อรัง / ตับแข็ง โดยควรมีการตรวจซ้ำทุก 3-6 เดือน ต่อครั้ง และ ระดับ AFP ที่ใช้ในการวินิจฉัย มะเร็งเซลล์ตับ คือ >500 นก./มล. เนื่องจากระดับที่ต่ำกว่านี้สามารถพบได้ในโรคอื่นได้เช่น ไวรัสตับอักเสบเฉียบพลัน ไวรัสตับอักเสบเรื้อรังและตับแข็งจากสาเหตุต่างๆ แต่ในมะเร็งเซลล์ตับขนาดเล็กโดยเฉพาะเล็กว่า 5 ซม. ระดับ AFP จะสูงไม่มาก ความไวของ AFP ในการวินิจฉัยมะเร็งเซลล์ตับประมาณร้อยละ 75 และมีความจำเพาะประมาณร้อยละ 90 [1] วิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในปัจจุบันเป็นเทคนิคทาง Immunoassay โดยอาจเป็นวิธี RIA / EIA /CICA/ELISA ซึ่งจะมีผลรบกวนผลการทดสอบ ในปฏิกริยา immunoassay ตามทฤษฎีแล้วจะมีความเสี่ยงที่จะเกิดการรบกวนของผลทดสอบได้ ซึ่งมีหลักที่ควรคำนึงถึงคือ High dose Hook Effect และ Heterophile antibodies รวมทั้งความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างเลือด และสารละลายในการวิเคราะห์

จากข้อมูลและเหตุผลดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวัดสารดังกล่าว โดยการประยุกต์สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด(Screen-printed carbon electrode) (SPCE) ซึ่งสามารถเตรียมได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ประกอบกับเป็นวิธีที่มีความไว และจำเพาะเจาะจงสูง จึงเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวิเคราะห์หาระดับสาร AFP ในเลือด เพื่อคัดกรอง และติดตามผลการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เตรียมสกรีน-ปริ้นคาร์บอนอิเล็กโทรด สำหรับการตรวจวัดสาร AFP
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวัด AFP โดยใช้สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด(Screen-printed electrode)
3. ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP จาก สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้น กับการวัดโดยเทคนิค Immunosorbent assay (ELISA)
4. ตรวจวัดหาปริมาณสาร AFP ในตัวอย่างเลือดจริง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมสกรีน-ปริ้นอิเล็กโทรด สำหรับการตรวจวัดสาร AFP
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวัด AFP โดยใช้สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด(Screen-printed electrode)

   ได้แก่

   - การศึกษาสภาวะทางเคมีไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ AFP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti- AFP

3. ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP จาก สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้น กับการวัดโดยเทคนิค immunosorbent assay (ELISA)
4. ตรวจวัดหาปริมาณสาร AFP ในเลือดของผู้ป่วยจริง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสร้าง immunosensor สำหรับตรวจวัด สาร AFP ในเลือด ที่ใช้งานได้ง่าย และมีขนาดเล็ก
2. สามารถตรวจหาสารบ่งชี้มะเร็ง (Tumor markers) ของโรคมะเร็งตับ ในระยะแรกเริ่ม ในเลือดเพื่อ ช่วยวินิจฉัยและติดตามผลของการรักษาได้อย่างรวดเร็วในห้องปฏิบัติการ ทาง Clinic
3. เพิ่มประสิทธิภาพงานวิจัยทางด้านการรักษาโรคมะเร็งตับในหน่วยงานที่เกี่ยวกับบำบัดรักษาโรคมะเร็ง เช่น ศูนย์รักษามะเร็งในโรงพยาบาล ศูนย์วิจัยมะเร็งแห่งชาติ
4. กระตุ้นในเกิดการพัฒนาเทคโนโลยีด้าน immunosensor ทางการแพทย์ โดยการผลิตขึ้นใช้เอง และสามารถพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงงานพิเศษเรื่องนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาทฤษฎีเอกสาร วารสาร รายงาน และบทความวิชาการทั้งในและต่างประเทศ เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยดังหัวข้อดังต่อไปนี้

- หลักการของเทคนิคโพเทนซิออเมทรี
- ไบโอเซนเซอร์และอิมมูโนเซนเซอร์
- สกรีน-ปริ้นท์อิเล็คโทรด screen-printed carbon electrode (SPCE)
- แอลฟาฟีโตโปรตีน alpha-1-fetoprotein (AFP)
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หลักการของเทคนิคโพเทนซิออเมทรี[4]

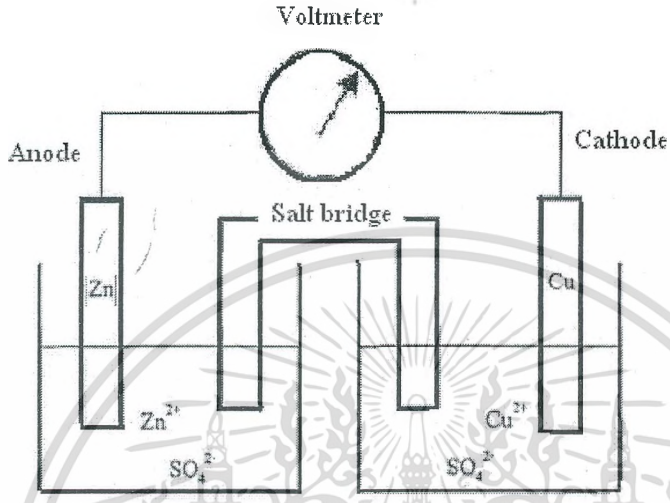
โพเทนซิออเมทรี เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีเชิงไฟฟ้าวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการวัดค่าศักย์ของสารละลายตัวอย่างภายใต้เงื่อนไขที่ไม่มีกระแสไฟฟ้าไหลซึ่งค่าศักย์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เคมีไฟฟ้า เป็นผลที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการปรับตัวเข้าสู่สภาวะสมดุลของปฏิกิริยาเคมีเซลล์เคมีไฟฟ้า ของเทคนิคโพเทนซิออ-เมทรี จัดเป็นเซลล์กัลวานิกซึ่งปฏิกิริยาทางเคมีสามารถเกิดขึ้นได้เองที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า เซลล์เคมีไฟฟ้าประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้าแอโนดซึ่งต่ออยู่กับขั้วลบ และแคโทดซึ่งเป็นขั้วบวก ค่าความต่างศักย์เกิดขึ้นระหว่างขั้วแอโนดและแคโทดเรียกว่า ศักย์อุณหวัตรหรืออาจเรียกว่าศักย์เซลล์ (E_{cell}) ซึ่งในสภาวะมาตรฐานอาจแสดงสมการแสดงค่าศักย์เซลล์ได้ดังนี้

$$E_{cell} = E_{cathode} - E_{anode} + E_j$$

ในสมการจะมีการรวมเทอมของศักย์รอยต่อ (E_j) ไว้ด้วยเพราะการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมทรีอาจมีค่าศักย์รอยต่อเกิดขึ้นร่วมด้วย กรณีที่ปฏิกิริยาทางเคมีไม่ได้เกิดขึ้นที่สภาวะมาตรฐาน เราสามารถคำนวณค่าศักย์เซลล์ที่เกิดขึ้นโดยใช้สมการของเนินสต์ โดยทั่วไปวิธีการวิเคราะห์แบบโพเทนซิออเมทรี ขั้วแคโทดที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นขั้วไฟฟ้าแบบเลือกไอออน (ion-selective electrodes) ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะยอมให้เฉพาะไอออนที่สนใจที่จะวิเคราะห์ผ่านเยื่อ (membrane) เข้าไปได้ทำให้เกิดศักย์เซลล์เคมีไฟฟ้า



รูปที่ 2.1 เซลล์ไฟฟ้าเคมี

2.1.1 กลไกการเกิดศักย์ไฟฟ้าที่ขั้ว

การวัดศักย์โดยตรง เป็นวิธีที่คุ้นเคยและใช้กันมากที่สุด วิธีการสำหรับการวัดศักย์โดยตรงค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากขั้วไฟฟ้าทำงานจะแปรเปลี่ยนไปตามความเข้มข้นของสารละลาย คือเมื่อความเข้มขั้นของสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าศักย์ไฟฟ้าที่อ่านได้มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งอธิบายง่ายๆว่า เมื่อสารละลายมีความเข้มข้นสูง ไอออนในสารละลายย่อมมีจำนวนมาก การส่งผ่านอิเล็กตรอนข้ามผิวหน้าขั้วไฟฟ้าย่อมเกิดขึ้นได้ดี ทำให้วัดศักย์ได้เพิ่มขึ้น ในทางทฤษฎีความสัมพันธ์ของค่าศักย์ไฟฟ้ากับแอคทิวิตีของตัวทำปฏิกิริยา และผลของปฏิกิริยาแสดงด้วยสมการที่เรียกว่า **สมการเนินสต์** ดังนี้

$$E = E^0 - (0.0592/n) \cdot \log(a_{prod} / a_{react})$$

เมื่อ E คือศักย์ขั้วไฟฟ้า

E^0 คือศักย์มาตรฐานของขั้วไฟฟ้า

n คือจำนวนอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องในครึ่งปฏิกิริยา

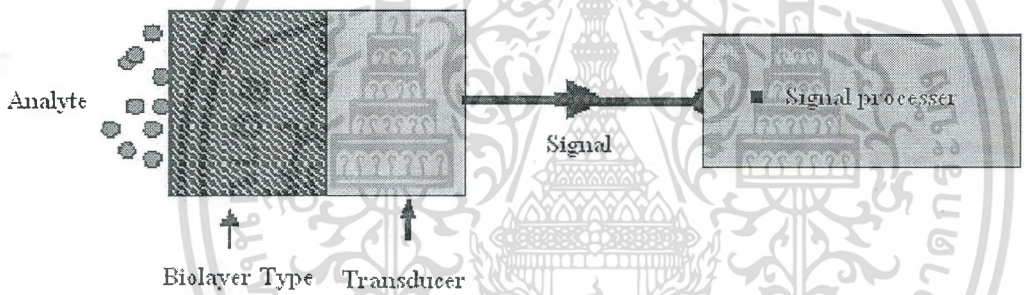
a_{prod} / a_{react} คืออัตราส่วนแอกทิวิตีของผลปฏิกิริยาและตัวทำปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ไบโอเซนเซอร์และอิมมูโนเซนเซอร์ [3]

2.2.1 ไบโอเซนเซอร์(biosensor)

เป็นเซนเซอร์ที่ใช้วัดสารเคมีที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิต หรือสารเคมีที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นมา ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญของเซนเซอร์ได้จากสิ่งมีชีวิต เราจึงเรียกเซนเซอร์แบบนี้ว่า ไบโอเซนเซอร์ เซนเซอร์นี้มีองค์ประกอบสองส่วน คือส่วนแรกเป็นส่วนที่รับรู้ว่ามีสารเคมีที่ต้องการวิเคราะห์ชนิดนั้นๆอยู่เรียกว่า ตัวรับสัญญาณทางชีวภาพ (biological detector) และอีกส่วนหนึ่งคือตัวแปลงสัญญาณ หรือทรานดิวเซอร์ (transducer) ส่วนนี้จะทำหน้าที่เปลี่ยนสัญญาณทางเคมีที่เกิดขึ้นในตัวรับสัญญาณไปเป็นสัญญาณอื่นๆ ที่เราสามารถตรวจวัดได้ เช่น แปลงเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า แปลงเป็นสัญญาณแสง เป็นต้น ตัวแปลงสัญญาณก็จะส่งสัญญาณที่ได้ไปสู่ส่วนประมวลผลต่อไป ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์ (biosensor) เป็นเครื่องมือวัดที่มนุษย์สร้างขึ้นมาโดยอาศัยหลักการทำงานร่วมกันระหว่างส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนของสารชีวภาพและส่วนของทรานส์ดิวเซอร์ (transducer) หรือตัววัดสัญญาณ ในส่วนของสารชีวภาพนั้นจะต้องมีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการวัด ตัวอย่างของสารชีวภาพที่นำมาใช้ในการวัด ได้แก่ เอนไซม์ จุลินทรีย์ เนื้อเยื่อพืชและสัตว์ แอนติเจน แอนติบอดี้ เป็นต้น การทำงานของไบโอเซนเซอร์นั้นจะเริ่มจากการที่สารชีวภาพทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวัด แล้วได้สารผลิตภัณฑ์ที่ถูกแปรเป็นสัญญาณออกมา ทรานส์ดิวเซอร์เป็นอุปกรณ์อิเลคทรอนิกส์ ที่ทำหน้าที่รับและแปลงสัญญาณที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้กลายเป็นกระแสไฟฟ้า ซึ่งสัญญาณไฟฟ้านี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้และถูกนำไปดำเนินการต่อเพื่อแสดงผลออกมา การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ในระยะแรก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการ สร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

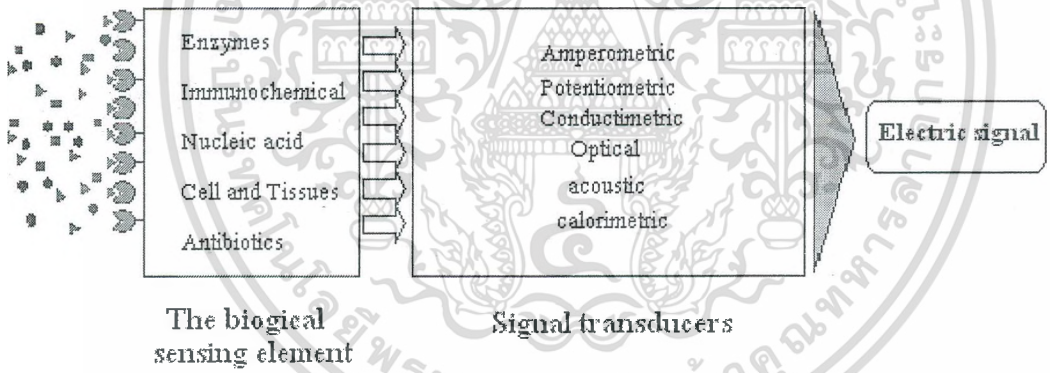
ในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากกลูโคสเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญต่อกลไกภายในร่างกายมนุษย์มาก [5]

2.2.2 อิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor)

Bioreceptor

Enzyme

เอนไซม์มีโครงสร้างเป็นสามมิติ ซึ่งเข้ากันได้กับสารตั้งต้นเฉพาะ เมื่อร่างกายได้รับอาหาร อาหารจะถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็กๆ ในร่างกายด้วย ปฏิกิริยามากมายหลายขั้นตอน ด้วยขบวนการ catabolism แล้วโมเลกุลเล็กๆ เหล่านี้ถูกใช้เพื่อ เป็นโครงสร้างของร่างกาย เช่น โปรตีน ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เหล่านี้คือ ขบวนการ anabolism ขบวนการ catabolism และ anabolism ซึ่งรวมเรียกว่า ขบวนการเมตาบอลิซึมนี้ ต้องอาศัยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงด้วยคุณสมบัติในการจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะนี้ จึงได้มีการนำเอนไซม์มาใช้เป็นไบโอรีเซฟเตอร์ในbiosensor ดังรูป 2.3

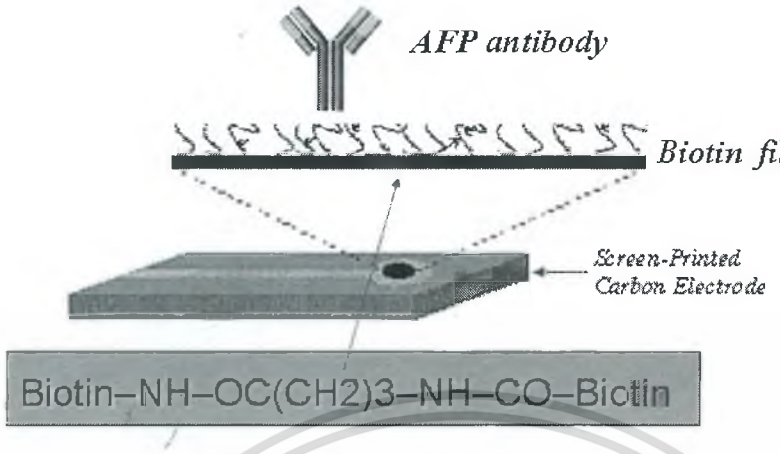


รูปที่ 2.3 แสดงชนิดต่างๆ ของไบโอรีเซฟเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์ในไบโอเซนเซอร์

Antibody

แอนติบอดีเป็นองค์ประกอบประมาณ 20% ของพลาสมาโปรตีนทั้งหมดและถูกเรียกว่า immunoglobulins (Ig) ทำหน้าที่จับกับสารแปลกปลอมและกำจัดออกจากระบบ แอนติบอดีมีบริเวณที่จะจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ แอนติเจนเกือบทั้งหมดเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สามารถชักนำการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน [6].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 Protein Receptor

โปรตีนรีเซฟเตอร์ (รูปที่ 2.4) ทำหน้าที่สำหรับการเปิดและปิดช่องเมมเบรนสำหรับการผ่านเข้าออกของสารเมตาบอไลท์ที่จำเพาะ โปรตีนเหล่านี้ส่วนมากจับอยู่กับเมมเบรน ได้แก่ ตัวรับฮอร์โมน ตัวรับรส ตัวรับกลิ่น (olfactory receptor for smelling) ตัวรับแสง เป็นต้น

Transducer ตัวแปลงสัญญาณที่มีการใช้กันมากสำหรับเครื่องไบโอเซนเซอร์ คือ Amperometry, Potentiometry และ Photometry

Amperometric ใช้ในการวัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้นหรือ O_2 ที่ใช้ในปฏิกิริยา ซึ่ง H_2O_2 หรือ O_2 ถูก reduce ที่ขั้วไฟฟ้าเกิดเป็นกระแสไฟฟ้าที่สามารถวัดได้

Potentiometric ใช้ในการวัดค่า pH และ pI ผลของความแตกต่างของความเข้มข้นของ H^+ หรือ ไอออนบวกชนิดอื่นๆ ที่เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้า

Photometric . ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือสารตั้งต้นที่จะตรวจวัดต้องเป็นสารที่มีสีหรือให้แสงเรือง fluorescent หรือ luminescent โดยมีการใช้งานของ optic fiber เพื่อช่วยในการสะท้อนแสงจากแหล่งกำเนิดแสงไปยังเครื่องตรวจวัด

ไบโอเซนเซอร์ถูกประดิษฐ์ขึ้นครั้งแรกโดย Clark และ Lyons (1962 : 29[7]) ในปี ค.ศ. 1962 เพื่อใช้ในการวัดปริมาณกลูโคสในเลือด กลูโคสทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ glucose oxidase ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยขั้วไฟฟ้าที่ผลิตจากทองคำขาว เครื่อง Yellow Springs Instrument รุ่น 23 YSI เป็นไบโอเซนเซอร์เครื่องแรกที่ออกสู่ตลาดในปี ค.ศ. 1974 ต่อมาได้มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พัฒนาเพิ่มเติมโดยการปรับปรุงชั้นเมมเบรนเพื่อให้สารตั้งต้น ตัวถูกวิเคราะห์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่านได้ดี แต่ป้องกันการผ่านของกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารรบกวนต่อการวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น

2.2.3 การตรึงสารแอนติบอดีบนทรานส์ดิวเซอร์

การตรึงสารอิมมูโน (Immobilization of immunoagents)

อิมมูโนเซนเซอร์เป็นไบโอเซนเซอร์ชนิดหนึ่งที่มีการนำสารอิมมูโน ซึ่งเป็นสารทางชีวภาพมาตรึงบนทรานส์ดิวเซอร์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะการวัดของทรานส์ดิวเซอร์ คือ

1. อิมมูโนเซนเซอร์ที่อาศัยการวัดโดยตรง

เมื่อเกิดคู่ควบกันระหว่างสารอิมมูโน คือ Ag กับ Ab แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ที่เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ที่เป็นผลมาจากคู่ควบดังกล่าว

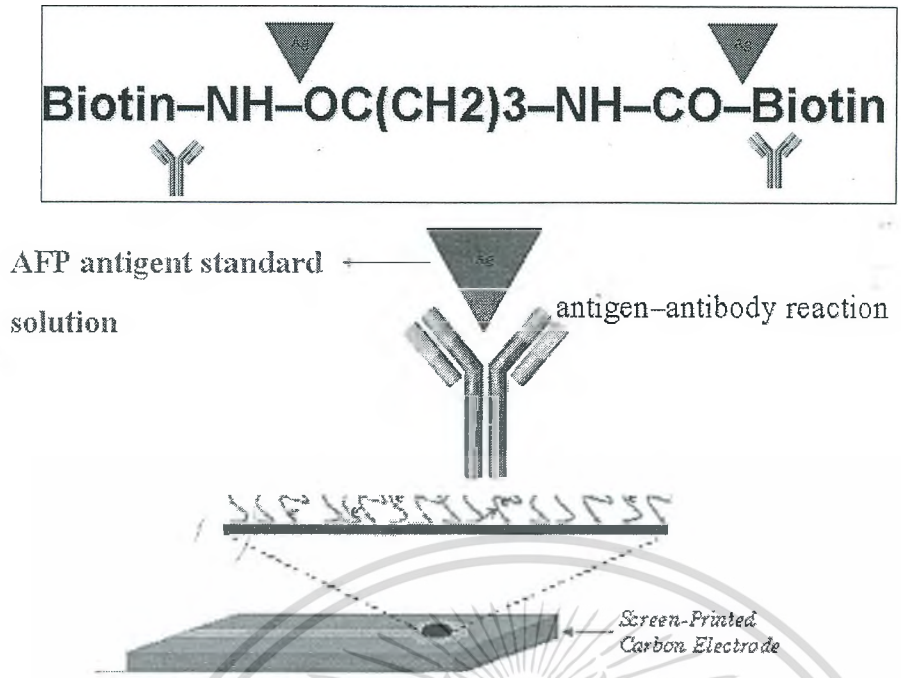
2. อิมมูโนเซนเซอร์ที่อาศัยสารติดตามในการบ่งชี้

จะบ่งบอกปริมาณสารที่เกิดปฏิกิริยาด้วยสารบ่งชี้ เช่น อาศัยเอนไซม์เป็นตัวติดตามการจับของ Ag กับ Ab ซึ่งภายหลังการจับกันแล้ว เอนไซม์ที่ติดตามบนทรานส์ดิวเซอร์จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทของเอนไซม์กลายไปเป็นผลิตภัณฑ์

2.2.4 เซนเซอร์ที่อาศัยการวัดแบบโพเทนชิโอเมทริก [8]

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยสารแอนติบอดีเป็นสารชีวภาพ และใช้วิธีทางโพเทนชิออเมตริกในการวัดปริมาณสารทางอิมมูโนนั้น ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างอื่นที่ใช้โพเทนชิออเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์ในการตรวจวัด เช่น การวัดปริมาณสารไดโกซิน (digoxin) โดยอาศัยขั้วคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ขั้วอื่น ๆ ในการตรวจวัดโดยอยู่ภายใต้หลักการ ดังรูป 2.5

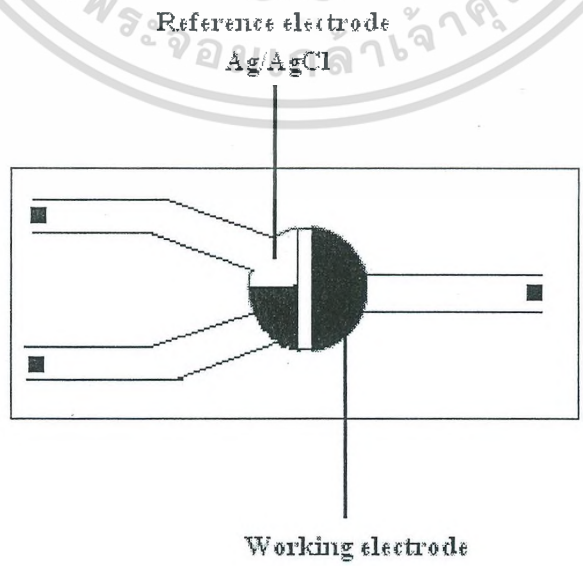
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 โพเทนซิออเมตริกอิมมูโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัด AFP

2.3 สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด Screen-printed Electrode (SPE)

เป็นการพัฒนาที่มีความสำคัญทางอิเล็กโทรด คือ การพัฒนาสกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด ซึ่งประกอบด้วยขั้วทำงานที่ทำด้วยผงคาร์บอน และอาศัยการพิมพ์หมึกลงบนแผ่นพีวีซี ขั้วอ้างอิงที่ใช้คือ Ag/AgCl ดังรูปที่ 2.6 และ 2.7



รูปที่ 2.6 ส่วนประกอบของแผ่นสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การโมดิฟายด์อิเล็กโทรดโดยวิธีนี้มีข้อดี ที่สามารถนำสารโมดิฟายด์ที่ต้องการไปตรึงบนอิเล็กโทรดได้ง่าย โดยการผสมสารโมดิฟายด์ต่างๆ ลงในหมึกคาร์บอน เช่น การผสมด้วยทอง เมอร์คูรี สารคีเลต สำหรับใช้ในกระบวนการ stripping voltammetry หรือสารมีเดียเตอร์ เช่น phthalocyanines เฟอโรซีน (ทำหน้าที่ถ่ายทอดอิเล็กตรอน)หรือเอนไซน์ ข้อดีอีกประการหนึ่งของอิเล็กโทรดแบบนี้ คือ สามารถพัฒนาอิเล็กโทรดให้มีขนาดเล็กได้ ทำให้มีราคาถูกลง เพื่อเป็นการพัฒนาออกสู่การค้าในลักษณะของอิเล็กโทรดที่ใช้แล้วทิ้ง (disposable)

นอกจากนี้แล้วสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด ยังมีคุณสมบัติที่ดีอีกหลายประการเช่น สามารถหลีกเลี่ยงสิ่งเจือปน ลดปัญหาสัญญาณที่วัดได้ค่อนข้างต่ำ และสามารถเตรียมขึ้นได้จำนวนมากบนแผ่นรองรับที่เหมือนกันหรือแตกต่างกัน.

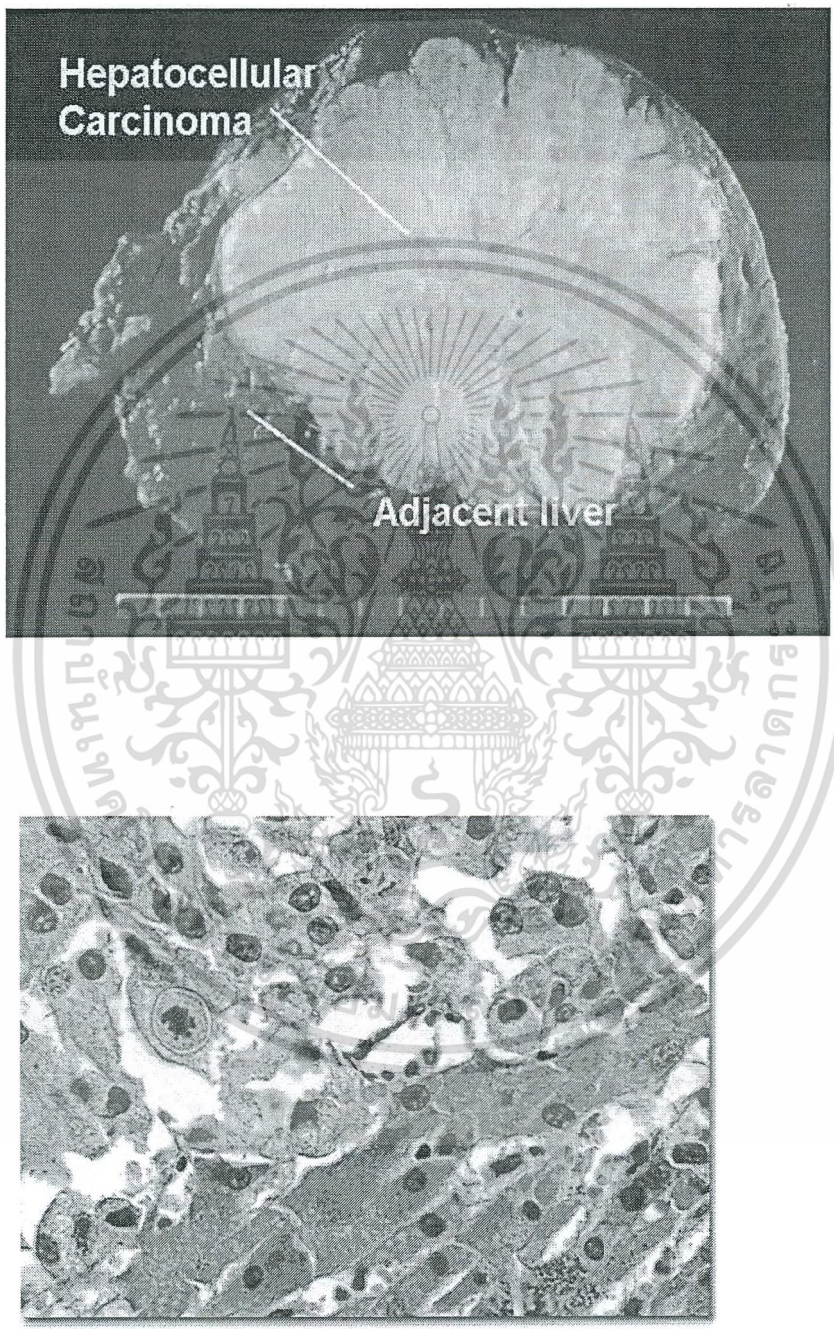
รูปที่ 2.7 สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด

2.4 อัลฟาฟีโตโปรตีน alpha-1-fetoprotein (AFP) [9]

AFP เป็น Single chain glycoprotein ที่สร้างขึ้นโดยเซลล์ตับในระยะที่เป็นตัวอ่อนในครรภ์มารดา และหลั่งออกมาในกระแสเลือด ซึ่งพบได้ในปริมาณสูงมากในเซรุ่มของทารกในครรภ์มารดา แต่ระดับ AFP จะลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังคลอดจนถึง 1 ปี ซึ่งจะตรวจพบในระดับต่ำมากจนแทบจะตรวจไม่พบในผู้ใหญ่ ดังนั้นถ้าตรวจพบว่ามีระดับสูงแสดงว่าอาจเป็นมะเร็งชนิดใดชนิดหนึ่ง เพราะระดับของ AFP สัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งได้หลายชนิด เช่น testicular, lung,liver, stomach และ pancreas เป็นต้น [2-15]14 พบว่าระดับของ AFP จะขึ้นสูงเป็นเวลานานก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการหรือสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีอื่น และหลังจากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาแล้ว การตรวจติดตามผลโดยดูจากระดับ AFP ลดลงจนถึงระดับปกติ มักแสดงให้ทราบว่าการรักษาได้ผล นั่นคือเกิดการฝ่อลงของก้อนมะเร็ง อย่างไงก็ดีในผู้ป่วยที่มีระดับ AFP ลดลงเป็นปกติแล้ว แต่ถ้าระดับ

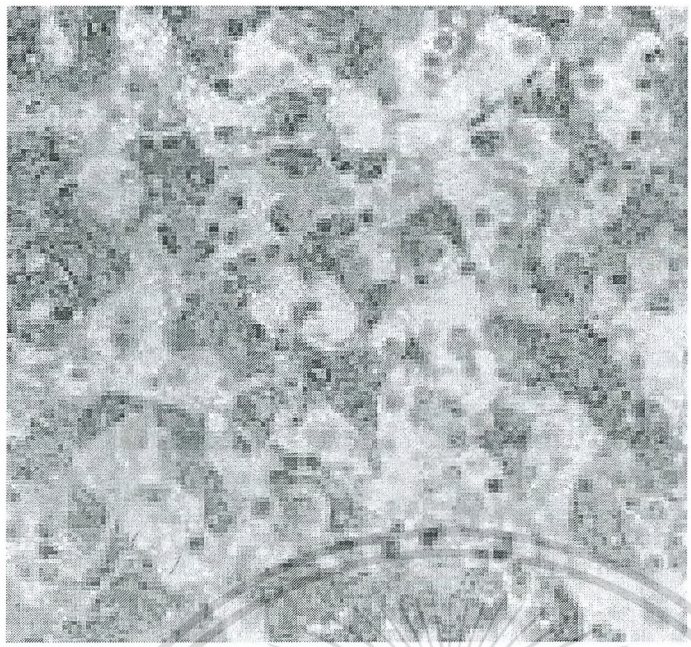
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AFP กลับสูงขึ้นไปใหม่ นั่นจะแสดงให้ทราบว่าโรคมะเร็งที่ฝ่อตัวลงไปแล้ว กลับมาเจริญเติบโตขึ้นใหม่ได้อีกวาระหนึ่ง อนึ่งระดับของ AFP อาจสูงขึ้นได้ในภาวะอื่นๆเช่น ในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอักเสบ (hepatitis) หรือโรคตับแข็ง (cirrhosis) แต่ระดับจะไม่สูงเท่ากับผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma



รูปที่ 2.8 มะเร็งเซลล์ตับ (Hepatocellular carcinoma ; HCC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 อัลฟาฟีโตโปรตีน

Human fetal liver: immunohistochemical staining for alpha fetoprotein using NCL-AFP. Note cytoplasmic staining of hepatocytes. Paraffin section.

2.4.1 องค์ประกอบทางเคมีอัลฟาฟีโตโปรตีน

- AFP เป็นสารชีวโมเลกุลประเภท Single chain glycoprotein

2.4.2 แอนติบอดี (Ab)

เป็นสารโปรตีนอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลว ของร่างกาย สร้างจาก เม็ดเลือดขาวชนิด ลิมโฟไซต์ เมื่อมีแอนติเจนเข้าสู่ร่าง กายแอนติบอดีชนิดต่างๆ จะมาจับแอนติเจนอย่างเฉพาะเจาะจงเป็นชนิดๆไป ซึ่งจะมีปฏิกิริยาแตกต่างกันจะปล่อยสารที่เป็นพิษต่อต้านแอนติเจน โดยแอนติบอดี จะจับกับโมเลกุลของสารพิษ ที่แอนติเจนปล่อยออกมากลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่เรียกว่าสารประกอบแอนติเจน แอนติบอดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Chun-Liang Feng, et al (2000)[10] ได้ศึกษาความว่องไวของ Immunosensor โดยใช้เทคนิค potentiometric ในการวัด Immunoglobolin (IgG) ซึ่งทำการเคลือบ anti-IgG บน silver (Ag) electrode และทำการวัด IgG ในตัวอย่างโดยอาศัย antigen-antibody reaction ซึ่งผลจากการวิจัยนี้บ่งชี้ว่า การตรวจวัดจาก Immunosensor นี้ มีความว่องไว จำเพาะเจาะจง ให้ค่าการวัดต่ำสุดที่ 0.2-1.2 ng/mL และมีอายุการใช้งาน 28 วัน

Miloslav Pravda, et al (2001)[11] ได้ศึกษาเครื่องมือในการวิเคราะห์ allergy antibodyies (Ige) ในตัวอย่างเลือด ซึ่งการวิจัยได้ศึกษาเทคโนโลยีด้าน screen-printed carbon electrode (SPCE) และ amperometric โดยจะวัด p-aminophenyl ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จาก alkaline phosphatase ที่ +300 mV บนขั้วสกริน-ปริ้นท์ ซึ่งเกิดกระบวนการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในการวัด IgE โดยการหยดตัวอย่างเลือดที่ขั้ว ซึ่งจะให้กระแสออกมา ผลการวิจัยพบว่า ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัด IgE โดยวิธีนี้ คือ 0.09 ng/mL และใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์เพียง 30 นาที

Hua Yu, et al (2004)[8] ได้ผลิต Immunosensor ที่ใช้แล้วทิ้งในการตรวจวัด AFP ในซีรัมมนุษย์ อิมมูโนเซนเซอร์ถูกเตรียมโดยตรึงแอนติบอดีไว้กับเยื่อไคโทซานซึ่งเคลือบบน SPCE แอนติบอดีดังกล่าวได้ถูกติดฉลากไว้ด้วย HRP เยื่อไคโทซานถูกตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและใช้วิธีทางเคมีไฟฟ้า การแช่อิมมูโนเซนเซอร์ใน AFP ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 35 นาทีจะทำให้ HRP ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันไทโอนินโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บางส่วนถูกยับยั้ง ในการทดลองซึ่งใช้ไทโอนิน 1.2 mM และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 6 mM พบว่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยาจะลดลงเป็นเส้นตรงใน 2 ช่วง เมื่อมี AFP อยู่ในช่วง 0-20 ng/mL และช่วง 20-150 ng/mL ด้วยขีดจำกัดอยู่ที่ 0.74 ng/mL วิธีนี้ให้ผลถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีการอิมมูโน-รังสี ในการเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธี พบว่า สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ที่ 6.6% และ 4.2% เมื่อใช้ AFP 10 ng/mL และ 100 ng/mL ตามลำดับ สารละลาย AFP ที่เตรียมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 สามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 10 วันที่ 4°C วิธีการที่ได้กล่าวมาสามารถใช้ตรวจ AFP ได้ในขั้นตอนเดียว และใช้ได้ดีในการวิเคราะห์ทางการแพทย์

Zhu Qiang, et al (2006)[12] และคณะได้ทำการศึกษา potentiometric Immunosensor สำหรับตรวจวัดสาร AFP ในมนุษย์ โดยการตรึงสาร anti-AFP บนผิว platinum disk electrode ซึ่งใช้ gelatin film และ silver nanoparticles เป็นตัวเชื่อมสาร anti-AFP ให้ติดกับ ขั้วอิเล็กโทรด และเติม glutaraldehyde เพื่อกระตุ้นให้เกิด antigen-antibody reaction และ electrochemical reaction เมื่อเติมสารตัวอย่าง AFP งานวิจัยชิ้นนี้แสดง ความว่องไวในการตรวจวัด ระยะเวลาในการวิเคราะห์ที่น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่า 5 นาที และขั้วอิเล็กโทรด ที่มีการเคลือบสารดังกล่าว มีระยะเวลาใช้งานนาน 60 วัน ที่ pH และอุณหภูมิควบคุม

Jie Wu, et al Huangxian Ju (2007)[13] ได้ศึกษาวิธีการตรวจ tumor maker โดยกระบวนการ simultaneous multianalyte โดย Immunosensor chip ซึ่งอาศัยกระแสที่เกิดจากปฏิกิริยา HRP enzyme ซึ่ง Immunosensor chip ที่ประดิษฐ์ขึ้นสามารถตรวจ tumor maker ได้อย่างต่อเนื่อง พร้อมกัน 2ชนิด คือ CA19-9 และ CA125 ด้วยค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 0.2 และ 0.4 ng/mL ตามลำดับ โดย Immunosensor chip ดังกล่าว ประกอบด้วย working electrode 2 ขั้ว แต่ใช้ reference electrode ร่วมกัน ซึ่งนับว่าเป็นนวัตกรรมล่าสุดทางด้าน electrochemical biochip

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัย เพื่อเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด สำหรับตรวจวัดสาร AFP โดยเทคนิคโพเทนชิออเมทรี ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของขั้วดังกล่าว ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยดังนี้

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2 การเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด

3.4 วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่อง Microprocessor pH/Ion Meter (pMX 3000)
2. เครื่องทำน้ำปราศจากไอออนรุ่น Mill – Q (Milford , MA ,USA)
3. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด (Denver Instrument Company)
4. เครื่องอัลตราโซนิค (รุ่น Eltrosonic type 0.7 profi , USA)
5. เครื่องกรองแบบลดความดัน (Tokyo Rikkakai Co ,Ltd.Type A-3s, Japan)
6. สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด (SPCE)
7. ไมโครปิเปต
8. โถดูดความชื้น
9. ตู้อบสาร

3.1.2 สารเคมี

1. Monoclonal Anti-α-Fetoprotein (AFP) CLONE C3 Mouse Ascites Fluid(SIGMA)
2. Monoclonal α-Fetoprotein (AFP) (AFP Control) (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ)
3. AFP ELISA kits(สถาบันมะเร็งแห่งชาติ)
4. Glutaraldehyde (Analytical grade,SIGMA)
5. Potassium haxacyanoferate (III) (Analytical grade,Carlo Erba)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

6. Phosphate – buffered Solution (PBS) pH6.5,pH7 (Analytical grade, Merck)
7. Gelatin solution (Analytical grade,SIGMA)
8. Biotin solution (Analytical grade,SIGMA)
9. Serum sample (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ)
10. Distilled water

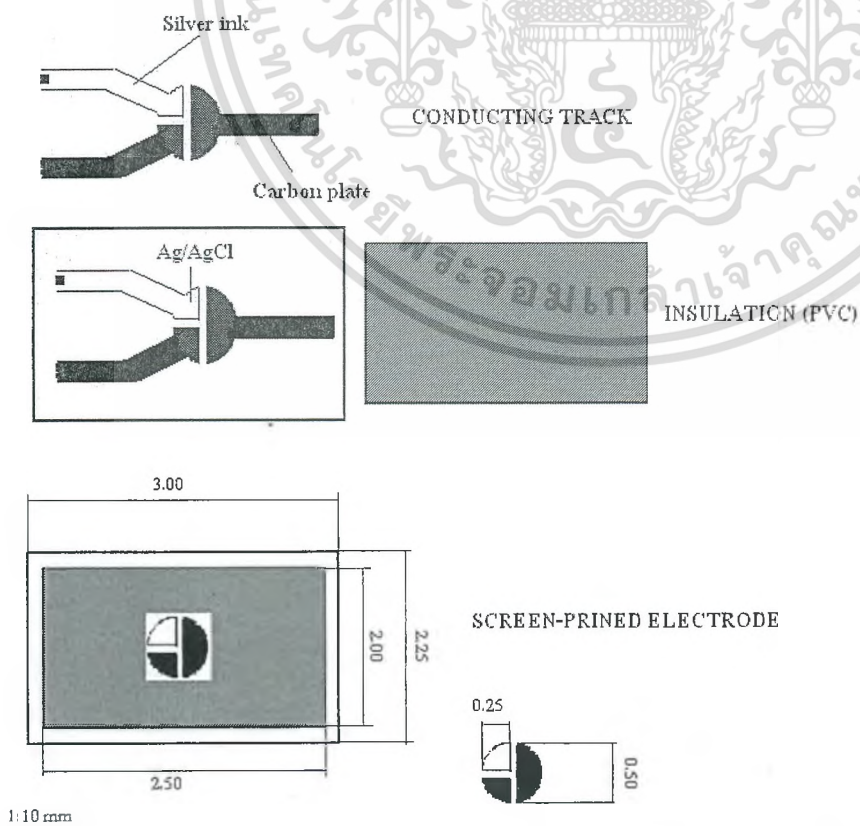
3.2 การเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด

3.2.1 การสร้างขั้วไฟฟ้าสกรีน-ปริ้นท์

ออกแบบลายสกรีน ซึ่งเป็นการกำหนดขนาด ตำแหน่งและรูปร่างของขั้วไฟฟ้าโดยใช้โปรแกรม Corel Draw Vertion 12 และโปรแกรม Adobe Illustrator Creative Suit 2 ซึ่งลายสกรีนจะประกอบด้วยชั้นทั้งหมด 4 ชั้น เรียงลำดับจากชั้นล่างสุด คือ

1. ลายแถบการนำไฟฟ้า (Conducting track)
2. ลายขั้วไฟฟ้าใช้งาน และจุดตรวจ
3. ลายขั้วไฟฟ้าอ้างอิง
4. ลายฉนวนไฟฟ้า (Insulation)

ลายแบบสกรีนทั้ง 4 แบบที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรดที่เตรียมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
115496

1. นำแบบที่ได้ไปเตรียมเฟรมสกรีนโดยพิมพ์แม่พิมพ์โดยวิธีกาวอัด จากนั้นขึงผ้าสกรีนที่พิมพ์แม่พิมพ์แล้วลงบนกรอบอลูมิเนียม
2. ทำการสกรีนลายแถบการนำไฟฟ้าด้วยหมึกซิลเวอร์บนแผ่นพีวีซี นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในหมึกซิลเวอร์
3. ทำการสกรีนขั้วไฟฟ้าใช้งาน และจุดตรวจวัดด้วยหมึกคาร์บอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในหมึกคาร์บอน
4. ทำการสกรีนขั้วไฟฟ้าอ้างอิงด้วยหมึกซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในหมึกซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์
5. ทำการสกรีนลายฉนวนไฟฟ้าด้วยสีน้ำมัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในสีน้ำมัน

3.3 การทดสอบขั้วไฟฟ้า

1. ต่อสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรดที่เตรียมได้เข้ากับตำแหน่งขั้วไฟฟ้าของเครื่องตรวจวัดเพื่อทำการทดสอบ
2. ปิเปตสารละลาย 0.005 M $K_3Fe(CN)_6$ ตรวจวัดด้วยเทคนิคโพเทนชิออเมตรี
3. เก็บชิ้นงานที่มีประสิทธิภาพไว้จากนั้นทดสอบชิ้นงานต่อไปตามขั้นตอนที่ 1 และ 2

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การตรึงด้วย AFP และปรับปรุงขั้วบนสกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด

3.4.1.1 นำแผ่น SPCE สำเร็จรูปที่เตรียมไว้ ล้างด้วย 0.1 M nitric acid acetone และ น้ำกลั่น ปริมาตร 10 µL อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ จากนั้นเป่าให้แห้งด้วย air-dried ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.1.2 เตรียมเยื่อเมมเบรน โดยผสม anti-AFP (1 ng/mL) ปริมาณ 20 µL และสารละลายไบโอติน 20 µL ที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งไว้ 2 นาที

3.4.1.3 ปิเปตสารละลายผสมในข้อ 3.4.1.2 มา 20 µg หยดบนขั้วอิเล็กโทรดทิ้งไว้ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วค่อยๆชะสารที่เหลือบนขั้วออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 และเป่าให้แห้งด้วย air-dried

3.4.1.4 ปรับปรุงขั้วอิเล็กโทรดโดยการหยดสารละลาย glutaraldehyde (wt%,0.3%) ปริมาตร 10 µL ทิ้งไว้ 30 นาที และพักไว้ 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C ภายใต้สภาวะ PBS pH 7 ก่อนการใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การหาสภาวะทางเคมีไฟฟ้าของขั้วที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP ด้วยเทคนิคโพเทนชิออเมตรี

3.4.2.1 การหา pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde (จากข้อ 3.4.1) มาจุ่มลงในสารละลายอิเล็กโทไลท์ผสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium haxacyanoferate (III) เข้มข้น 0.005 M ปริมาณ 25 mL หยดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 µL ปั่นกวนสารละลายด้วยเครื่องปั่นกวน ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้น ทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 1 M ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 5 , 5.5 , 6.0 , 6.5 , 7.0 , 7.5 , 8.0 แล้วบันทึกค่าศักย์ไฟฟ้า (mV)

3.4.2.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde (จากข้อ 3.4.1) มาจุ่มลงในสารละลายอิเล็กโทไลท์ผสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium haxacyanoferate (III) เข้มข้น 0.005 M ปริมาณ 25 mL หยดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 µL ปั่นกวนสารละลายด้วยเครื่องปั่นกวน ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พร้อมกับให้ความร้อน แล้วบันทึกศักย์ไฟฟ้าด้วยเทคนิคโพเทนชิออเมทตรี ที่อุณหภูมิ 20 , 25 , 30 , 35 , 40 , 45 , 50 °C ตามลำดับ

3.4.2.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการอ่านค่าศักย์ไฟฟ้า

นำสารละลายอิเล็กโทรไลท์ที่หยดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL (ข้อ 3.4.2.1) แล้วปิเปตปริมาณ 20 µL บนแผ่นสกีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า ทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เทคนิคโพเทนซิออเมตรี

ทำซ้ำตั้งแต่ต้น โดยเปลี่ยน แผ่นสกีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรดใหม่ แล้วหาเวลาที่เหมาะสมในการอ่านค่าศักย์ไฟฟ้า

3.4.3 การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP

3.4.3.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรงของการวัดศักย์ไฟฟ้า

หาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น ที่ได้จากการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า กับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 0 – 214.44 ng/mL (ความชันได้จากสัมประสิทธิ์นำหน้า ค่าความเข้มข้นในสมการที่ได้จากการพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น กับค่าศักย์ไฟฟ้า (mV) จากโปรแกรม (Microsolf excel))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3.2 การศึกษาความเที่ยง

ทำการวัด AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ดังข้อ 3.4.2.1 ในสภาวะที่ pH เหมาะสม แล้ววัดศักย์ไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคโพเทนชิออเมตรี 10 ครั้ง แล้วหาค่า %RSD (Percent of Relative Standard Deviation)

$$\%RSD = (SD./\bar{X}) \times 100$$

SD. คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของศักย์ไฟฟ้าจากการวัด 10 ครั้ง

$\bar{X}$ คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ยจากการวัด 10 ครั้ง

3.4.3.3 การศึกษาขีดจำกัดในการวิเคราะห์

ทำการวัด AFP เข้มข้น 6.1 – 339.53 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ดังข้อ 3.4.2.1 ในสภาวะที่ pH เหมาะสม แล้ววัดศักย์ไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคโพเทนชิออเมตรี นำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้ากับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 0 – 339.53 ng/mL แล้วคำนวณค่าขีดจำกัดในการวิเคราะห์ โดยการพลอตแบบแกรน

3.4.3.4 การหาอายุการใช้งานของขั้ว

ทำการวัด AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลท์ ดังข้อ 3.4.2.1 ในสภาวะที่ pH เหมาะสม แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า โดยใช้เทคนิคโพเทนชิออเมตรี บันทึกค่าศักย์ไฟฟ้าทุกวัน โดยไม่ต้องทำความสะอาดผิวหน้าขั้วหลังการวัด (โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และที่สภาวะ pH เหมาะสม) วัดจนกระทั่งค่าศักย์ไฟฟ้าลดลงต่ำกว่า 50% ของครั้งแรก จำนวนครั้งที่วัดจนทำให้กระแสลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง จะเป็นครึ่งชีวิตของขั้วไฟฟ้า

3.4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP

ตรวจวัดหา AFP ในตัวอย่างซีรั่มมนุษย์ โดยใช้สกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรดแล้ววัดด้วยเทคนิคโพเทนชิออเมตรี ที่สภาวะการทดลอง pH เหมาะสม(ดังข้อ 3.4.2.1) และสร้างกราฟมาตรฐาน โดยพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้ากับความเข้มข้นมาตรฐาน AFP นำค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากตัวอย่าง ไปเทียบกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้น

3.4.3.5.1 การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

ปิเปต ตัวอย่างซีรั่ม AFP ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 10 µL ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้นปิเปตสารละลายอิเล็กโทรไลท์ผสม (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสารละลาย Potassium -haxacyanoferate (III) เข้มข้น 0.005 M ปริมาณ 25 mL ที่ pH 6.5) ปริมาตร 10 μL เติมลงไป

จากนั้นปิเปตสารตัวอย่างAFP ที่เตรียมไว้ข้างต้นมา 10 μL หยดลงบนสกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด ให้คลอบคลุมขั้วทั้งหมด แล้วบันทึกศักย์ไฟฟ้าด้วยเทคนิคโพเทนชิออเมทรี

3.4.3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่าง

นำค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากตัวอย่างซีรั่ม AFP ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แล้วอ่านค่าความเข้มข้น

3.4.3.5.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP

เปรียบเทียบผลการทดลอง จากสกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้น กับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง และอภิปรายผล

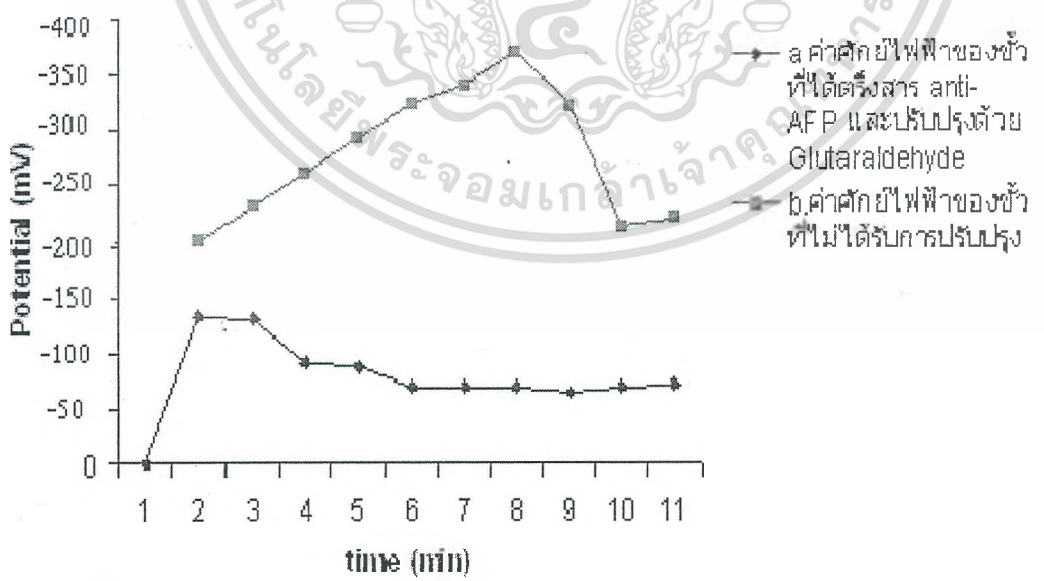
4.1 การสร้างสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด โดยการตรึงสาร anti-AFP และ ปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde

4.1.1 กำหนดสภาวะตัวแปรในการทดลองไว้ดังนี้

สารละลาย $K_3Fe(CN)_6$	0.005 M
ขั้วไฟฟ้าอ้าง อิงคือ	Ag/AgCl
ขั้วไฟฟ้าใช้งาน คือ	ขั้วคาร์บอนที่ตรึงสาร anti-AFP และปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde

การทดสอบประสิทธิภาพขั้วไฟฟ้า

ปิเปตสารละลาย 0.005 โมลาร์ $K_3Fe(CN)_6$ ปริมาตร 10 µL ลงบนสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด ให้ครอบคลุม ขั้วทั้งหมด แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโพเทนชิออเมตรี ได้ค่าศักย์ไฟฟ้าของสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรดที่ตรึงด้วยสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde และค่าศักย์ไฟฟ้าของขั้วที่ยังไม่มีการปรับปรุง แสดงดังรูป 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงค่า potentiometric response (- mV) ของละลาย 0.005 โมลาร์ $K_3Fe(CN)_6$ โดยขั้วที่ ตรึงสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde และขั้วที่ยังไม่ได้การปรับปรุง

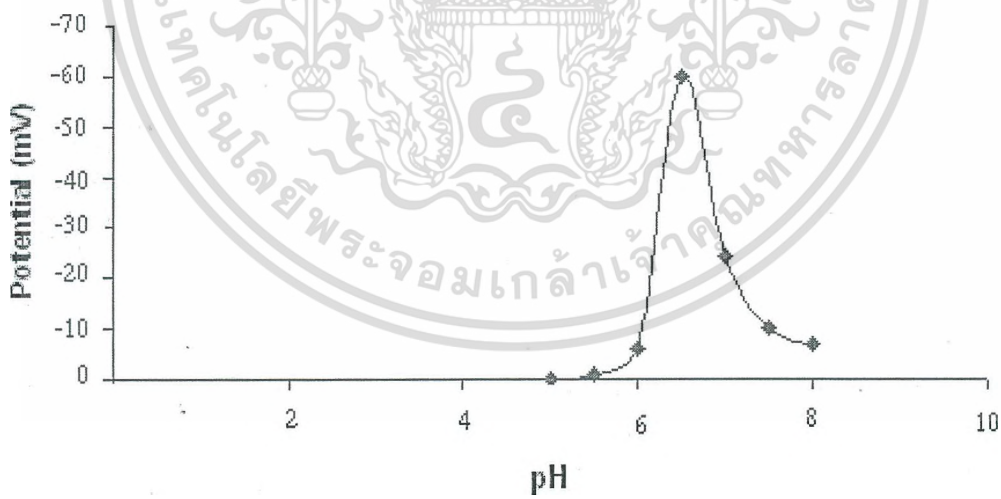
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 1.4 จะเห็นว่า ค่า potential (-mV) ที่เกิดจากการวัดสารละลาย 0.05 โมลาร์ $K_3Fe(CN)_6$ โดยขั้วที่ยังไม่ได้การปรับปรุงจะมีค่าสูงกว่าขั้วที่ตรึงสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde เนื่องจากสารละลาย Potassium hexacyanoferate (III) มีการแตกตัวของเหล็ก ($Fe^{2+/3+}$) ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิด ion บริเวณผิวหน้าขั้ว ส่วนขั้วที่ตรึงสาร anti-AFP จะมีการบดบัง ion ดังกล่าว โดยโมเลกุลของ anti-AFP ทำให้สัญญาณที่วัดได้ลดลง

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP

4.2.1 ค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด AFP

จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 μL ในสารละลายอิเล็กโทรไลท์ผสม (สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium haxacyanoferate (III) เข้มข้น 0.005M ปริมาณ 25 mL) โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนชิออเมทรี ที่ pH เท่ากับ 5 , 5.5 , 6.0 , 6.5 , 7.0 , 7.5 และ 8.0 ได้ ความสัมพันธ์ของค่าศักย์ไฟฟ้า กับค่า pH ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลท์กับค่าความต่างศักย์ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 μL โดย สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมทรี

จากรูปที่ 4.2 เมื่ออ่านค่าความต่างศักย์ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 μL ในสารละลายอิเล็กโทรไลท์ผสม ที่ pH เท่ากับ 5, 5.5, 6.0, 6.5,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.0, 7.5 และ 8.0 พบว่า ที่ pH 6.5 ให้ค่า potential (-mV) สูงที่สุดคือ -60.43 ± 0.25 mV และเมื่อความเป็นกรดลดลง ค่า potential (-mV) ที่วัดได้มีแนวโน้มสูงขึ้นจนถึง pH 6.5 หลังจากนั้นค่าที่วัดได้จะมีแนวโน้มลดลง

ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด AFP ที่ความเข้มข้น 0.02 ng/mL ปริมาณ 20 µL ในสารละลายอิเล็กโทรไลท์ผสม ที่ pH เท่ากับ 6.5 จะได้ค่า potential สูงที่สุด แต่จะมีค่าต่ำกว่าการวัดด้วยขั้วที่ยังไม่ได้การปรับปรุง (ปราศจาก AFP) (จากรูป 4.1) เนื่องมาจาก biotinylated~anti-AFP ที่เคลือบบนขั้วใช้งาน สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรดที่ปรับปรุงโดย Glutaraldehyde ซึ่งเป็นสารกลุ่ม bifunctional ที่มีหมู่ - CHO สามารถทำปฏิกิริยา cross linkage กับหมู่ amino ของ anti-AFP และเมื่อจุ่มลงในสารละลายอิเล็กโทรไลท์ ที่มี $K_3Fe(CN)_6$ จะกระตุ้นให้เกิดการแตกตัวของ ion เกิดหมู่ - CHO และหมู่ amino จากนั้น AFP จากตัวอย่าง จะเข้าจับ anti-AFP ที่เคลือบบนขั้ว เกิด antigen–antibody reaction บดบังการเกิด ion บนผิวหน้าขั้วอิเล็กโทด ส่งผลให้ค่า potential ลดต่ำลง

The effect of cross linkage by Glutaraldehyde

$$\text{Biotin–NH}_2 + \text{OHC–(CH}_2)_3\text{–CHO} + \text{Biotin–NH}_2 \longrightarrow$$

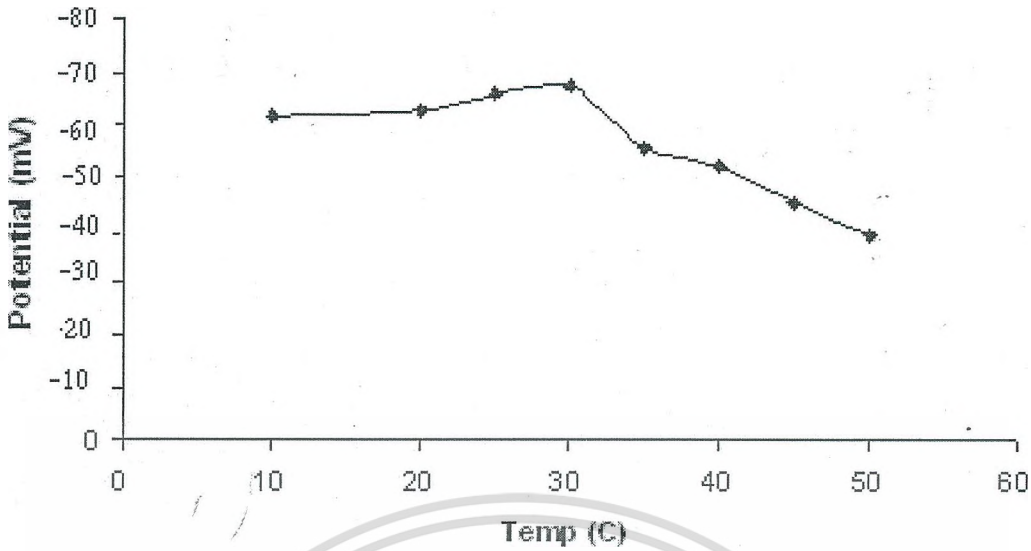
$$\text{Biotin–NH–OC(CH}_2)_3\text{–NH–CO–Biotin}$$

รูปที่ 4.3 สมการแสดงปฏิกิริยา cross linkage ของ glutaraldehyde และ biotinylated ~ anti-AFP ที่เคลือบบนขั้วใช้งาน

4.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 µL ในสารละลาย อิเล็กโทไลท์ผสม (สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium haxacyanoferate (III) เข้มข้น 0.005M ปริมาณ 25 mL) ที่ pH 6.5 โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมทตรี พร้อมกับให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 20 , 25 , 30 , 35 , 40 , 45 และ 50 °C ได้ค่าศักย์ไฟฟ้าสัมพันธ์กับอุณหภูมิ ดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



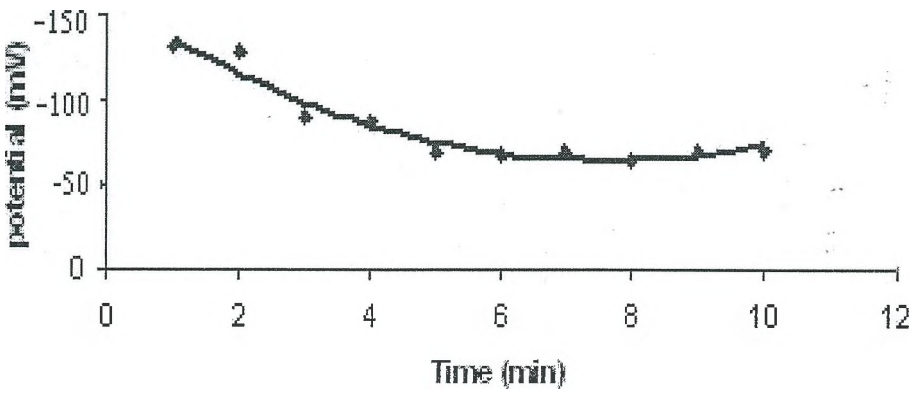
รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ กับค่า pH ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลท์กับค่าความต่างศักย์ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 μL โดย สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงขั้วแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมทตรี

จากการศึกษา พบว่าอุณหภูมิมีความสำคัญมากต่อการวิเคราะห์สาร ด้านชีวโมเลกุล จากผลการวิจัย ความความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ กับค่า pH ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลท์กับค่าความต่างศักย์ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 μL โดย สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงขั้วแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมทตรี พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 °C ค่า potential ที่อ่านได้มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากการที่สาร AFP ในสารละลาย และ anti – AFP ที่เคลือบบนขั้วอิเล็กโทด เสียสภาพไป และการเกิด ion บริเวณผิวหน้าขั้วลดลง ดังนั้น จึงต้องรักษาสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด และ สารตัวอย่างในการวิเคราะห์ ที่อุณหภูมิต่ำ ตลอดจนรักษาระดับอุณหภูมิในการทดลอง จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดสาร AFP โดย สกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด สามารถทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้องได้

4.2.3 อัตราเร็วที่เหมาะสมในการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า

จากการนำสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่หยดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL แล้วปิเปตปริมาณ 20 μL บนแผ่นสกิน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า ทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เทคนิคโพเทนซิออเมตรี ค่าpotential (mV) ที่อ่านได้ แสดงดังรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ค่า potential (mV) ของสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ที่แสดงค่า ณ นาทีต่างๆ จากการตรวจวัดโดย แผ่นสกิน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมตรี

จากการศึกษา พบว่า ค่า potential (mV) ของสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL จะมีค่าลดลงในนาทีที่ 1 จนถึง นาทีที่ 5 แล้วจะคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที อยู่ในช่วง -60.43 ± 0.25 mV และหลังจากนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าไป จากกราฟ (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่า ค่า potential (mV) ที่อ่านเมื่อเวลา 5 นาที จะเสถียรที่สุด

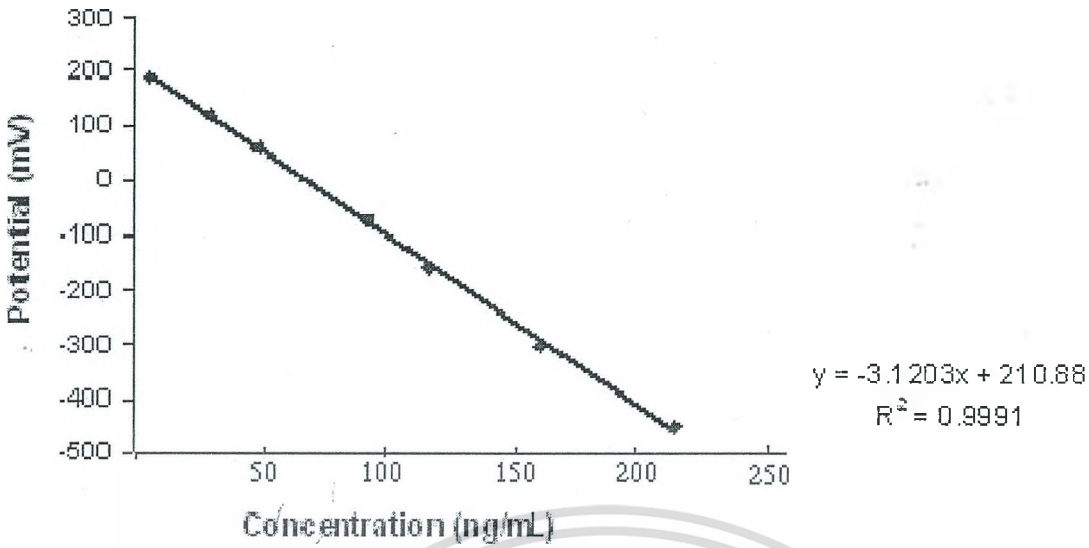
4.3 การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP

4.3.1 การศึกษาสภาพไวของขั้ว

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า การตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 µL ใน สารละลายอิเล็กโทรไลท์ผสม (สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium haxacyanoferate (III) เข้มข้น 0.005M ปริมาณ 25 mL) โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมทตรี ที่ pH 6.5 จะได้ค่า potential (mV) ดีที่สุด เนื่องจาก ปฏิกิริยา cross linkage กับหมู่ amino ของ anti-AFP ที่มี $K_3Fe(CN)_6$ เป็นตัวกระตุ่นให้เกิดการแตกตัวของ ion เกิดหมู่ - CHO และหมู่ amino จากนั้น AFP จากตัวอย่าง จะเข้าจับ anti-AFP ที่เคลือบบนขั้ว เกิด antigen–antibody reaction บดบังการเกิด ion บนผิวหน้าขั้วอิเล็กโทด ส่งผลต่อค่า potential ที่ลดต่ำลง

ดังนั้นการหาการศึกษาสภาพความไวของขั้ว เพื่อหาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น โดยการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า กับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 0 – 214.4 ng/mL แสดงความสัมพันธ์ ดังรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานแสดงค่า potential กับค่าความเข้มข้นของ AFP ที่ 6.1 , 30.5 , 48.9 , 91.1 , 116.1 , 160.8 และ 214.4 ng/mL ตามลำดับ

จากรูป 4.6 ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde โดยเทคนิคโพเทนชิออเมทรี ในการตรวจวัด AFP ให้ค่าpotential สัมพันธ์กับค่าความเข้มข้น เป็นเส้นตรงในช่วง 6.1 - 214.4 ng/mL โดยมีสมการความสัมพันธ์ คือ y = -3.1203 x + 210.88 ค่า R^2 เท่ากับ 0.9991 และค่าความชันเท่ากับ -3.1203

4.3.2 การศึกษาความเที่ยง

ผลจากการวัด AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ในสภาวะที่ pH 6.5 แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า โดยใช้เทคนิคโพเทนชิออเมตรี ทั้งหมด 10 ครั้ง ได้ค่า potential ทั้งหมด 10 ค่า คำนวณค่า %RSD แสดงได้ดังตารางที่ 4.1

$$\%RSD = (SD./\bar{X}) \times 100$$

SD. คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสที่ได้จากการวัดทั้ง 10 ครั้ง

$\bar{X}$ คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ยที่ได้จากการตรวจวัดทั้ง 10 ครั้ง

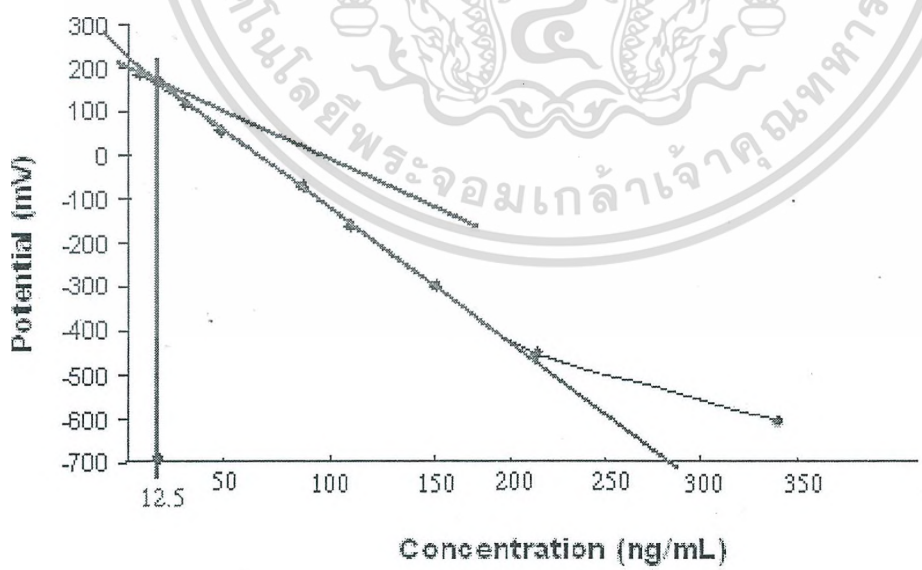
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ย และ %RSD (Percent of Relative Standard Deviation) จากการวัด AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนชิออเมทรี

ค่าที่ได้จากการทดลอง	ขั้วที่ตรึงสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Ghitaraldehyde
ค่าศักย์ไฟฟ้า (mV)	-61.01
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-1.491
%RSD	2.46

4.3.3 การศึกษาขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP

จากการหาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น โดยการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า กับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 6.1 – 339.53 ng/mL แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น (รูปที่ 4.6) นำความสัมพันธ์ ดังกล่าวไปคำนวณค่าขีดจำกัดในการวิเคราะห์ โดยการพลอตแบบแกรน (Gran's plot) ดังรูปที่ 4.7 ได้ขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP เท่ากับ 12.5 ng/mL

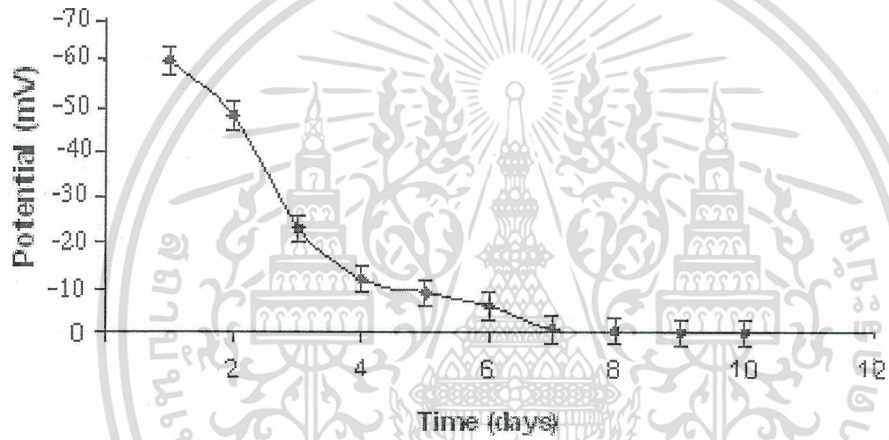


รูปที่ 4.7 แสดงการหาขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP โดยการพลอตแบบแกรน (Gran's plot)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 อายุการใช้งานของขั้ว

จากการวัด AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ที่ pH 6.5 แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า โดยใช้เทคนิคโพเทนซิออเมตรี ได้ค่าศักย์ไฟฟ้า เท่ากับ -60 ± 5 mV ในวันแรกของการทดลอง จากนั้นวัดซ้ำขั้วเดิม โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และที่สภาวะ pH 6.5 พบว่าค่าศักย์ไฟฟ้ามีแนวโน้ม ลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 2 วัดได้ - 48 ± 5 mV (แสดงดังรูปที่ 4.8) ดังนั้นการวัดโดยสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด สำหรับสาร AFP ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมตรี จะเป็นในลักษณะใช้แล้วทิ้ง(disposable)



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงค่า Potentiometric responses (mV) ที่วัดโดยสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรดสำหรับสาร AFP ด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมทรี ในแต่ละวัน

4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่างด้วยเทคนิคโพเทนซิออเมตริกอิมมูโน-เซนเซอร์

จากการตรวจวัด ตัวอย่างซีรัม 5 ตัวอย่าง เพื่อหาค่า AFP โดยเทคนิค โพเทนชิออเมทรีอิมมูโนเซนเซอร์ ด้วยสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด ได้ค่า potential ดังตารางที่ 4.2

4.3.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP

ผลการเปรียบเทียบ ตัวอย่างซีรัมเพื่อหาค่า AFP จากสกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้นกับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า potential จากการวัดตัวอย่างซีรัม 5 ตัวอย่าง โดยเทคนิค โพเทนชิออเมตรี อิมมูโนเซนเซอร์

Samples	*Potential (mV)*	**Concentration of AFP by Y= -3.1203X +210.88** (ng/nL)
1	162	15.06±0.0863
2	109.4	32.54±0.0529
3	60.1	48.32±0.0300
4	136.2	111.22±0.0505
5	-416.1	200.92±0.0682

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดง การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP ด้วย สกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้น กับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)

Sample	**By SPCE immunosensor (ng/mL)**	**By ECLIA (ng/mL)**
1	15.06±0.0863	15.00
2	32.54±0.0529	32.50
3	48.32±0.0300	48.30
4	111.22±0.0505	107.8
5	200.92±0.0682	200.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร AFP ด้วยสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กโทรด โดยเทคนิค โพเทนชิออเมตรี อิมมูโนเซนเซอร์ พร้อมทั้งศึกษาถึงสภาวะในการตรวจวัด และศึกษาประสิทธิภาพของการวัด AFP จากสกรีน – ปริ้นท์อิเล็กโทรดที่สร้างขึ้น เปรียบเทียบกับเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ซึ่งสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

5.1.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP คือ ตรวจวัดสารตัวอย่าง AFP ในสารละลายอิเล็กโทไลท์ผสม (สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium haxacyanoferate (III) เข้มข้น 0.005M ปริมาณ 25 mL) อัตราส่วน สารตัวอย่าง AFP : สารละลายอิเล็กโทไลท์ [1:1] ดังสภาวะ ที่แสดงในตารางที่ 5.1

5.1.2 จากการศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde ดังกล่าว มีความเหมาะสมในการตรวจวัดสาร AFP โดยเทคนิคโพเทนชิออเมตรี อิมมูโนเซนเซอร์ดังสภาวะ ที่แสดงในตารางที่ 5.2

5.1.3 ผลการเปรียบเทียบ ตัวอย่างซีรัมเพื่อหาค่า AFP จากสกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้น กับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ได้ผลการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับ ดังตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP

Condition	ค่าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์
1.ค่าpH	6.5
2.อุณหภูมิ(C□)	0-30
3.เวลาที่เหมาะสมในการอ่านค่า(min)	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5.2 สมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde

Parameter	ค่าที่ตรวจวัดได้
1.ช่วงความเป็นเส้นตรง	y= -3.1203x + 210.88
2.% RSD	2.46
3.Detection Limit (ng/mL)	12.5
4.อายุการใช้งาน (Day)	1

ตารางที่ 5.3 The determination result of AFP by SPCE immunosensor and ECLIA method

Sample	By SPCE immunosensor (ng/mL)	By ECLIA (ng/mL)	Agreement (%)
1.	15.60	15.00	98.00
2.	32.54	32.50	99.80
3.	48.32	48.30	99.95
4.	111.22	107.80	96.83
5.	200.92	200.00	99.54

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรวัดตัวอย่างซีรั่มให้หลากหลายความเข้มข้น เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการวิเคราะห์

5.2.2 ในการหยดสารตัวอย่างเพื่อทำการวัด ซึ่งมีปริมาตรน้อย จะทำให้สารบนผิวหน้าขั้วแห้ง จึงควรมีการศึกษาวิธีการควรคุมขณะทำการวิเคราะห์

5.2.3 ควรมีการเปรียบเทียบ ค่าการวัดตัวอย่างซีรัมเพื่อหาค่า AFP ในวิธีวิเคราะห์อื่นๆ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับ มากขึ้น

5.2.4 ควรศึกษาปรับปรุงขั้วไฟฟ้า เพื่อให้สามารถวัดช่วงความเข้มข้นที่มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง.

[1] สถานวิทยามะเร็งศิริราชพยาบาล คณะแพทย์ศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. (2549) มะเร็งตับ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล

[2] ธีรนุช วิชญานันท์ (2548). ชีวเคมีขั้นสูง. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง

[3] โสภา กลิ่นจันทร์. (2546). ไบโอเซ็นเซอร์เบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร ศูนย์ผลิตตำรา

[4] Skoog,D.A., West,D.M. and Holler,F.J. (1992) "Analytical Chemistry: An Introduction" 6 th ed. Saunder College Publishing, U.S.A.

[5] Paul R. Mathewson, Jonh W. Finley.(1991). "Biosensor Design and Application" Atlanta : American Chemical Society.

[6] " Prostate specific antigen" (online) Available : http://www.nci.nih.gov/cancertopics/factsheet/Detection/PSA -58kduatestingcentre.com/PSA-Kit.htm

[7] Clark, L.C. Jr. and Lyons, C., "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". *Ann. NY Acad. Sci.* **102** (1962), pp. 29–45.

[8] Hua Yu, Feng Yan, Zong Dai, and Huangxian Jua, "A disposable amperometric immunosensor for _-1-fetoprotein based on enzyme-labeled antibody/chitosan-membrane-modified screen-printed carbon electrode", Analytical Biochemistry, 331, 2004, 98–105.

[9] Greg, L., Perkins, M.D., Evan, D., Slater, M.D., Georganne, K., Sanders, M.D. and John, G. Prichard, M.D., Ventura County Medical Center, Ventura, California.

[10] Chun-liang Feng, Yi-hong Xu and Li-min Song, "Study on highly sensitive potentiometric IgG immunosensor", Sensors and Actuators B: Chemical, 66(1-3), 2000, 190-192.

[11] Miloslav Pravda, Catriona O'Meara and George G. Guilbault, "Polishing of screen-printed electrodes improves IgG adsorption", Talanta, 54, 5, 2001, 887-892.

[12]Zhu Qiang, Ruo Yuan, Yaqin Chai, Na Wang, Ying Zhuo, Ying Zhang and Xuelian Li, "A new potentiometric immunosensor for determination of α-fetoprotein based on improved gelatin–silver complex film", Electrochimica Acta, 51(18), 2006, 3763-3768.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[13] Jie Wu, Zhijie Zhang, Zhifeng Fu, *Huangxian Ju*, "A disposable two-throughput electrochemical immunosensor chip for simultaneous multianalyte determination of tumor markers", Biosens. Bioelectron. 23(1), 2007,114-120.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนังสือเป็นสมบัติของท่าน
โปรดช่วยกันรักษา
www.lib.kmitl.ac.th
สำนักหอสมุดกลาง โทร. 0 2739 2221

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้