การตรวจวัดแบบสัญญาณคู่ เชิงสีและการเรืองแสงที่มีความไวและเลือกจำเพาะต่อฮิสทามีนในอาหารทะเลโดยใช้อนุภาคนาโนทองที่ปรับปรุงด้วยอะลิซารินคอมเพล็กโซน

HIGHLY SENSITIVE AND SELECTIVE DUAL-SIGNAL COLORIMETRIC AND FLUOROMETRIC DETECTION OF HISTAMINE IN SEAFOOD PRODUCTS USING ALIZARIN COMPLEXONE-MODIFIED GOLD NANOPARTICLES

อัมพิกา พ่วงศิริ

AMPIKA PHOUNGSIRI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2567

KMITL-2024-SC-M-012-050

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HIGHLY SENSITIVE AND SELECTIVE DUAL-SIGNAL COLORIMETRIC AND FLUOROMETRIC DETECTION OF HISTAMINE IN SEAFOOD PRODUCTS USING ALIZARIN COMPLEXONE-MODIFIED GOLD NANOPARTICLES

AMPIKA PHOUNGSIRI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN APPLIED CHEMISTRY

DEPARTMENT OF CHEMISTRY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2024

KMITL-2024-SC-M-012-050

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2024

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจวัดแบบสัญญาณคู่ เชิงสีและการเรืองแสงที่มีความไวและเลือกจำเพาะต่อฮิสทามีนในอาหารทะเลโดยใช้อนุภาคนาโนทองที่ปรับปรุงด้วยอะลิซารินคอมเพล็กโซน
ชื่อนักศึกษา	นางสาว อัมพิกา พ่วงศิริ
รหัสประจำตัว	65056098
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมีประยุกต์)
ภาควิชา	เคมี
พ.ศ.	2567
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์.ดร. เอกรัฐ เดชศรี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วยอะลิซารินคอมเพล็กซ์ (Au^0-NPs_{ALz}) โดยการใช้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกควบคู่กับวิธีรีดักชันทางเคมี เพื่อใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีตรวจวัดแบบสองโหมดสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีน อนุภาค Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอนุภาคอยู่ที่ 17.84 ± 1.37 นาโนเมตร ซึ่งมีความสามารถในการเกิดฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้พลังงานกระตุ้นที่ 430 นาโนเมตร และแสดงแถบเซอร์เฟสพลาสมอนที่ 535 นาโนเมตร ในการตรวจวัด ขั้นแรกจะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Au^0-NPs_{ALz} และ Ni (II) ซึ่งมีความจำเพาะต่อการตรวจวัดฮีสทามีน โดยกลไกในการวิเคราะห์ฮีสทามีนสามารถทำการวิเคราะห์ได้สองโหมด คือ โหมดการตรวจวัดการเกิดฟลูออเรสเซนต์ และโหมดการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งฮีสทามีนจะเกิดพันธะโควาเลนต์กับ Ni (II) บนสารประกอบเชิงซ้อน Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) ส่งผลให้ฟลูออเรสเซนต์ของ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) ลดลง ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงจะสูงขึ้น ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของฮีสทามีน และสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีม่วง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด สำหรับโหมดการตรวจวัดการเกิดฟลูออเรสเซนต์ พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 10–10,000 ไมโครโมลต่อลิตร (R^2 = 0.9952) ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ที่ 59.32 ไมโครโมลต่อลิตร และมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 94.99–103.29% สำหรับโหมดการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง มีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงฮีสทามีน 100–5,000 ไมโครโมลต่อลิตร (R^2 = 0.9947) ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ที่ 116.20 ไมโครโมลต่อลิตร และมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 97.67–106.88% นอกจากนี้เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างฮีสทามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลได้

คำสำคัญ : คลื่นความถี่อัลตราโซนิกควบคู่กับการรีดักชันทางเคมี เซนเซอร์เชิงสี เซนเซอร์การเรืองแสง อะลิซารินคอมเพล็กซ์ อนุภาคนาโนทอง ฮีสทามีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title Highly Sensitive and Selective Dual-Signal Colorimetric and Fluorometric Detection of Histamine in Seafood Products Using Alizarin Complexone-Modified Gold Nanoparticles
Student Name Miss Ampika Phoungsiri
Student ID 65056098
Degree Master of Science (Applied Chemistry)
Department Chemistry
Year 2024
Thesis Advisor Asst. Prof. Ekarat Detsri

Abstract

Alizarin complexone-modified gold nanoparticles (Au^0-NPs_{ALz}) were synthesized using an ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction method and used as a dual-mode chemosensor for determination of histamine. The synthesized Au^0-NPs_{ALz} had a uniform size of 17.84 ± 1.37 nm. In the detection process, Au^0-NPs_{ALz} were complexed with Ni (II), which has been found to strengthen the selectivity for histamine. The prepared Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) showed strong fluorescence intensity at the emission wavelength of 520 nm under the excitation wavelength of 430 nm and displayed a surface plasmon band at 535 nm. The detection strategy was based on colorimetric and fluorometric dual-mode detection. In the presence of histamine, Ni (II) can capture the histamine molecules with a covalent bond, resulting in a decrease in fluorescence intensity and an increase in absorbance with the change of solution color from red to purple. Under optimal conditions, the analytical performance of the sensor was investigated in terms of linearity, LOD, and recovery. The linear ranges were 10–10,000 μmol L^{-1} (R^2 = 0.9952) and 100–5,000 μmol L^{-1} (R^2 = 0.9947), the limits of detection (LODs) were found to be 59.32 μmol L^{-1} and 116.20 μmol L^{-1}, and the recoveries were found in the range 94.99–103.29% and 97.67–106.88%, for fluorometric and colorimetric detection, respectively. Moreover, the developed method was successfully applied to determination of histamine in seafood products.

Keywords: Alizarin complexone, Colorimetric sensor, Fluorometric sensor, Gold nanoparticles, Histamine, Ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากได้รับความกรุณาและความอนุเคราะห์ จาก รศ.ดร.เอกรัฐ เดชศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาดูแลอย่างใกล้ชิดและให้ความช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัย รวมถึงให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการจัดทำรูปเล่มโครงงานพิเศษ ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ และขอขอบพระคุณ ดร.คงอภิสิทธิ์ ทองพูนสมจิตต์ และ ผศ.ดร.อาจณรงค์ เมธาวีสรรเสริญ ประธานกรรมการ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ หน่วยวิจัยเคมีประยุกต์เชิงบูรณาการ หน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์รวมถึงสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย รวมถึงขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณ นักศึกษาปริญญาโท-เอก ทุกท่านในหน่วยวิจัยเคมีประยุกต์เชิงบูรณาการ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำช่วยเหลือแนวทางต่าง ๆ ในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ให้ได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน ให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษ รวมถึงขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ให้ความร่วมเหลือเป็นอย่างดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย และหากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้วิจัยขออภัยมา ณ ที่นี้

นางสาว อัมพิกา พ่วงศิริ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฒ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ฮีสทามีน	4
2.1.1 อาหารที่มีฮีสทามีนสูง	5
2.1.2 รูปแบบวิธีการวิเคราะห์ฮีสทามีนในปัจจุบัน	5
2.1.2.1 วิธีการมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ฮีสทามีน	5
2.1.2.2 รูปแบบการตรวจวัดเชิงสีสำหรับวิเคราะห์ฮีสทามีน	7
2.1.2.3 รูปแบบการตรวจวัดการเรืองแสงสำหรับวิเคราะห์ฮีสทามีน	8
2.2 อนุภาคนาโนทอง	9
2.2.1 ข้อมูลทั่วไป	9
2.2.2 โครงสร้างนาโน	10
2.2.3 คุณสมบัติทางแสง	11
2.2.4 การศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทอง	12
2.2.5 วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโน	15
2.2.5.1 การรีดักชันทางเคมี	15
2.2.5.2 Ultrasonic irradiation	16
2.3 คุณลักษณะการรักษาเสถียรภาพด้วยลิแกนด์ที่แตกต่างกัน	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 การปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองด้วยกลุ่ม Thiol / Thiolated และอนุพันธ์ 22
2.3.1.1 ไทออล (–SH) 22
2.3.1.1 ไฮดรอกซิล (–OH) และ คาร์บอกซิล (–COOH) 23
2.4 Alizarin Complexone 25
2.5 Dual-signal sensor: Fluorometric and colorimetric 25
2.5.1 การเพิ่มประสิทธิภาพ Analytical performance ด้วย Dual-signal sensor 26
2.5.2 การเพิ่มประสิทธิภาพการเลือกจำเพาะ (Selectivity) 27
2.5.2.1 แอนติบอดี (Antibody) 27
2.5.2.2 แอปทาเมอร์ (Aptamer) 28
2.5.2.3 Metal affinity 29
2.5.3 ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นใน Dual-signal sensor 34
2.5.3.1 Plasmon-enhanced fluorescence 34
2.5.3.2 การประยุกต์ใช้ปรากฏการณ์สำหรับ Dual-signal sensor 37
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 38
2.6.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยคลื่นความถี่อัลตราโซนิก 38
2.6.1.1 Sonochemical reduction method for controlled synthesis of metal nanoparticles in aqueous solutions 38
2.6.1.2 One-pot synthesis of gold nanorods via autocatalytic growth of sonochemically formed gold seeds: The effect of irradiation time on the formation of seeds and nanorods 40
2.6.1.3 Enhancement of sonochemical production of hydroxyl radicals from pulsed cylindrically converging ultrasound waves 42
2.6.2 การเพิ่มประสิทธิภาพการเรืองแสงด้วยอนุภาคนาโนโลหะ 43
2.6.2.1 Application of Metal-Enhanced Fluorescence Technology in Evanescent Wave Fluorescent Biosensor 43
2.6.2.2 Metal-Enhanced Fluorescence by Bifunctional Au Nanoparticles for Highly Sensitive and Simple Detection of Proteolytic Enzyme 46
2.6.3 หลักการตรวจวัดฮีสทามีนด้วยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง และ การเรือง 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3.1 Colorimetric sensing of histamine in aqueous solution by a system composed of alizarin complexone and Ni^{2+} complex via indicator displacement approach. 47

2.6.3.2 Selective fluorescence detection of histamine based on ligand exchange mechanism and its application to biomonitoring. 48

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 51

3.1 เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์ 51

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 51

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ 52

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 53

3.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วย ALz (Au^0-NPs_{ALz}) 53

3.2.1.1 ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} 53

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก 53

2. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยวิธีการรีดักชันทางเคมี 53

3.2.1.2 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาด รูปร่าง และความเสถียรภาพในการสังเคราะห์ 53

1. ศึกษาความเข้มข้นของ ALz ที่ใช้ในการรักษาเสถียรภาพ 53

2. ศึกษา %Sonic amplification ที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} 54

3. ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} 54

3.2.1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วย ALz 55

3.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีนโดยใช้ Dual-signal Au^0-NPs_{ALz} sensor 55

3.2.2.1 ศึกษาสภาวะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดฮีสทามีนด้วย Au^0- 55

1. การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของ Au^0-NPs_{ALz} 55

2. การศึกษาประเภทไอออนของโลหะทรานซิชัน 55

3. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ นิกเกิล (II) คลอไรด์ 56

4. การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด 56

5. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ 56

6. การศึกษาลำดับในการตรวจวัดฮีสทามีน 57

7. การศึกษาเวลาในการตรวจวัดฮีสทามีน 57

3.2.2.3 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ 57

3.2.3 ศึกษาร้อยละการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (%Recovery) ในตัวอย่างอาหารทะเลโดยใช้ Au^0-NPs_{ALz} 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณฮีสทามีนด้วยเทคนิค HPLC 59
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 61
4.1 การสังเคราะห์ Au^{0}-NPs_{ALz} 63
4.1.1 กลไกการสังเคราะห์ Au^{0}-NPs_{ALz} 63
4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ Au^{0}-NPs_{ALz} 65
4.1.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของ ALz 65
4.1.2.2 ศึกษา %Sonic amplification ที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^{0}-NPs_{ALz} 67
4.1.2.3 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^{0}-NPs_{ALz} 69
4.1.2.4 ศึกษาเสถียรภาพของ Au^{0}-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ได้ 70
4.1.3 พิสูจน์เอกลักษณ์ของ Au^{0}-NPs_{ALz} 71
4.2 หลักการตรวจวัดฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทอง 76
4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดฮีสทามีนด้วย Au^{0}-NPs_{ALz} 80
4.3.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Au^{0}-NPs_{ALz} 80
4.3.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ นิกเกิล (II) คลอไรด์ 80
4.3.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด 80
4.3.4 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ 81
4.3.5 การศึกษาลำดับในการตรวจวัดฮีสทามีน 81
4.3.6 การศึกษาเวลาในการตรวจวัดฮีสทามีน 82
4.4 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ 85
4.4.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดฮีสทามีนด้วย Au^{0}-NPs_{ALz} 85
4.4.2 ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ 86
4.4.3 ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) 87
4.4.4 การศึกษาความเลือกจำเพาะของวิธี 87
4.4.5 การตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างจริง 88
4.4.6 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณฮีสทามีนด้วย 90
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 92
เอกสารอ้างอิง 93
ภาคผนวก ก 100
ภาคผนวก ข 103
ภาคผนวก ค 113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง 126
ประวัติผู้เขียน 137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทอง 13

2.2 การรักษาเสถียรภาพอนุภาคนาโนด้วยประจุของลิแกนด์ชนิดต่างๆ 21

2.3 ค่าคงที่ของการโปรโตเนตและความเสถียร β_{pqrs} ([$M_pA_qB_rH_s$]λ([M]^p[A]^q[B]^r[H]^s) ของคอมเพล็กซ์หลัก ฮิสทิดีน (His) ฮีสทามีน (Him) และไกลซีน (Gly) ที่ (25.0 ± 0.1) °C และ I = 0.10 M (KCl) 31

2.4 ค่าคงที่เสถียรภาพ β_{pqrs} ([$M_pA_qB_rH_s$]λ([M]^p[A]^q[B]^r[H]^s) ของคอมเพล็กซ์ลิแกนด์ผสมกับฮีสทิดีน (His) ฮีสทามีน (Him) และไกลซีน (Gly) ที่ (25.0 ± 0.1) °C และ I = 0.10 M (KCl) 35

3.1 รายละเอียดสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 51

3.2 ความเข้มข้นต่างๆ ของ ALz ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง 54

3.3 เวลาต่างๆที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง 54

3.4 เครื่องมือพิสูจน์เอกลักษณ์ 55

3.5 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ 58

3.6 เงื่อนไขของ High-Performance Liquid Chromatography, HPLC 60

4.1 Binding energies ของ C 1s และ O 1s, และ Δ (eV) ของ ALz และ Au^0-NPs_{ALz} 74

4.2 สภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อการตรวจวัดหาปริมาณฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทอง 85

4.3 แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการตรวจวัดสารละลายฮีสทามีน 86

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล 89

4.5 Anova: Single Factor 90

4.6 ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นเทียบกับงานวิจัยต่างๆ 91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่		หน้า
2.1	การเกิดพอลิเมอไรเซชันของโดพามีนที่ตอบสนองต่อเอมีนบนพื้นผิวของ AuNPs ที่ใช้ในการติดตามความสดของกุ้งด้วยการวัดสี	7
2.2	รูปแบบโปรโตเนชันที่แตกต่างกันของฮีสทามีน	8
2.3	กลไกการเกิดสารประกอบ Isoindole ในปฏิกิริยาที่นำเสนอ	9
2.4	การจำแนกประเภทของวัสดุนาโนตามระบบมิติ	10
2.5	เสียงสะท้อนพลาสมอนพื้นผิวแสดงการสั่นสะเทือนของกลุ่มอิเล็กตรอนในแถบเหนี่ยวนำเมื่อแสงจากภายนอกส่องผ่าน	12
2.6	กลไกของการรีดักชันของทอง (A) ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ (B) การดีคาร์บอกซิเลชันและการลดของสปีชีส์ Au(III) และ (C) ความไม่สมดุลของสปีชีส์ aurous และการก่อตัวของอะตอม Au(O) ในเวลาต่อมา	16
2.7	กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีของโมเลกุลน้ำที่เกิดขึ้นภายใต้การให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิก	17
2.8	ภาพแสดงการสังเคราะห์ AuNPs ในการสร้างนิวเคลียสและการเจริญเติบโตที่ส่งเสริมโดยผลทางโซโนเคมีคัลในการฉายรังสีอัลตราโซนิก	18
2.9	บทบาทต่างๆ ของลิแกนด์ในงานเกี่ยวกับอนุภาคนาโนสำหรับการใช้งานในด้าน	19
2.10	(A) ภาพ HR-TEM แสดงขอบโครงตาข่าย (Lattice fringes) ของ AuNPs ขนาด 2 นาโนเมตร และ (B) ภาพการกระจายตัวของ AuNPs และฮิสโทแกรมการกระจาย	22
2.11	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองตัวอย่าง (Au NPs) และรักษาเสถียรภาพด้วย 1,4-dithiothreitol (Au-DTT NPs) และ l-glutathione (Au-GSH	23
2.12	(A) ภาพ TEM ของ AuNPs ที่สังเคราะห์โดยใช้ SC, TA และสารรีดิวซ์ผสม (B) แถบ LSPR ของอนุภาคนาโนทอง (C) ภาพ HR-TEM ของ AuNPs และ (D) ฮิสโทแกรม	24
2.13	โครงสร้างทางเคมีของ Alizarin Complexone	25
2.14	แผนผังแสดงเทคนิคการตรวจวิเคราะห์แบบสองโหมดด้วยฟลูออโรเมตริกและการวัดสีด้วยสายตาของไนไตรต์ในตัวอย่างอาหาร	27
2.15	ภาพประกอบแผนผังของการตรวจวัดฮีสทามีนโดยใช้ Fe&Co co-doped CDs ที่มี	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.16 (A) ลำดับแอปทาเมอร์ A1-949 และโครงสร้างทุติยภูมิที่ทำนายโดย Mfold (B) ภาพประกอบแผนผังของการออกแบบฮีสทามีนแอปทาเซนเซอร์ ฮีสทามีนแอปทาเมอร์ (สีน้ำเงิน) ติดฉลากเรืองแสงที่ปลาย 5′ และไฮบริดไดซ์กับ Quencher DNA strand การจับกันของฮีสทามีนกับแอปทาเมอร์ทำให้ Quencher strand เคลื่อนที่ 29

2.17 โครงสร้างทางเคมีของ ฮีสทิดีน ฮีสทามีน และ ไกลซีน ตามลำดับ 30

2.18 ความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของค่าคงที่เสถียรภาพ log β_{1100} และ log β_{1200} สำหรับฮีสทิดีน ฮีสทามีน และไกลซีน กับสารเชิงซ้อน Ni(II), Cu(II) และ Zn(II) และเลขอะตอมของโลหะที่ใช้ [(▲) ฮีสทิดีน (■) ฮีสทามีน (●) ไกลซีน สำหรับค่า log β_{1100} และ (△) ฮีสทิดีน (□) ฮีสทามีน (○) ไกลซีน สำหรับค่า log β_{1200} 32

2.19 (A) เกิดการสั่นพ้องของพลาสมอนบนพื้นผิวเฉพาะที่ เมื่ออนุภาคนาโนโลหะมีขนาดเล็กกว่าความยาวคลื่นตกกระทบ (B) การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนที่มีขนาดมากกว่า 15 นาโนเมตร (C) การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กกว่า 15 นาโนเมตร (D) พลาสมอนทับซ้อนกับการดูดกลืนของฟลูออโรฟอร์ การเพิ่มการกระตุ้นจะเกิดขึ้นได้ผ่านสนามใกล้และ FRET หรือการกระเจิง (E) พลาสมอนทับซ้อนกับการปล่อยของสารเรืองแสง การเพิ่มการเปล่งแสงจะเกิดขึ้นได้ผ่านเอฟเฟกต์เพอร์เซลล์หรือ FRET (F) การเพิ่มการกระตุ้น (เส้นสีแดง) จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ห่างไกล ในขณะที่การเพิ่มการเรืองแสง (เส้นสีน้ำเงิน) จะถูกดับลงเมื่ออยู่ห่างไกล (G) รัศมีทรงกลมที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกระตุ้น (เส้นสีแดง) การเรืองแสง (เส้นสีเขียว) และการเพิ่มการเรืองแสงรวม (เส้นสีดำ) จะแตกต่างกันไปตามความสมดุลระหว่างการดูดกลืนและการกระเจิง 35

2.20 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง การกระตุ้นการเรืองแสงและการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz} 37

2.21 การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนของสารละลาย MnO_4 ในน้ำระหว่างการฉายรังสีอัลตราโซนิกภายใต้บรรยากาศอาร์กอน 39

2.22 (A) การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนของสารละลาย MnO_4 ในน้ำระหว่างการฉายรังสีอัลตราโซนิกภายใต้บรรยากาศ Ar (B) ผลกระทบของเวลาการฉายรังสีและเวลาการทิ้งไว้ต่อจากนั้นต่อ Extinction และ (C) ต่อความยาวคลื่นจุดสูงสุดของการสั่นพ้องพลาสมอนตามยาว 41

2.23 ภาพ TEM ของอนุภาคนาโนทองแท่งที่ผลิตขึ้นจากเมล็ดทองคำซึ่งก่อตัวหลังจากการฉายรังสีอัลตราโซนิกเป็นเวลา (A) 0.5, (B) 1, (C) 3, (D) 10 และ (E) 15 นาที 42

2.24 ความเข้มข้นของ HO• ที่ความดันต่างกัน 43

2.25 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคนาโนโลหะและสารเรืองแสง 44

2.26 ผลของระยะห่างระหว่างอนุภาคนาโนโลหะและฟลูออโรฟอร์ 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.27 ภาพจำลอง MEF-based caspase-3 ไบโอเซนเซอร์ 46

2.28 กลไกการตรวจวัดฮีสทามีน 47

2.29 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ ALz-Ni (II) ตามความเข้มข้นของฮีสทามีนตั้งแต่ 0-300 ไมโครโมลต่อลิตรใน 10 มิลลิโมลต่อลิตรของ CHES buffer ที่ pH 10.0 (B) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรของ ALz-Ni(II) ตามความเข้มข้นของฮีสทามีนที่สอดคล้องกัน 48

2.30 กลไกการตรวจวัดฮีสทามีนโดยใช้สารประกอบ 1 49

2.31 ความเลือกจำเพาะของสารประกอบ 1 สำหรับฮีสทามีน (A) การตอบสนองของการเรืองแสงของสารประกอบ 1 ต่อสารสื่อประสาทต่างๆ (B) ภาพถ่ายของสารประกอบ 1 ที่มีและไม่มีโดปามีน GABA ไกลซีน กรดกลูตามิก ฮีสตามีน เซโรโทนิน (C) 49

4.1 (A) ภาพประกอบแผนผังของการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}, (B)-(C) กลไกการตรวจวัดฮีสทามีน 62

4.2 (A) กลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง ไอออนเตตระคลอโรออเรต $[AuCl_4]^-$ กับสารประกอบ ALz (B) กลไกการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} โดยวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก 63

4.3 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ (A) $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes ภายใต้การให้คลื่นอัลตราโซนิก, (B) $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes ภายใต้สภาวะที่ไม่มีคลื่นอัลตราโซนิก, (C) Au^0-NPs_{ALz} ที่ได้จากวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก และ (D) Au^0-NPs_{ALz} ที่ได้จากวิธีการรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียว 64

4.4 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารรักษาเสถียรภาพ (B) ภาพ TEM ของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ด้วย ALz ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และ ฮิสโทแกรมการกระจายตัวของขนาดอนุภาค 66

4.5 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} ที่ %Sonic amplification ต่างในการสังเคราะห์ (B) ภาพ TEM ของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ %Sonic amplification ที่แตกต่างกันในการสังเคราะห์ และฮิสโทแกรมการกระจายของขนาดอนุภาค 68

4.6 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิกเทียบกับวิธีการรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียว (B) ภาพ TEM ของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีเพียงอย่าง 69

4.7 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} ที่เวลาแตกต่างกันในการสังเคราะห์ (B) ภาพ TEM ของ Au^0-NPs_{ALz} ที่เวลาแตกต่างกันในการสังเคราะห์และฮิสโทแกรมการกระจายของขนาดอนุภาค 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 (A) กราฟจุดพลอตระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และ ค่าการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz} เทียบกับจำนวนวันในการเก็บสารละลายหลังการสังเคราะห์ และ (B) กราฟศักย์ซีตา 71

4.9 คุณลักษณะ Au^0-NPs_{ALz} (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสง และการกระตุ้นและการเรืองแสง (B) Time-resolved fluorescence (B1) ALz, (B2) Au^0-NPs_{ALz}, (B3) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes และ (B4) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine. (C) สเปกตรัมเรืองแสง 3 มิติของ (C1) ALz, (C2) Au^0-NPs_{ALz}, (C3) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes และ (C4) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine 72

4.10 XPS สเปกตราของ Au^0-NPs_{ALz} (A) XPS survey (B) สเปกตรัมความละเอียดสูง XPS ของ Au 4f และ Deconvolution ของ สเปกตรัมความละเอียดสูง XPS (C) O 1s และ (D) C 1s XPS สเปกตราของสารประกอบ ALz อิสระ (E) XPS survey และ Deconvolution ของ สเปกตรัมความละเอียดสูง XPS (F) O 1s (G) C 1s 74

4.11 (A) สเปกตรัมรามานของ (i) ALz, (ii) Au^0-NPs_{ALz}, (iii) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes และ (iv) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine, (B) รูปแบบ XRD ของ -- ALz และ -- Au^0-NPs_{ALz}. และ (C) ภาพ SAED, HR-TEM, TEM และภาพการทำแผนที่องค์ประกอบที่แทรกสเปกตรัม EDX 76

4.12 กลไกการตรวจวัดฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทอง 77

4.13 การเกิดโคออร์ดิเนตชั่นของ Au^0-NPs_{ALz} กับไอออนโลหะทรานซิสชั่นและฮีสทามีนที่ความเข้มข้น 5000 ไมโครโมลต่อลิตร (A) Colorimetric response (B) Fluorometric response 78

4.14 การดูดกลืนแสง (A) และ การเรืองแสง (B) ของ -- ALz, -- Au^0-NPs_{ALz}, -- Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes และ -- Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine. 79

4.15 ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของ Au^0-NPs_{ALz} สำหรับการตรวจวัดฮีสทามีนในโหมด Fluorometric responses (A) ความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz}; 0.33-1.69 นาโนโมลต่อลิตร, (B) ความเข้มข้นของ Ni (II); 200-1,000 ไมโครโมลต่อลิตร, (C) พีเอชของบัฟเฟอร์; 4-7, (D) ความเข้มข้นของ Acetate buffer; 5, 10, and 15 มิลลิโมลต่อลิตร, (E) ลำดับสำหรับการตรวจวัด; (Condition 1: ◘) Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Histamine, Acetate buffer และ (Condition 2: ◘) Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Acetate 83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.16 ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของ Au^0-NPs_{ALz} สำหรับการตรวจวัดฮีสทามีนในโหมด Colorimetric responses (A) ความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz}; 0.33-1.69 นาโนโมลต่อลิตร, (B) ความเข้มข้นของ Ni (II); 200-1,000 ไมโครโมลต่อลิตร, (C) พีเอชของบัฟเฟอร์; 4-7, (D) ความเข้มข้นของ Acetate buffer; 5, 10, and 15 มิลลิโมลต่อลิตร, (E) ลำดับสำหรับการตรวจวัด; (Condition 1: ■) Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Histamine, Acetate buffer และ (Condition 2: ■) Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Acetate buffer, Histamine และ (F) เวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัด 84

4.17 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสง และ กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} ในการตรวจวัดฮีสทามีนที่ช่วงความเข้มข้น 100-5000 ไมโครโมลต่อลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ (B) สเปกตรัมการเรืองแสง และ กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนและค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตร ของสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} ในการตรวจวัดฮีสทามีนที่ช่วงความเข้มข้น 10-10000 ไมโครโมลต่อลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ 86

4.18 การเลือกจำเพาะของ Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor สำหรับการตรวจจับฮีสทามีนในผลิตภัณฑ์อาหารและ (A) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร (B) ค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยความเข้มข้นของสารรบกวนถูกควบคุมให้สูงกว่าความเข้มข้นของฮีสทามีน (1,000 ไมโครโมลต่อลิตร) 50 เท่า 88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ	คำอธิบาย
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
MS	Mass spectrometry
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assays
ALz	Alizarin complexone
SPR	Surface plasmon resonance (การสั่นพ้องของพลาสมอนที่พื้นผิว)
LDSs	Low-dimensional systems (ระบบมิติต่ำ)
$[AuCl_4]^-$	ไอออนเตตระคลอโรออเรต
$[Au(ALz)Cl_2]^-$	สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจาก ไอออนเตตระคลอโรออเรต และ ALz
AuNPs	อนุภาคนาโนทอง
Au^0-NPs_{ALz}	อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วยอะลิซาริน
Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes	สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจาก Au^0-NPs_{ALz} และ โลหะนิกเกิล (II)
Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine	สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจาก Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) และ ฮีสทามีน
$(Au^0)_m$-NPs_{ALz}	นิวเคลียสของอนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วยอะลิซาริน
$(Au^0)_{m+n}$-NPs_{ALz}	การเติบโตของคลัสเตอร์นาโนทองคำที่รักษาเสถียรภาพด้วยอะลิซาริน
%RSD	Relative Standard Deviation (ความเที่ยงของการวิเคราะห์)
LOD	Limit of detection (ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด)
LOQ	Limit of quantitation (ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ)
%Recovery	ร้อยละการคืนกลับ
FRET	Fluorescence resonance energy transfer (การถ่ายเทพลังงานเรโซแนนซ์ฟอสเตอร์)
PEF	Plasmon-enhanced fluorescence (การเรืองแสงที่เสริมด้วยพลาสมอน)
MEF	Metal-enhanced fluoresecence (การเรืองแสงที่เสริมด้วยโลหะ)
LDOS	Local density of optical states
%Amp	%Sonic amplification
Dual-signal sensor	เซนเซอร์สองโหมดการตรวจวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฮีสทามีน ($C_5H_9N_3$) เป็นสารประกอบเอมีนทางชีวภาพที่เป็นพิษตามธรรมชาติ ซึ่งนิยมใช้เป็นสารบ่งชี้การเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ฮีสทามีนจะถูกผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อของสัตว์ทะเล เช่น ปลา กุ้ง และหอย โดยผ่านกระบวนการ Decarboxylation ของฮิสทิดีน ($C_6H_9N_3O_2$) ในปลาบางประเภทสามารถผลิตสารฮีสทามีนได้มาก เช่น ทูน่า ปลาแมคเคอเรล มาฮิมาฮิ ปลาซาร์ดีน และแอนโชวี่ รวมไปถึงอาหารทะเลสดที่มีฮิสทิดีนอยู่ หากสภาวะเอื้อต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ฮิสทิดีนในอาหารทะเลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นฮีสทามีนโดยแบททีเรีย [1] การบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อนสารฮีสทามีนในระดับสูงอาจทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่าพิษจากฮีสทามีนได้ (Scrombotoxicity) อาการพิษของฮีสทามีนมักเกิดขึ้นภายในไม่กี่นาที ถึงไม่กี่ชั่วโมงหลังการบริโภคอาหารทะเลที่ปนเปื้อน และอาจรวมถึงอาการหน้าแดง ปวดศีรษะ เหงื่อออก เวียนศีรษะ อาเจียน ท้องร่วง และในกรณีที่รุนแรงอาจหายใจลำบาก [2] กฎระเบียบในแต่ละประเทศสำหรับระดับฮีสทามีนที่ยอมรับได้สูงสุดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลคือ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [3] และหากระดับฮีสทามีนมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มักจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสุขภาพ [3, 4] การตรวจวัดปริมาณฮีสทามีนในอาหารทะเลจึงมีความสำคัญในการลดความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการได้รับฮีสทามีนในปริมาณที่มากเกินไป มีหลากหลายงานวิจัยเสนอวิธีพัฒนาการตรวจวัดฮีสทามีน ซึ่งรวมถึง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) [5-7] หรือ Mass spectrometry (MS) [8-10] วิธีการเหล่านี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและผู้เชี่ยวชาญ อีกทั้งไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ภาคสนาม นอกจากนี้ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างของวิธีการเหล่านี้ยังมีความซับซ้อนอีกด้วย จากข้อเสียของวิธีดังกล่าว ได้มีการพัฒนาวิธีในการตรวจวัดโดยการใช้เทคนิค Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) [11] ซึ่งมีความถูกต้อง แม่นยำสูง อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีนี้คือ เอนไซม์มีความคงตัวต่ำ เกิดการเสียสภาพได้ง่าย

ปัจจุบัน วัสดุนาโน เช่น อนุภาคนาโนทองถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นเซนเซอร์ตรวจวัดเชิงสี เนื่องจากคุณสมบัติทางแสงที่เป็นเอกลักษณ์ (Surface Plasmon Resonance, SPR) ส่งผลให้อนุภาคนาโนแสดงสีที่แตกต่างกันตามขนาด รูปร่าง และสารตัวกลางโดยรอบ เช่น สารคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนทองขนาดเล็กในตัวกลางที่เป็นน้ำจะแสดงสีของเป็นสีแดง แต่เมื่ออนุภาคทองนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้น หรือเกิดการรวมตัวกันของอนุภาค สีของสารคอลลอยด์จะเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง ด้วยคุณสมบัตินี้ ทำให้อนุภาคทองนาโนเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นเซนเซอร์ตรวจวัดเชิงสีในงานด้านต่างๆ อาทิ สิ่งแวดล้อม อาหาร และตัวอย่างทางชีววิทยา [12-14]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ จากงานวิจัยของ F. Yasumasa และคณะ [15] ได้มีการศึกษาการตรวจวัดฮีสทามีนโดยใช้ Alizarin complexone (ALz) ที่มีการเติมนิกเกิล (II) (Ni (II)) พบว่ามีความจำเพาะสูงต่อการตรวจวัดฮีสทามีน จากข้อดีของอนุภาคนาโนทองและ ALz งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่ใช้ ALz เป็นสารรักษาเสถียรภาพ เพื่อใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีในการตรวจหาฮีสทามีนในอาหารทะเล โดยอนุภาคนาโนทองถูกสังเคราะห์โดยใช้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกควบคู่กับวิธีการรีดักชันทางเคมี โดยโกลด์ (III) คลอไรด์ไตรไฮเดรต และ ALz จะถูกทำให้เกิดเป็นสารประกอบ $[Au(ALz)Cl_2]^-$ ด้วยแรงเชิงกลจากความถี่อัลตราโซนิก จากนั้นจะถูกรีดิวซ์โดยการรีดักชันทางเคมีด้วย $NaBH_4$ จนได้เป็นอนุภาคนาโนทองที่มี ALz เป็นสารรักษาเสถียรภาพ ซึ่งจะถูกนำไปใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีตรวจวัดแบบสองโหมดสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีน โดยกลไกการตรวจวัด เริ่มแรกจะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Au^0-NPs_{ALz} และ Ni (II) ก่อน จากนั้นเมื่อเติมฮีสทามีนลงในระบบ ฮีสทามีนจะเกิดการสร้างพันธะโคคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับ Ni (II) ส่งผลให้การเกิดฟลูออเรสเซนต์ของ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) ลดลง ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงจะสูงขึ้น ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของฮีสทามีน และสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีม่วง จากปฏิกิริยานี้ทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้แบบสองโหมด คือ การติดตามการลดลงของฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เมื่อใช้พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ การติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่สูงขึ้นที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้จะประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดฮีสทามีนในอาหารทะเล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วย Alizarin complexone ภายใต้การรีดักชันทางเคมีควบคู่กับการให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิก
2. เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์การดูดกลืนแสง และ การเรืองแสงของอนุภาคนาโนทอง
3. เพื่อพัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีในโหมดการดูดกลืนแสง และ การเรืองแสง ผ่านตัวกลางเลือกจำเพาะ นิกเกิล (II) สำหรับตรวจวัดฮิสทามีน
4. เพื่อประยุกต์ใช้เซนเซอร์ทางเคมีตรวจวัดแบบสองโหมดในการตรวจวัดหาปริมาณฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเลจริง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทบทวนวรรณกรรม
2. ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยใช้ ALz เป็นสารรักษาเสถียรภาพโดยใช้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกควบคู่กับการรีดักชันทางเคมี
3. ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ศึกษากลไกการตรวจวัดฮีสทามีนโดยใช้อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นเซนเซอร์ทางเคมีตรวจวัดแบบสองโหมด
5. ศึกษาคุณลักษณะเด่นของวิธี (Analytical performance)
6. ประเมินความถูกต้องของวิธีโดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน High-performance liquid chromatography, HPLC
7. ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วย ALz เป็นเซนเซอร์ทางเคมีตรวจวัดแบบสองโหมดสำหรับรตรวจวัดฮีสทามีน
2. วิธีอย่างง่ายและรวดเร็วในการวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ฮีสทามีน

ฮีสทามีนเป็นสารตัวกลางที่เก็บไว้ในเม็ดไซโตพลาสซึมของเบโซฟิลและแมสต์เซลล์ เมื่อเซลล์เหล่านี้ถูกกระตุ้น ฮีสทามีนจะถูกปล่อยออกมา การกระตุ้นนี้สามารถเกิดขึ้นได้จากการจับกันของแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน อี (IgE) กับตัวรับจำเพาะบนพื้นผิวของเบโซฟิลและแมสต์เซลล์ นอกจากนี้การปล่อยฮีสทามีนสามารถถูกกระตุ้นโดยสารลดขนาดต่างๆ รวมถึงส่วนประกอบเสริม, นิวโรเปปไทด์และไซโตไคน์ [3] ซึ่งฮีสทามีนมีหน้าที่ควบคุมการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และทำให้หลอดเลือดขยายตัว แต่ถ้าร่างกายได้รับฮีสทามีนมากเกินไปจะเกิดความเป็นพิษและอาการเจ็บป่วยขึ้น นอกจากฮีสทามีนที่ผลิตขึ้นเองภายในร่างกายแล้ว มนุษย์ยังสามารถรับฮีสทามีนได้จากการบริโภคสิ่งต่างๆ เข้าสู่ร่างกาย อาทิ ยา สารเคมี สี พิษจากพืชหรือสัตว์บางชนิด รวมทั้งในอาหารบางประเภท เช่น ปลาในตระกูลสคอมบรอยด์ (Scombroid fish) ได้แก่ ปลาทูน่าและปลาแมคเคอเรล เป็นต้น การบริโภคปลาในกลุ่มนี้ซึ่งมีฮีสทามีนในปริมาณสูง หรือที่เรียกว่า สารพิษสคอมบรอยด์ (Scombrotoxin) จะทำให้เกิดอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง ปวดศีรษะ หัวใจเต้นแรง ความดันต่ำ รวมทั้งมีอาการปวดแสบปวดร้อนบริเวณปากและมีผื่นแดง ซึ่งอาการเหล่านี้อาจเกิดขึ้นได้ภายใน 2-3 นาที หรือนาน 2-3 ชั่วโมงหลังการบริโภคปลาที่มีฮีสทามีนสูง ส่วนใหญ่อาการจะปรากฏอยู่เพียง 2-3 ชั่วโมง หรืออาจนานหลายวันกว่าจะหาย ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของอาการ เนื่องจากโปรตีนในเนื้อปลากลุ่มนี้จะมี อะมิโนฮีสตีดีน (Histidine) เป็นองค์ประกอบอยู่มาก เมื่อเทียบกับในอาหารทะเลอื่นๆ โดยในปลาทูน่าเมื่อปลาตายจะมีการเปลี่ยนแปลงหรือเน่าเสียโดยการกระทำของน้ำย่อยที่มีอยู่ในตัวปลาเองและการเน่าเสียเนื่องมาจากการกระทำของแบคทีเรียบางชนิดที่เกาะตามผิวหนัง เหงือก และ ลำไส้ของปลาซึ่งสามารถสร้างน้ำย่อยดีคาร์บอกซิเลททิ่ง (Decarboxylating enzyme) ที่สามารถเปลี่ยนฮีสตีดีนให้เป็นฮีสตามีน โดยปริมาณฮีสตามีนที่เกิดจะมากหรือน้อยขึ้นกับสภาวะแวดล้อม อุณหภูมิ พันธุ์ปลา

ฮีสทามีนเป็นหนึ่งในสารสื่อประสาทที่สำคัญซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเคมีในการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ปฏิกิริยาการอักเสบ การทำงานของระบบไหลเวียนโลหิต และภูมิแพ้ในระบบทางชีววิทยา ฮีสทามีนในระดับสูงในร่างกายมนุษย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่น โรคประสาทจิตเวช โรคภูมิแพ้ หอบหืด สมองขาดเลือด และโรคอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ ฮีสทามีนยังมีอยู่ในอาหารและเครื่องดื่มหมักบางชนิดเนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์ และระดับที่ผิดปกติของฮีสทามีนอาจทำให้อาหารเป็นพิษได้ [16] ในกรณีส่วนใหญ่ ความเข้มข้นของฮีสทามีนที่มากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน และปวดศีรษะได้ โดยเฉพาะสำหรับผู้ที่ร่างกายไม่สามารถสลายฮีสทามีนได้ [17] ดังนั้นการระมัดระวังการรับประทานอาหารที่มีฮีสทามีนปริมาณสูงเป็นสิ่งที่ควรระมัดระวังอย่างยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 อาหารที่มีฮีสทามีนสูง

ระดับฮีสทามีนในอาหารอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ อาทิ ความสดของอาหาร วิธีการแปรรูป สภาพการเก็บรักษา และกิจกรรมของจุลินทรีย์ อาหารบางชนิดมีฮีสทามีนสูงตามธรรมชาติ ในขณะที่อาหารบางชนิดสามารถสะสมฮีสทามีนได้เมื่อผ่านกระบวนการบางอย่างหรือจัดเก็บอย่างไม่เหมาะสม ตัวอย่างอาหารที่อาจมีฮีสทามีนสูง เช่น

1. อาหารหมักดอง เป็นที่รู้กันว่ามีระดับฮีสทามีนสูง เนื่องจากการทำงานของแบคทีเรียที่สร้างฮีสทามีน ตัวอย่าง ได้แก่ ชีสหมัก (เช่น บลูชีส เชดดาร์ และสวิส) ไส้กรอกหมัก (ซาลามิ เปปเปอโรนี) ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองหมัก (มิโซะ ซีอิ๊ว) และกะหล่ำปลีดอง
2. ปลาและอาหารทะเล บางประเภทมีระดับฮีสทามีนสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากไม่ได้รับการจัดการหรือจัดเก็บอย่างเหมาะสม ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาทูน่า ปลาแมคเคอเรล มาฮิมาฮิ ปลาซาร์ดีน แอนโชวี่ และผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (เช่น น้ำปลา) [18]
3. สัตว์ทะเลที่มีกระดอง โดยเฉพาะบางชนิดอาจมีระดับฮีสทามีนสูง ตัวอย่าง ได้แก่ กุ้ง ล็อบสเตอร์ ปู [19]
4. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์หมัก บางชนิดที่ผ่านกระบวนการหมักอาจมีปริมาณฮีสทามีนเพิ่มขึ้น ซึ่งรวมถึงไวน์ (โดยเฉพาะไวน์แดง) เบียร์ (โดยเฉพาะคราฟต์เบียร์) และแชมเปญ
5. ผักดองและกิมจิ อาจมีระดับฮีสทามีนสูงขึ้นเนื่องจากกระบวนการหมัก
6. เนื้อสัตว์แปรรูป เนื้อสำเร็จรูป แฮมหมัก และฮอทด็อก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อแปรรูปที่ผ่านกระบวนการบ่มหรือการหมัก
7. ผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น ส้ม มะนาว และเกรปฟรุต โดยผลไม้เหล่านี้ไม่ได้มีสารฮีสทามีนสูงโดยตัวมันเอง แต่กรดในผลไม้สามารถกระตุ้นการปล่อยฮีสทามีนในบางคนที่ไวต่อฮีสทามีนได้

นอกจากนี้ ความสด การเก็บรักษาที่เหมาะสม และการจัดการอาหารสามารถช่วยลดการสะสมฮีสทามีนได้

2.1.2 รูปแบบวิธีการวิเคราะห์ฮีสทามีนในปัจจุบัน

การพึงระวังรับประทานอาหารที่มีปริมาณฮีสทามีนสูงเป็นสิ่งที่จำเป็นในปัจจุบัน ดังนั้นการพัฒนารูปแบบวิธีวิเคราะห์ฮีสทามีนเป็นส่วนช่วยสำคัญในการประเมินปริมาณฮีสทามีน เพื่อหลีกเลี่ยงการบริโภคได้ดียิ่ง

2.1.2.1 วิธีการมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ฮีสทามีน

1. International standard ISO 19343 [20]

วิธีการนี้ช่วยให้สามารถแยกฮีสทามีนและสารประกอบเอมีนอื่นๆ ในปลา อาหารทะเล และผลิตภัณฑ์ประมงได้ ตัวอย่างจะถูกสกัดโดยการผสมกับกรดเปอร์คลอริก และทำให้เกิดสารอนุพันธ์ก่อนการแยกโดยใช้แดนซิลคลอไรด์ จากนั้นสารประกอบเอมีนและส่วนประกอบอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสารละลายจะถูกแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้สภาวะในการแยก คือ คอลัมน์ C18 5 µm 100 Å (25 cm × 4.6 mm) อุณหภูมิคอลัมน์ 25 ± 2°C ใช้ UV detector ตรวจวัดที่ความยาคลื่น 254 นาโนเมตร ความเข้มข้นของฮีสทามีนคำนวณจากอัตราส่วนพื้นที่พีคของฮีสทามีนและมาตรฐานภายในด้วยกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

A. การเตรียมตัวอย่าง: ทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันโดยการบดในเครื่องผสม ถ่ายโอนส่วนทดสอบ 5 กรัม ± 0.1 กรัม ในหลอดปั่นเหวี่ยง

B. การสกัด: เติมกรดเปอร์คลอริก 0.2 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ 1,7-ไดอะมิโนเฮปเทน 6.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง 5 กรัมในหลอดปั่นเหวี่ยง หลังจากการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยสมบูรณ์นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 กรัม เป็นเวลา 5 นาทีที่ 4 °C

C. การติดฉลากอนุพันธ์: ถ่ายสารละลายเหนือตะกอน 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคาร์บอเนต 300 ไมโครลิตร และสารละลายแดนซิลคลอไรด์ 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร หลังจากนั้น Vortex และ Incubate เป็นเวลา 5 นาทีในความมืดที่อุณหภูมิ 60 °C ลดอุณหภูมิสารละลายด้วยการหล่อเย็น และเติมสารละลายแอล-โพรลีน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร จากนั้น Vortex และเก็บหลอดไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที เติมโทลูอีน 500 ไมโครลิตร และ Vortex ถ่ายโอนเฟสอินทรีย์ส่วนบนให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ในหลอดใหม่ และทำให้แห้งในตู้ควันด้วยกระแสไนโตรเจน สกัดอีกครั้งด้วย 200 ไมโครลิตรของอะซิโตไนไตรล์/น้ำ (60/40) และ Vortex ในขั้นตอนสุดท้าย กรองสารละลายและเก็บในขวดแก้ว (Vial)

2. วิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิคมาตรฐาน HPLC

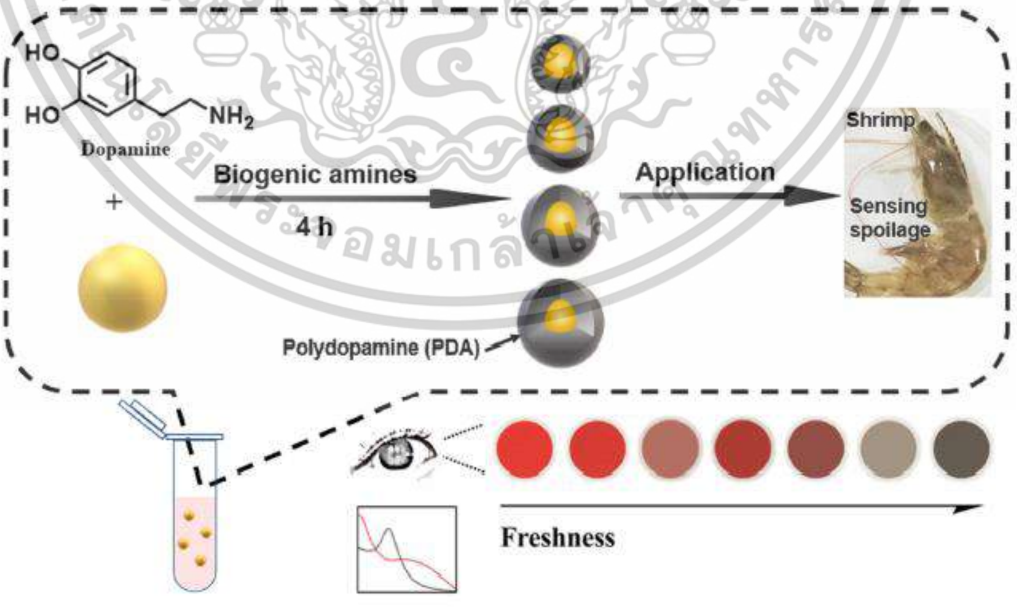
ในปัจจุบัน เทคนิค HPLC ยังคงเป็นวิธีเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฮีสทามีน อีกทั้งยังได้รับการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ จากงานวิจัยของ Sevim Köse และคณะ [21] ได้พัฒนาวิธีการสกัด และการวิเคราะห์ฮีสทามีนโดยปรับปรุงจากวิธีมารตฐานดังนี้ (1) บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน (2) สกัดตัวอย่างด้วย 0.4 โมลต่อลิตรของกรดเปอร์คลอริกและปั่นเหวี่ยงสองครั้งที่ 2440g ในสภาวะน้ำแข็ง (0–4 °C) (3) ติดฉลากอนุพันธ์ด้วยแดนซิลคลอไรด์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร เติม 2 โมลของ NaOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและสารละลาย 25% แอมโมเนีย ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดส่วนเกินของแดนซิลคลอไรด์ (4) สารละลายที่สกัดได้ถูกวิเคราะห์โดย HPLC ด้วยแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยใช้อัตราการไหลที่ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิคอลัมน์ 40 °C ตรวจวัดที่ความยาคลื่น 254 นาโนเมตร นอกจากนี้การใช้ HPLC โดยตรวจวัดด้วย Fluorescence detector ได้ถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พัฒนาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฮีสทามีนเช่นกัน จากตัวอย่างงานวิจัยของ Jung-Hwan Kim และคณะ [22] ใช้ 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde (NDA) เป็นสารติดฉลากอนุพันธ์ฟลูออเรสเซนต์ สภาวะในการแยก คือ ใช้ Reversed-phase HPLC, Isocratic elution โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ อะซิโทรไนไตล์/สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต เข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร pH 6.8 ในอัตราส่วน 35:65 โดยปริมาตร สำหรับการตรวจวัด ใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 424 นาโนเมตร และติดตามการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 484 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้ให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ฮีสทามีนที่ 7.58 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2.2 รูปแบบการตรวจวัดเชิงสีสำหรับวิเคราะห์ฮีสทามีน

อนุภาคนาโนทอง (AuNPs) แสดงคุณสมบัติเชิงสีที่เป็นเอกลักษณ์ภายใต้ปรากฏการณ์ Surface plasmon resonance (SPR) อนุภาคนาโนทองถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีและชีวภาพ จากงานวิจัยของ L. Huan และคณะ [23] ได้สังเคราะห์ AuNPs รักษาเสถียรภาพด้วยลิแกนด์โพลีเอทิลีนไกลคอล โดยในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ จะทำการเติมฮีสทามีนและโดปามีน ($C_8H_{11}NO_2$) ลงใน AuNPs ซึ่งโมเลกุลฮีสทามีนสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับโดปามีนผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ส่งผลให้เกิดการก่อตัวของชั้นโพลีโดปามีนบนพื้นผิวของ AuNPs สีของ AuNPs จะเปลี่ยนจากสีไวน์แดงเป็นสีดำ ดังรูปที่ 2.1 โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงความเข้มข้นของฮีสทามีนตั้งแต่ 1–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 2.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 2.1 การเกิดพอลิเมอไรเซชันของโดพามีนที่ตอบสนองต่อเอมีนบนพื้นผิวของ AuNPs ที่ใช้ในการติดตามความสดของกุ้งด้วยการวัดสี [23]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

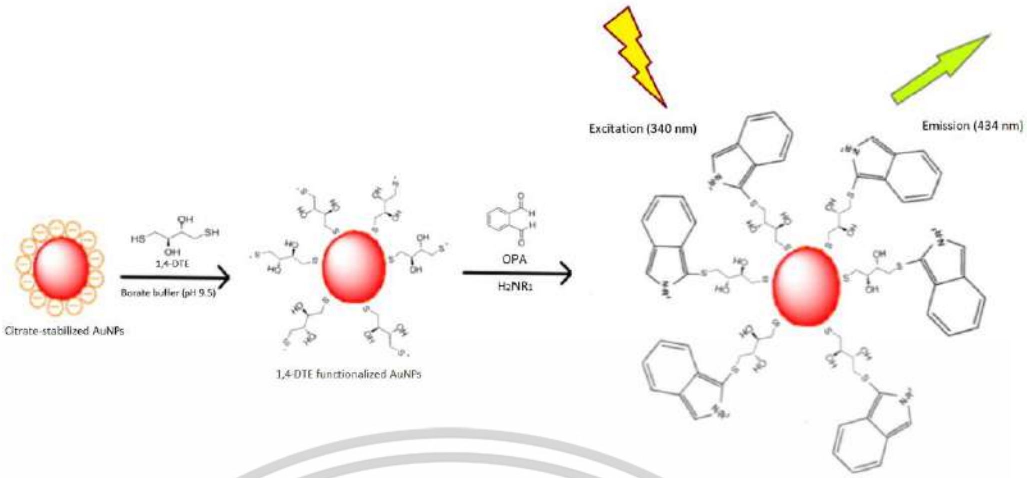
นอกจากนี้ L. Annamaria และคณะ [24] ได้สังเคราะห์ AuNPs ด้วยวิธี laser ablation เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดเชิงสีผ่านการกลไกการรวมตัวของ AuNPs ที่เกิดจากกลุ่มเอมีน ภายใต้สภาวะพีเอชที่เป็นกลาง ฮีสทามีนจะอยู่ในรูปของประจุบวกที่มีประจุเดียว ดังแสดงในรูป 2.2 เนื่องจากกลุ่มอะมิโนอะลิฟาติก (ที่มี pKa ≈ 9.4) จะถูกโปรโตเนต ในขณะที่ไนโตรเจนของวงแหวนอิมิดาโซล (pKa ≈ 5.8) จะไม่ถูกโปรโตเนต ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ฮีสทามีนจะมีลักษณะเป็น dicationic เนื่องจากทั้งกลุ่มอะมิโนอะลิฟาติกและไนโตรเจนของวงแหวนอิมิดาโซลจะถูกโปรโตเนต ในขณะที่ภายใต้สภาวะที่เป็นเบส ฮีสทามีนจะอยู่ในรูปแบบที่เป็นกลาง จากคุณลักษณะข้างต้น ประจุลบบน AuNPs จะถูกเหนี่ยวนำจากประจุบวกของฮีสทามีนจนเกิดการรวมตัวกัน ส่งผลให้สีของ AuNPs เปลี่ยนแปลงไป โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงโดยการวัดอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสามตำแหน่ง ((ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร + ค่าการดูดกลืนแสงที่ 900 นาโนเมตร) / ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร) (Aggregation index) โดยมีขีดจำกัดการตรวจจับ (LOD) 0.18 ไมโครโมลต่อลิตร

รูปที่ 2.2 รูปแบบโปรโตเนชันที่แตกต่างกันของฮีสทามีน [24]

2.1.2.3 รูปแบบการตรวจวัดการเรืองแสงสำหรับวิเคราะห์ฮีสทามีน

นอกจากการตรวจวัดเชิงสีแล้ว AuNPs ยังถูกใช้ในรูปแบบการตรวจวัดการเรืองแสงอีกด้วย จากงานวิจัยของ Natavan Hasanova และคณะ [25] ได้พัฒนาวิธีในการตรวจวัดเอมีนโดยอาศัยการเรืองแสงของ AuNPs ซึ่งการเรืองแสงของ AuNPs ที่ใช้ในการตรวจวัดขึ้นอยู่กับการก่อตัวของผลิตภัณฑ์ Isoindole ที่เกิดจาก *o*-phthalaldehyde (OPA), Thiolate groups ของ 1,4-dithioerytritol (1,4-DTE) บนพื้นผิวของอนุภาค AuNPs และ สารประกอบเอมีนที่ต้องการวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดย 1,4-DTE มีหมู่ –SH สองหมู่ในโครงสร้าง หมู่ –SH หนึ่งจะเกิดโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับ AuNPs อีกหมู่หนึ่งจะเกิดปฏิกิริยาการก่อตัวของ Isoindole กับ OPA-เอมีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 กลไกการเกิดสารประกอบ Isoindole ในปฏิกริยาที่นำเสนอ [25]

โดยในงานวิจัยส่วนมาก การใช้ AuNPs เป็นเซนเซอร์เรืองแสงจะอาศัยกลไกการดับแสงฟลูออเรสเซนต์ แต่ในงานวิจัยนี้เป็นอีกตัวอย่างนึงที่สำคัญสำหรับ Fluorescence turn on ซึ่งจะให้ค่าการเรืองแสงที่สูงขึ้น โดยติดตามค่าการเรืองแสงที่ 450 นาโนเมตร และใช้พลังงานกระตุ้นที่ 340 นาเมตร เมื่อความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนเพิ่มขึ้น การเรืองแสงจะเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาอันดับสอง และเกิดผลิตภัณฑ์ Isoindole พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 4.20 นาโนโมลต่อลิตร

2.2 อนุภาคนาโนทอง

2.2.1 ข้อมูลทั่วไป [26]

อนุภาคนาโนทองเป็นอนุภาคขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร เนื่องจากขนาดของอนุภาคนาโนทองมีขนาดเล็กมาก จึงทำให้คุณสมบัติของอนุภาคนาโนทองแตกต่างไปจากทองขนาดใหญ่ เช่น อนุภาคนาโนทองสามารถกระจายและแขวนลอยในน้ำหรือตัวทำละลายอื่น ๆ ได้อย่างง่ายดายเมื่อมีสารทำให้คงตัวที่เหมาะสม นอกจากนี้ขนาดที่เล็กมากนี้สามารถนำส่งสารเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย และอีกคุณสมบัติที่สำคัญ คือ เอกลักษณ์ทางแสงของอนุภาคนาโนทองที่เกิดจากปรากฏการณ์เซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance)

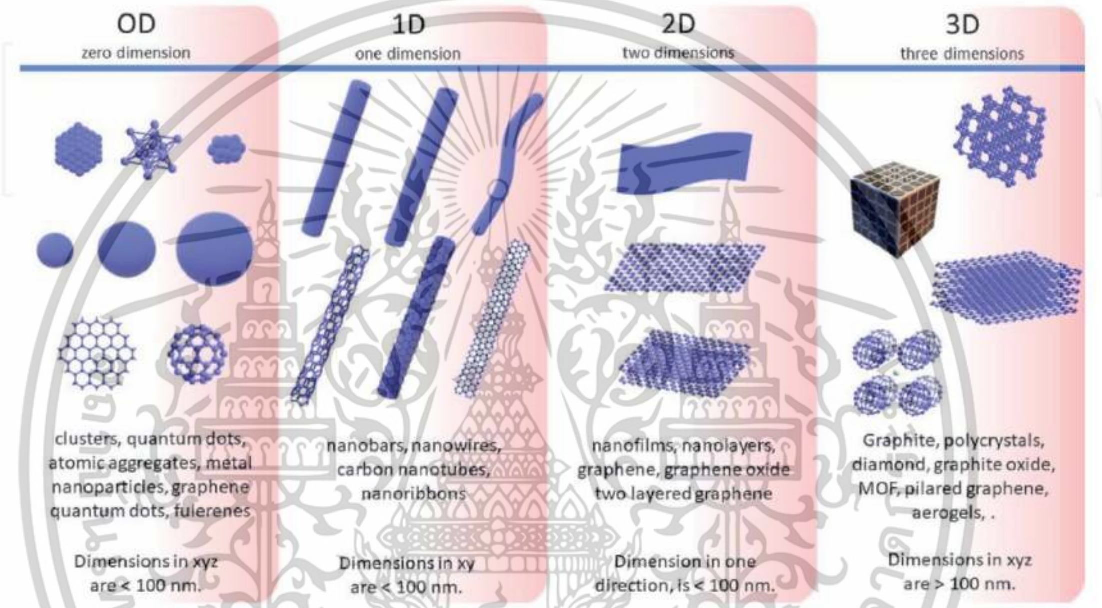
อนุภาคนาโนทองสามารถสังเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น วิธีรีดักชันทางเคมี เคมีไฟฟ้า และการสังเคราะห์ด้วยเลเซอร์ อนุภาคนาโนทองมีคุณสมบัติทางแสงและอิเล็กทรอนิกส์ที่เป็นเอกลักษณ์เนื่องจากมีขนาดที่เล็ก อัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง และการสั่นของอิเล็กตรอนบนพื้นผิว ด้วยคุณสมบัติทางแสงและอิเล็กทรอนิกส์ที่เป็นเอกลักษณ์ จึงทำให้มีประโยชน์ในการใช้งานที่หลากหลายรวมถึงการบำบัดและการถ่ายภาพทางชีวการแพทย์ (Biomedical imaging and therapy) การส่งยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Drug delivery) การเร่งปฏิกิริยา (Catalysts) และอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์/อุปกรณ์เชิงแสง (Electronic and optical devices)

2.2.2 โครงสร้างนาโน

ระบบมิติต่ำ (LDSs) คือระบบทางกายภาพที่แสดงคุณสมบัติที่แตกต่างจากระบบมิติที่เท่ากันเนื่องจากมีมิติลดลง โดยทั่วไป อนุภาคนาโนสามารถจำแนกได้เป็นสามประเภทหลักตามขนาด คือ อนุภาคนาโนมิติเป็นศูนย์ (0D) หนึ่งมิติ (1D) และอนุภาคนาโนสองมิติ (2D) (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 การจำแนกประเภทของวัสดุนาโนตามระบบมิติ [27]

1. วัสดุนาโน 0 มิติ คือ วัสดุที่มีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตรทั้งสามทิศทาง และโดยทั่วไปขนาดจะอยู่ในช่วงไม่กี่นาโนเมตร ตัวอย่างวัสดุนาโน 0D ได้แก่ จุดควอนตัม อนุภาคนาโนโลหะ และฟูลเลอรีน

2. วัสดุนาโน 1 มิติ คือ วัสดุนาโนที่มีโครงสร้าง 2 ทิศทางอยู่ในระดับนาโนแมตร และอีกหนึ่งทิศทางที่ไม่ได้อยู่ในระดับนาโนเมตร ตัวอย่างวัสดุนาโน 1D ได้แก่ ลวดนาโน ท่อนาโน และแท่งนาโน

3. วัสดุนาโน 2 มิติ คือ วัสดุนาโนที่มีโครงสร้าง 1 ทิศทางอยู่ในระดับนาโนแมตร และอีก 2 ทิศทางที่ไม่ได้อยู่ในระดับนาโนเมตร ได้แก่ กราฟีน ไดแชลโคเจนไนด์ของโลหะทรานซิชัน และวัสดุ 2 มิติอื่นๆ

วัสดุนาโนประเภทต่างๆ เหล่านี้แสดงคุณสมบัติเฉพาะตัวและเหมาะสำหรับการใช้งานที่แตกต่างกันตามขนาดและรูปร่าง ตัวอย่างเช่น อนุภาคนาโน 0D จุดควอนตัมมีประโยชน์ในการใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

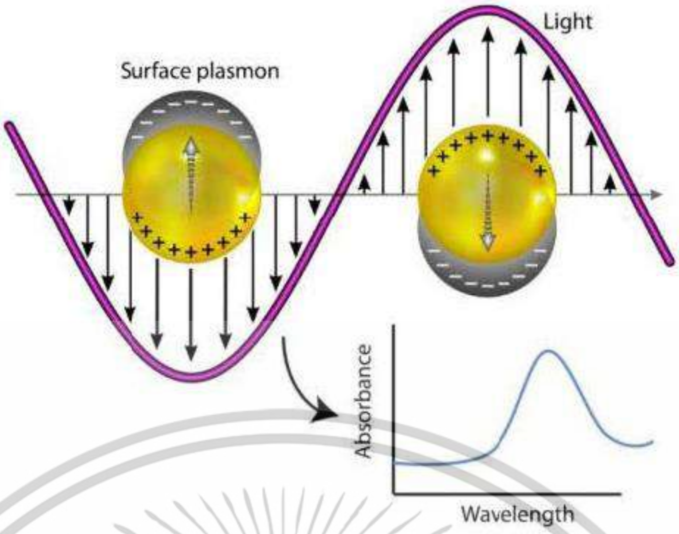
ด้านโฟโตนิกส์และการตรวจจับทางชีวภาพ เนื่องจากมีระดับพลังงานที่ไม่ต่อเนื่อง ในขณะที่เส้นลวดนาโนและท่อนาโนมีประโยชน์ในอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และออปโตอิเล็กทรอนิกส์ เนื่องจากมีอัตราส่วนกว้างยาวและพื้นที่ผิวสูง ส่วนกราฟีน และวัสดุ 2 มิติอื่นๆ มีคุณสมบัติทางอิเล็กทรอนิกส์และทางกลที่เป็นเอกลักษณ์ ซึ่งส่งผลให้มีความน่าสนใจสำหรับการใช้งานในอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ เซนเซอร์ และการแปลงพลังงาน

2.2.3 คุณสมบัติทางแสง

Surface plasmon resonance (SPR) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่อแสงทำปฏิกิริยากับพื้นผิวโลหะ กล่าวคือเมื่อมีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมาตกกระทบโลหะ กลุ่มอิเล็กตรอนที่ถูกจำกัดอยู่บนพื้นผิวอนุภาคระดับนาโนจะเกิดการสั่นพ้อง (Collective oscillation) และเมื่อคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมีความยาวคลื่นเดียวกันกับความถี่ที่อิเล็กตรอนสั่นในอนุภาคนาโน จะทำให้เกิดการกำทอนขึ้น ซึ่งอันตรกิริยาที่แสงกระทำต่อโลหะจะเกิดได้สองแบบ คือแสงจะตกกระทบและสะท้อนออกไปด้วยความยาวคลื่นเท่าเดิม ทุกทิศทุกทาง เรียกว่าการกระเจิง (Scattering) และในขณะเดียวกัน บางโฟตอนก็จะถูกดูดกลืนและถูกเปลี่ยนไปเป็นพลังงานการสั่น ซึ่งเรียกว่าการดูดกลืนแสง (Absorption) โดยทั่วไปแล้วโครงสร้างระดับนาโนของทองจะเกิดทั้งกระบวนการกระเจิงแสงและการดูดกลืนแสง ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ จะขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโน ซึ่งสามารถตรวจจับได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของการสะท้อนแสงหรือการดูดกลืนแสง

ในปัจจุบัน SPR ได้นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการพัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมี พื้นฐานของเซนเซอร์เคมีที่ใช้ SPR นั้นคล้ายคลึงกับเซนเซอร์ออปติคัล โดยมีชั้นอนุภาคนาโนโลหะ ทองหรือเงินเป็นชั้นบางๆ สะสมอยู่บนพื้นผิว เมื่อนำตัวอย่างที่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่ถูกตรึงไว้บนพื้นผิวโลหะ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดัชนีการหักเหของแสง ส่งผลให้ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะเปลี่ยนสัญญาณ SPR การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณนี้สามารถวัดและใช้เพื่อระบุความเข้มข้นหรือการมีอยู่ของสารวิเคราะห์ได้ มากไปกว่านั้น เซนเซอร์อนุภาคนาโนโลหะทางเคมีได้รับการพัฒนาเพื่อการตรวจวัดสารวิเคราะห์ทางเคมีที่หลากหลาย รวมถึงก๊าซ สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย และโลหะหนัก เนื่องจากมีความไวสูง (Sensitivity) ความเลือกจำเพาะ (Selectivity) ทำให้มีประโยชน์ในการใช้งานอย่างมากในสภาวะจริง เช่น การตรวจสอบสภาพแวดล้อม การควบคุมกระบวนการทางอุตสาหกรรม ข้อดีอย่างหนึ่งของเซนเซอร์เคมีที่ใช้ SPR คือความสามารถในการทำงานแบบเรียลไทม์ ซึ่งช่วยให้สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของสารวิเคราะห์ได้อย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ เนื่องจากเซนเซอร์ไม่จำเป็นต้องใช้ฉลากหรือรีเอเจนต์ จึงสามารถย่อขนาดและประยุกต์รวมเข้ากับอุปกรณ์พกพาสำหรับการใช้งานภาคสนามได้อย่างง่ายดาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 เสียงสะท้อนพลาสมอนพื้นผิวแสดงการสั่นสะเทือนของกลุ่มอิเล็กตรอนในแถบเหนี่ยวนำเมื่อแสงจากภายนอกส่องผ่าน [28]

Localized surface plasmon resonance (LSPR) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่ออนุภาคนาโนโลหะขนาดเล็ก ถูกกระตุ้นด้วยแสง ต่างจากใน SPR แบบดั้งเดิมที่มักใช้ฟิล์มโลหะ โดยใน LSPR เมื่อแสงตกกระทบที่โครงสร้างระดับนาโนของทอง อิเล็กตรอนจะถูกกระตุ้นไปยังแถบเหนี่ยวนำ และจะเกิดการสั่นพ้องกับแสงที่มาตกกระทบ ซึ่งจะทำให้เกิดพลาสมอนโพลาริตรอน ซึ่งจะสามารถถ่ายทอดระหว่างรอยต่อของโลหะและไดอิเลกทริก ซึ่งปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้จะเกิดอยู่บริเวณผิวชั้นนอกของอนุภาคนาโนโลหะ การสั่นของอิเล็กตรอนและการนำไฟฟ้าจะเกิดขึ้นเฉพาะบริเวณผิวรอบนอกเท่านั้น เพราะแสงจากภายนอกไม่สามารถส่องทะลุผ่านเข้าไปภายในวัสดุได้ โดยทั่วไปจึงเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า LSPR

2.2.4 การศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทอง

การศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทองเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการทำความเข้าใจคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งจำเป็นสำหรับการใช้งานที่หลากหลาย เช่น การนำส่งยา ไบโอเซนเซอร์ และการสร้างภาพ เทคนิคทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาคุณลักษณะอนุภาคนาโนทอง แสดงดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทอง

เทคนิค	หลักการ	ผลที่ได้
UV-Vis spectrophotometer	UV-Vis เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสาร โดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสียูวีที่ส่งผลให้โมเลกุลถูกกระตุ้น และมีการสั่นภายในโมเลกุล โดยการดูดกลืนรังสีของสารในช่วง Ultraviolet (UV) และ Visible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190-1100 nm	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโน ซึ่งให้ข้อมูลเกี่ยวกับขนาด รูปร่าง และความเข้มข้นของอนุภาค โดยทั่วไปสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองจะแสดงจุดสูงสุดของพลาสโมเรโซแนนซ์พื้นผิว (SPR) ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโน
Fluorescence spectrophotometer	ใช้เทคนิค Fluorescence Spectroscopy คือ เมื่ออิเล็กตรอนในโมเลกุลได้รับพลังงานคลื่นแสงที่เหมาะสมในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลเป็นผลทำให้อิเล็กตรอนอยู่ในสภาวะเร้าประมาณ 10^{-8} วินาที ก็จะกลับสู่สภาวะพื้นและคายพลังงานออกมาในรูปการเรืองแสง	สเปกตรัมการเรืองแสงของสารเรืองแสง โดยวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ใช้เพื่อยืนยันการเพิ่มประสิทธิภาพการเรืองแสงของ ALz ด้วยอนุภาคนาโนทอง
Transmission electron microscopy (TEM)	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบาง ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ การสร้างภาพจากกล้องประเภทนี้จะทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่าง	ภาพความละเอียดสูงที่ช่วยให้มองเห็นอนุภาคนาโนทองแต่ละอนุภาคได้โดยตรง ซึ่งสามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนได้
Zeta potential measurement	ใช้หลักการการวัดความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาค เมื่อให้สนามไฟฟ้าที่สารแขวนลอยของอนุภาคที่มีประจุ อนุภาคจะเคลื่อนที่ไปที่ผิวของขั้วไฟฟ้า (Electrode) ที่มีประจุตรงกันข้าม โดยที่ความสามารถในการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับปริมาณประจุของอนุภาค	ประจุที่พื้นผิวของอนุภาคนาโน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในความเสถียรและปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลอื่นๆ ในสารละลาย

เทคนิค	หลักการ	ผลที่ได้
X-Ray Diffraction (XRD)	ใช้หลักการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ เมื่อผ่านชั้นต่างๆของอะตอมหรือโมเลกุลภายในวัสดุหรือสารตัวอย่างนั้น แล้วทำการวัดการเลี้ยวเบนรังสีเอ๊กซ์ที่มุมต่างๆ	ระบุชนิดสารประกอบ โครงสร้างผลึกของสารประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง ทั้งในเชิงคุณภาพ (Qualitative) และเชิงปริมาณ (Quantitative)
3D-Contours fluorescence Spectrometer	เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดค่าการเรือง ด้วยเทคนิค Fluorescence Spectroscopy ซึ่งแต่งต่างจาก Fluorescence Spectrometer ทั่วไปคือ สามารถสแกน Excitation และ Emission ได้มากกว่า 1 ความยาวคลื่นต่อการแสกนหนึ่งครั้ง	แสดงผลลัพธ์ในรูปแบบแผนภาพ 3 มิติ เป็นตัวช่วยในการทราบความยาวคลื่นที่ดีที่สุดในการใช้กระตุ้นอิเล็กตรอน เพื่อให้การเรืองแสงที่สูงที่สุด โดยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ การเพิ่มประสิทธิภาพการเรืองแสงด้วยอนุภาคนาโนทองเป็นส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนา
Time-Resolved Fluorescence Spectrometer	เครื่องมือตรวจวัดการเรืองแสงขั้นสูง สามารถวัดการสลายตัวของสารเรืองแสง โดยใช้เทคนิค Time Corretated Singte Photon Counting (TCSPC)	สเปกตรัมการสลายตัวของการเรืองแสงในระดับนาโนวินาที สามารถใช้ยืนยันเวลาการสลายตัวของสารเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไป หากเกิดปฏิกริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเกิดขึ้น
Raman Spectrometer	เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในการใช้วิเคราะห์โครงสร้าง พันธะ ของโมเลกุลโดยใช้ลำแสงยิงผ่านเข้าไปยังสารตัวอย่าง โดยใช้หลักการกระเจิงแสงของปรากฏการณ์รามาน สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ไม่ทำลายตัวอย่าง (non-destructive technique)	สเปกตรัมการสั่นของโมเลกุล เพื่อใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น

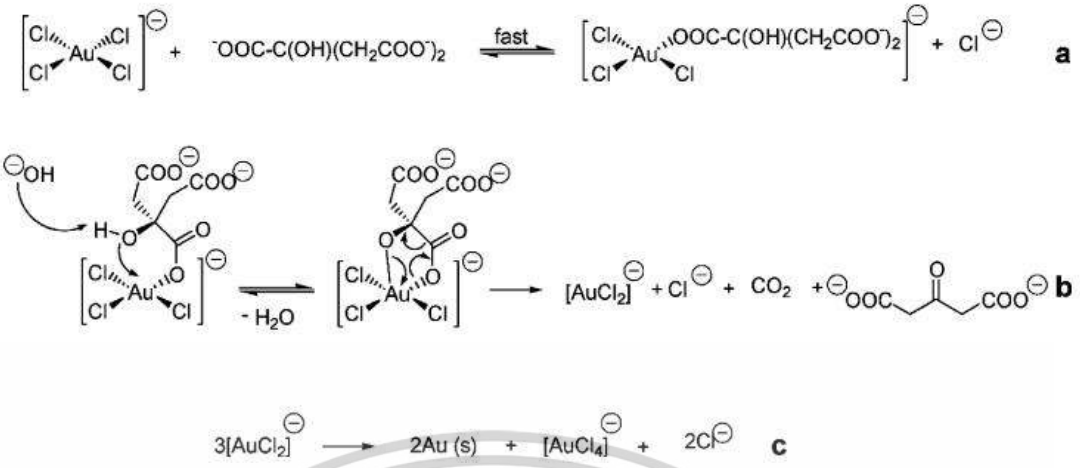
2.2.5 วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโน

อนุภาคนาโนทองสามารถสังเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น การรีดักชันทางเคมี วิธีทางกายภาพ และวิธีการทางชีวภาพ ปัจจุบันมีหลายวิธีในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองแบบสารละลาย ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามเงื่อนไขการทดลอง และเพื่อให้ได้อนุภาคนาโนที่มีรูปร่างและการกระจายตัวที่ต้องการ องค์ประกอบโดยทั่วไปในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะ คือ (i) Metal precursor: โลหะตั้งต้นที่ต้องการสังเคราะห์ โดยในปัจจุบัน มีรูปแบบสารตั้งต้นมากมายให้เลือกใช้ เช่น ทองคำ ไม่ว่าจะเป็น ทองคำที่ผ่านการแปรรูปที่เห็นได้ทั่วไป การย่อยทองคำจากแผ่นทองคำเพื่อนำมาสังเคราะห์ หรือ ทองคำบริสุทธิ์ (ii) Reducing agent: อัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Au (III) สู่ Au (0) เป็นอีกปัจจัยสำคัญในการเกิดอนุภาคนาโนโลหะ แรงรีดิวซ์ที่สูงทำให้มั่นใจได้ว่าจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ปัจจัยภายนอกก็สามารถเพิ่มแรงขับเคลื่อนปฏิกิริยาทางเคมีได้อีกด้วย เช่น ความร้อน (iii) Stabilizing agent: โดยธรรมชาติของโลหะ เมื่อเลขออกซิเดชันเท่ากับ 0 จะก่อให้เกิดการรวมตัวกันได้ง่าย ดังนั้นสารรักษาเสถียรภาพมีหน้าที่สำคัญในการทำให้โลหะคงตัวอยู่ได้ โดยความเข้มข้นของสารรักษาเสถียรภาพ ยังสามารถกำหนดขนาดของอนุภาคนาโนโลหะได้อีกด้วย เมื่อความเข้มข้นของสารรักษาเสถียรภาพที่สูงอาจทำให้การกระจายตัวของอนุภาคนาโนเพิ่มขึ้นและขนาดเล็กลง ด้วยการเปลี่ยนเงื่อนไขของการสังเคราะห์เดียวกัน จึงสามารถได้รับการกระจายตัวของอนุภาคนาโนที่แตกต่างกันได้

2.2.5.1. การรีดักชันทางเคมี [29]

วิธีการที่สำคัญที่สุดวิธีหนึ่งคือการใช้สารรีดิวซ์ เช่น โซเดียมซิเตรต วิธีการนี้เสนอครั้งแรกในปี พ.ศ. 2494 โดย John Turkevich และคณะ เพื่อเตรียมสารแขวนลอยของอนุภาคทองดังแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาในรูปที่ 2.6 วิธีนี้ทำให้สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่มีรูปทรงกลม ขนาด 5 – 40 นาโนเมตรได้ ต่อมาวิธีนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนเงิน อย่างไรก็ตาม อนุภาคนาโนเงินที่ได้จากวิธีนี้มีการกระจายตัวที่ใหญ่กว่าที่ 60–200 นาโนเมตร ขั้นตอนการสังเคราะห์และสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง คือ ต้มสารละลายกรดคลอโรออริก ความเข้มข้น 2.5×10^{-4} โมลต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จนอุณหภูมิ 95-100 °C และเติมละลายโซเดียมซิเตรต 0.5% 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย และรักษาอุณหภูมิของสารละลายผสมไว้ที่ประมาณ 100 °C จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง โดยอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดอนุภาคอยู่ที่ประมาณ 20 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 กลไกของการรีดักชันของทอง (A) ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ (B) การดีคาร์บอกซิเลชันและการลดของสปีชีส์ Au(III) และ (C) ความไม่สมดุลของสปีชีส์ aurous และการก่อตัวของอะตอม Au^0 ในเวลาต่อมา [29]

ข้อเสียของวิธีนี้คือการปรับอัตราส่วนในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มการคงตัว หรือ มีเสถียรภาพที่ดีขึ้นได้ให้มีความเหมาะสมได้ยาก หากอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีเสถียรภาพต่ำ เนื่องจากไอออนซิเตรตทำหน้าที่เป็นทั้งตัวรีดิวซ์และสารรักษาเสถียรภาพ และทั้งสองหน้าที่มีอิทธิพลสำคัญต่อกระบวนการสร้างนิวเคลียสและการเติบโตของอนุภาค นอกจากนี้ ได้มีการใช้สารเคมีอื่นๆ เป็นสารรีดิวซ์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ ($NaBH_4$) หรือกรดแอสคอร์บิก ($C_6H_8O_6$) เพื่อให้ได้อนุภาคนาโนทองที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ

2.2.5.2. Ultrasonic irradiation

วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองในรูปแบบนี้ จะอาศัยคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงหรือคลื่นความถี่อัลตราโซนิก (Ultrasonic irradiation) ในการเร่งการเติบโตของอนุภาค ซึ่งในเทคนิคการสังเคราะห์นี้จะเกิดปรากฏการณ์คาวิเตชัน (Cavitaion) คือกระบวนการที่เกิดขึ้นในตัวกลางหรือสารละลายที่ได้รับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี โดยการเกิดไอออไนเซชัน (Ionization) ของโมเลกุลน้ำจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ:

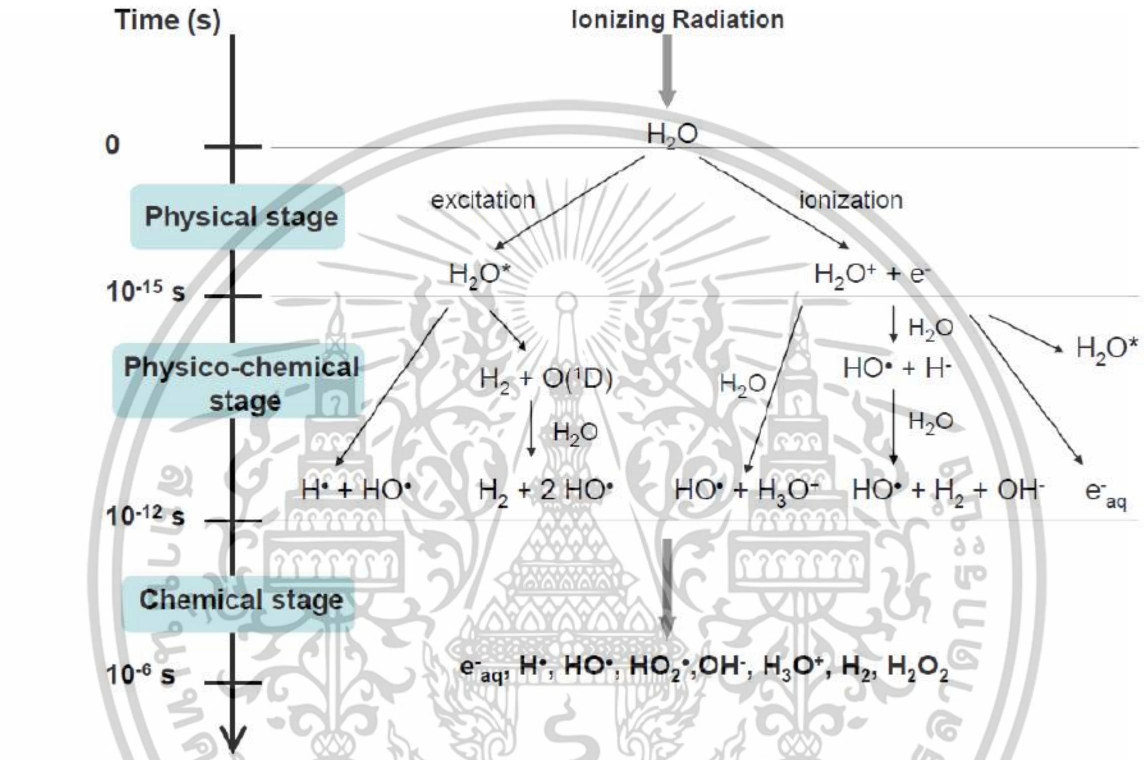
$$H_2O^{\bullet +} + H_2O \longrightarrow H_3O^{+} + HO^{\bullet}$$

โดยเกิดขึ้นในช่วงแรกของการให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิก หลังจากเกิดการแตกตัวขึ้น อิเล็กตรอนจะสูญเสียพลังงานจากการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลน้ำรอบๆ และสุดท้ายจะเข้าสู่ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยสปีชีย์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะเกิดการแพร่อย่างอิสระโดยอาศัยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดปฏิกิริยาระหว่างกัน ดังรูปที่ 2.7 หลังจากนั้นประมาณ 100-300 นาโนวินาที จะเกิดการเรดิโอไลซิสของโมเลกุลน้ำ ซึ่งแสดงดังปฏิกิริยาด้านล่าง [30]:

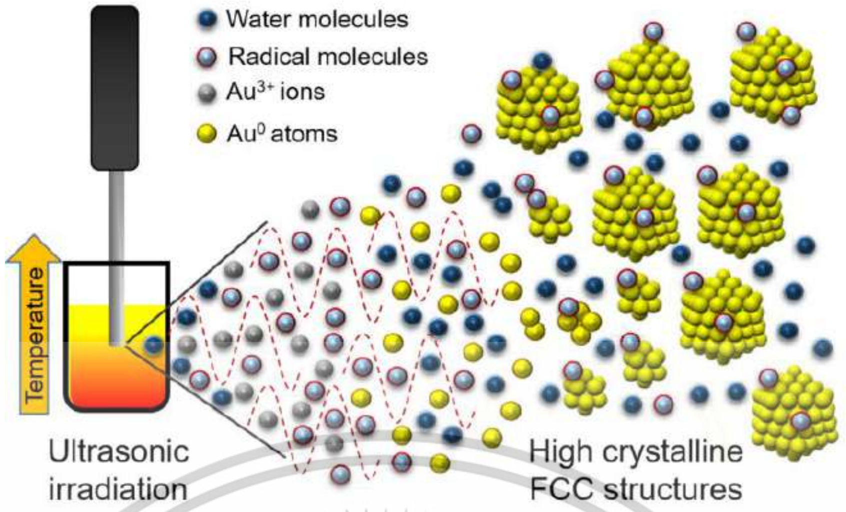
$$H_2O \rightsquigarrow e^-_{hyd} + H^\bullet + HO^\bullet + H_2O_2 + H_3O^+ + H_2$$



รูปที่ 2.7 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีของโมเลกุลน้ำที่เกิดขึ้นภายใต้การให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิก [30]

โดยสปีชีย์ที่เกิดขึ้นจากการเรดิโอไลซิสของโมเลกุลน้ำนี้นั้นจะทำหน้าที่เป็นตัวชักนำหรือกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใต้ความดันและอุณหภูมิที่สูงขึ้น ส่งผลทำให้เกิดโครงสร้างผลึกของอนุภาค ดังรูปที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



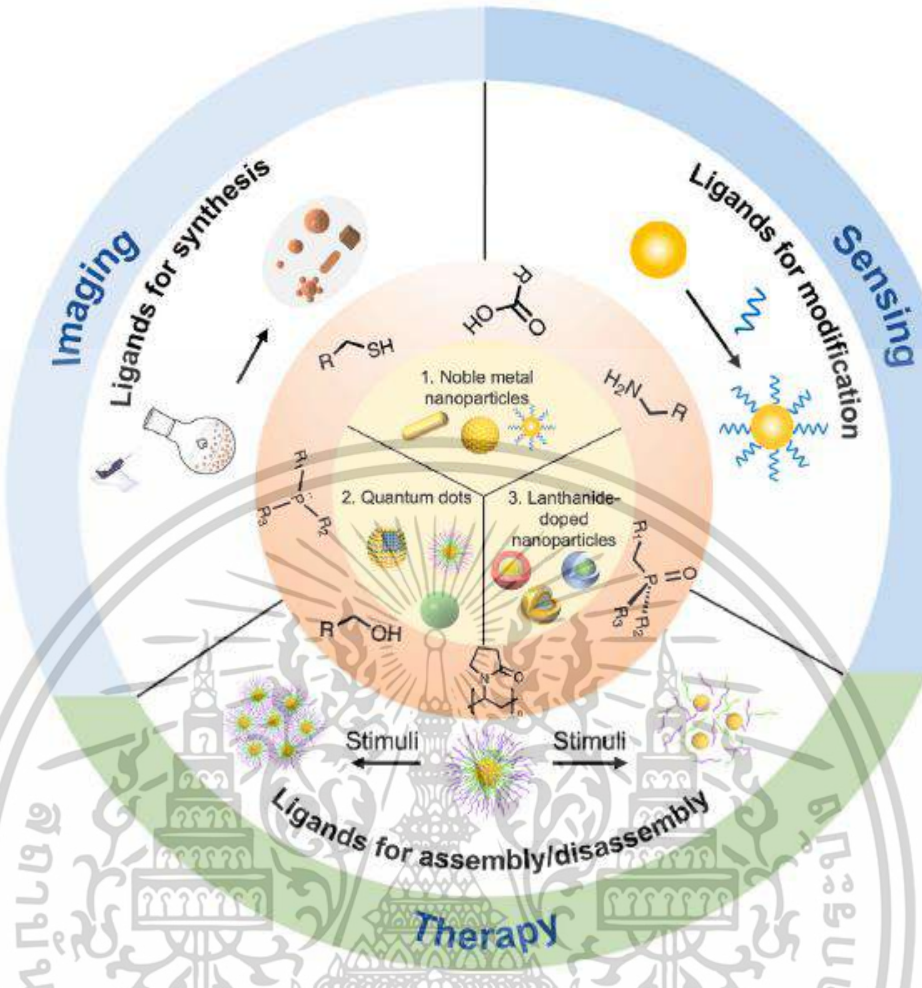
รูปที่ 2.8 ภาพแสดงการสังเคราะห์ AuNPs ในการสร้างนิวเคลียสและการเจริญเติบโตที่ส่งเสริมโดยผลทางโซโนเคมีคัลในการฉายรังสีอัลตราโซนิก [31]

จากงานวิจัยของ J.A. Fuentes-Garcia และคณะ [31] ได้อธิบายปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยใช้โซเดียมซิเตรทภายใต้การให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกไว้ดังนี้ ระหว่างการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน จะเกิดแอนไอออออน (Anion) อย่างน้อยสี่ชนิด คือ [$AuCl_4^-$], ซิเตรต, คลอไรด์ และ ไฮดรอกไซด์แอนไอออน ปัจจัยสำคัญในการเกิดอนุภาคนาโนทอง คือ ความสามารถในการดูดซับ [$AuCl_4^-$] บนพื้นผิวของ Seed ในการก่อตัวของอนุภาค แต่ [$AuCl_4^-$] ไม่สามารถดูดซับลงบนพื้นผิวในรูปแบบ Charged ion ดังนั้นการดูดซับที่เกิดขึ้นจะเกิดจากการดูดซับสารในรูป $AuCl_3$ มากกว่า นอกจากนี้ การควบคุมคุณสมบัติของอนุภาคตามที่ต้องการสามารถทำได้โดยการควบคุมขนาด รูปร่าง โดยการปรับเปลี่ยนพลังงานของคลื่นความถี่อัลตราโซนิกที่ใช้ โดยปราศจากการกระตุ้นด้วย Mechanical stirring และ การให้ความร้อนจากภายนอก พลังงานการให้ความถี่อัลตราโซนิกจะเป็นปัจจัยหลักในการก่อตัวของอนุภาคให้ใหญ่ขึ้น ซึ่งพลังงานที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดฟองก๊าซคาวิเตชันที่มากขึ้น ซึ่งเป็นส่วนช่วยสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาการก่อตัวเริ่มต้นของอนุภาคและทำให้ได้ปริมาณอนุภาคที่สูงขึ้น

2.3 คุณลักษณะการรักษาเสถียรภาพด้วยลิแกนด์ที่แตกต่างกัน

ในการใช้อนุภาคนาโนทอง (AuNPs) สำหรับงานเฉพาะด้าน (รูปที่ 2.9) ไม่เพียงแต่จำเป็นจะต้องใช้สารทำให้เสถียรเท่านั้น แต่ยังต้องปรับปรุงสารรักษาเสถียรภาพบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนด้วยสารประกอบหรือมอยอิตี้เชิงฟังก์ชัน (Moiety) ให้เหมาะกับงานนั้นๆ ในบางกรณี สารที่ใช้ในการรักษาเสถียรภาพอาจมี Moiety ที่เหมาะสมกับงานนั้นๆ อยู่แล้วโดยไม่จำเป็นต้องมีการปรับปรุงแก้ไขใดๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 บทบาทต่างๆ ของลิแกนด์ในงานเกี่ยวกับอนุภาคนาโนสำหรับการใช้งานในด้านต่างๆ [32]

กลไกที่พบบ่อยที่สุดสองประการที่ใช้สำหรับการรักษาเสถียรภาพของอนุภาคนาโน คือ การรักษาเสถียรภาพด้วยประจุบนพื้นผิวอนุภาคนาโน และการทำให้อนุภาคนาโนเสถียรโดยอาศัยผลของความเกะกะ (Steric effect) ซึ่งสรุปได้ดัง ตารางที่ 2.2 การรักษาเสถียรภาพด้วยประจุบนพื้นผิวอนุภาคจะอาศัยแรงผลักจากลิแกนด์ที่มีประจุ เช่น ซิเตรทบนพื้นผิวอนุภาคนาโน วิธีนี้มีความไวต่อการมีอยู่ของเกลือ และอนุภาคนาโนที่แสดงประจุที่พื้นผิวจะก่อให้เกิดแรงผลัก (Repulsive force) ระหว่างอนุภาค ส่งผลให้อนุภาคนาโนแต่ละอนุภาคไม่เกิดการรวมตัวกัน สำหรับการรักษาเสถียรภาพด้วย Steric effect จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนด้วยโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น พอลิเมอร์ ซึ่งป้องกันไม่ให้อนุภาคนาโนแต่ละอนุภาคเกิดการรวมตัวกัน เนื่องจากผลของความเกะกะของสายโซ่พอลิเมอร์

การรักษาเสถียรภาพโดยประจุของลิแกนด์สามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มประจุลบ เช่น คาร์บอกซิเลต, ฟอสโฟเนต, ซัลโฟเนต, อัลคอกไซด์ และไทโอเลต เป็นต้น และกลุ่มประจุบวกประกอบด้วยเอมีน ฟอสฟีน เอไมด์ [33] โดยทั่วไป องค์ประกอบของอนุภาคแบบชั้นเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Monolayer) หมู่ฟังก์ชันพื้นผิวจะเป็นไปตามลิแกนด์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ เลเยอร์นี้มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการรวมตัวของอนุภาคนาโนเมื่อถูกแขวนลอยในสถานะของเหลวหรือทำให้เสถียรผ่านพันธะโคออดิเนตโควาเลนต์ และการผลักกันทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic) [34] เนื่องจากซัลเฟอร์มีความชอบ (Affinity) กับทองคำสูงมาก จึงมีการใช้ลิแกนด์ที่มีซัลเฟอร์เป็นส่วนใหญ่ เช่น แซนเทตและไดซัลไฟด์ เพื่อทำให้ AuNPs เสถียร [35] พื้นผิวของอนุภาคนาโนสามารถปรับปรุงได้ด้วยลิแกนด์ข้างต้นผ่านพันธะระหว่าง M–S (M = Au และ Ag) หรือด้วยกลุ่มอนุพันธ์ของ Thiol / Thiolated เช่น ไฮดรอกซิล (–OH), คาร์บอกซิล (–COOH), เอมีน ($-NH_2$), ไนโตร ($-NO_2$) ทำให้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ไอออนของโลหะในระบบการตรวจวัดเชิงสี อนุภาคนาโนโลหะที่รักษาเสถียรภาพด้วยหมู่ $-NH_2$ และ – COOH มีบทบาทสำคัญในการประยุกต์ใช้เป็นเซนเซอร์เชิงสีสำหรับการใช้งานการตรวจวัดในปัจจุบัน โดยชีวโมเลกุล $-NH_2$ ของกรดอะมิโนมีความสามารถในการเกิดพันธะกับไอออนของโลหะและ AuNPs ได้ดี และมีความสามารถในการเลือกจำเพาะกับเป้าหมายบางกลุ่มได้เป็นอย่างดี [36]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

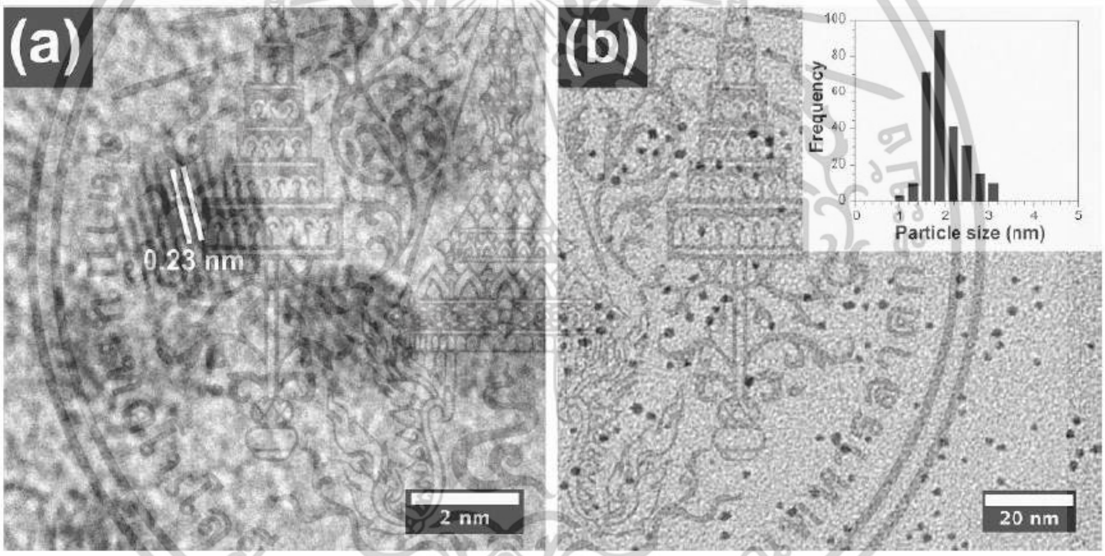
ตารางที่ 2.2 การรักษาเสถียรภาพของอนุภาคนาโนด้วยลิแกนด์ชนิดต่างๆ [32]

ชนิดของสารรักษาเถียรภาพ	สารรักษาเถียรภาพ	หมู่ฟังก์ชัน	ชนิดของอนุภาค	ขนาด (nm)	รูปร่าง
ลิแกนด์ประจุลบ	Tannic acid	ไฮดรอกซิล (–OH)	Au	600-1800	Capsid-like
ลิแกนด์ประจุลบ	Tachyplesin-I	ไฮดรอกซิล (–OH)	Au	65.99	Sphere
ลิแกนด์ประจุลบ	2-Mercaptopyridine	ไธออล (–SH)	Au-Cu	148	Janus
ลิแกนด์ประจุลบ	Thiophenols with methyl groups in different positions	ไธออล (–SH)	Au	/	Cluster
ลิแกนด์ประจุบวก	5-Amino-2-mercaptobenzimi-dazole	เอมีน (–NH_2)	Au	~ 100	Core-shell, dumbbell
พอลิเมอร์	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphothioethanol, 2-methylaminoethanol, polystyrene-b-polyacrylic acid		Au	~ 50	Core-shell, Janus
พอลิเมอร์	Polyimidazolium cages		Au	2	Sphere
พอลิเมอร์	Poly (isobutylene-altmaleic anhydride) with alkyl chains and zwitterion groups		Perovskite	~ 6	Cube
พอลิเมอร์	N-heterocyclic carbene-poly (isobutylene-alt-maleic anhydride)		Au	~ 7.6	Sphere

2.3.1 การปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองด้วยสารประกอบที่มีหมู่ Thiol / Thiolated และ อนุพันธ์

2.3.1.1 ไทออล (–SH)

จากงานวิจัยของ Thomas J. Macdonald และคณะ [37] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วยสารประกอบที่มีหมู่ไทออล โดยใช้วิธีรีดักชันทางเคมี โดยกรดคลอโรออริก ($HAuCl_4$) จะถูกรีดิวซ์ด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์ ($NaBH_4$) โดยใช้ 1-โดเดคาเนไทออล (DDT) เป็นสารรักษาเสถียรภาพ ซึ่งการรักษาเสถียรภาพด้วย DDT ส่งผลให้ AuNPs ที่ได้มีขนาดอยู่ระหว่าง 2–3 นาโนเมตร จากรูปที่ 2.10A แสดงภาพ HR-TEM ของ AuNPs ที่มีขนาดเล็กที่สุด โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 2.0 นาโนเมตร (±0.4 นาโนเมตร) และมีระยะห่างระหว่างระนาบเท่ากับ 0.23 นาโนเมตร (Au 111) รูปที่ 2.10B อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้แสดงการกระจายตัวได้ดีและมีรูปร่างทรงกลม



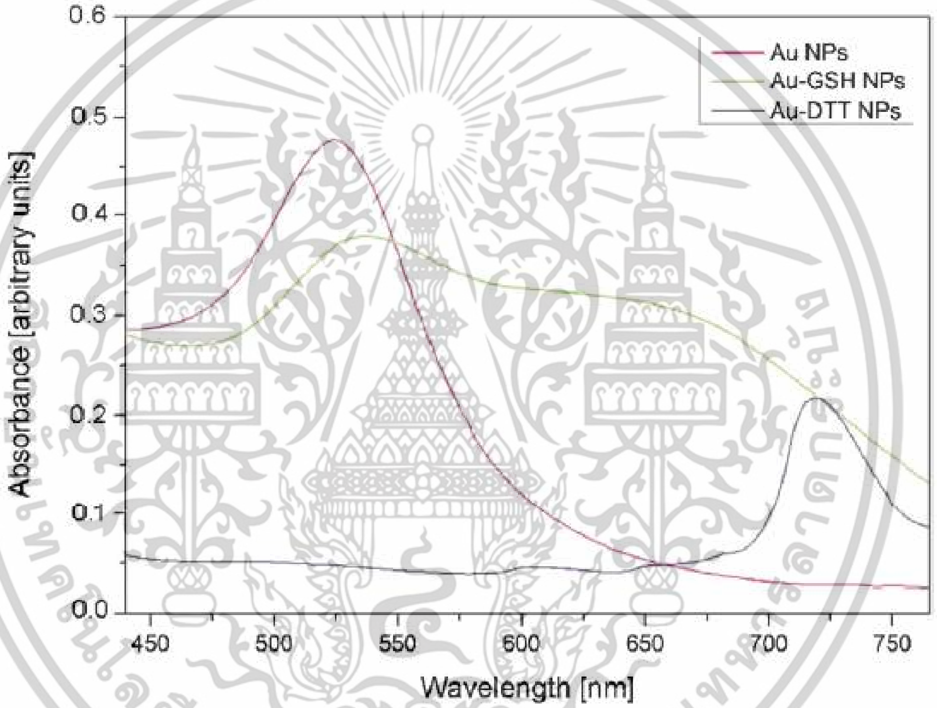
รูปที่ 2.10 (A) ภาพ HR-TEM แสดงขอบโครงตาข่าย (Lattice fringes) ของ AuNPs ขนาด 2 นาโนเมตร และ (B) ภาพการกระจายตัวของ AuNPs และฮิสโทแกรมการกระจายของขนาดอนุภาค [39]

Jozef Magura และคณะ [38] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่ดัดแปลงด้วยไทออลสองประเภท โดยอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้มีขนาดระหว่าง 7 ถึง 45 นาโนเมตร จากการศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ (รูปที่ 2.11) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนทองที่มีรูปทรงกลม และขนาดเล็กกว่า 50 นาโนเมตร จะมีค่าการดูดกลืนสูงสุดอยู่ในช่วง 500–550 นาโนเมตร ส่วนอนุภาคนาโนทองที่ดัดแปลงด้วย แอล-กลูตาไธโอน (Au-GSH) แสดงการเกิด Red shift ของแถบ SPR ที่บริเวณความยาวคลื่น 536 นาโนเมตร ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงการสั่งกลุ่มอิเล็กตรอนที่พื้นผิวของอนุภาคนาโนทองหลังจากดัดแปลงด้วยไทออล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงและการปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่สองที่ 655 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับ AuNPs ที่ไม่ได้รักษาเสถียรภาพด้วยไทออล ซึ่งเกิดเนื่องจากการสร้างพันธะระหว่างหมู่ไทออลของแอล-กลูตาไธโอนกับ AuNPs

สำหรับอนุภาคนาโนทองที่ดัดแปลงด้วย 1,4-ไดไธโอไทรทอล (Au-DTT) สเปกตรัมแสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 720 นาโนเมตร สีของอนุภาคนาโนทองตัวอย่าง-DTT แสดงสีน้ำเงินอมเขียว ซึ่งบ่งบอกถึงการการรวมตัว (Aggregate) ของอนุภาคนาโนทอง โดย 1,4-ไดไธโอไทรทอล ประกอบด้วยอะตอมซัลเฟอร์สองอะตอม ซึ่งสามารถแสดงการก่อตัวของ Polymeric Au-S-S-Au-S-Au bridges ได้



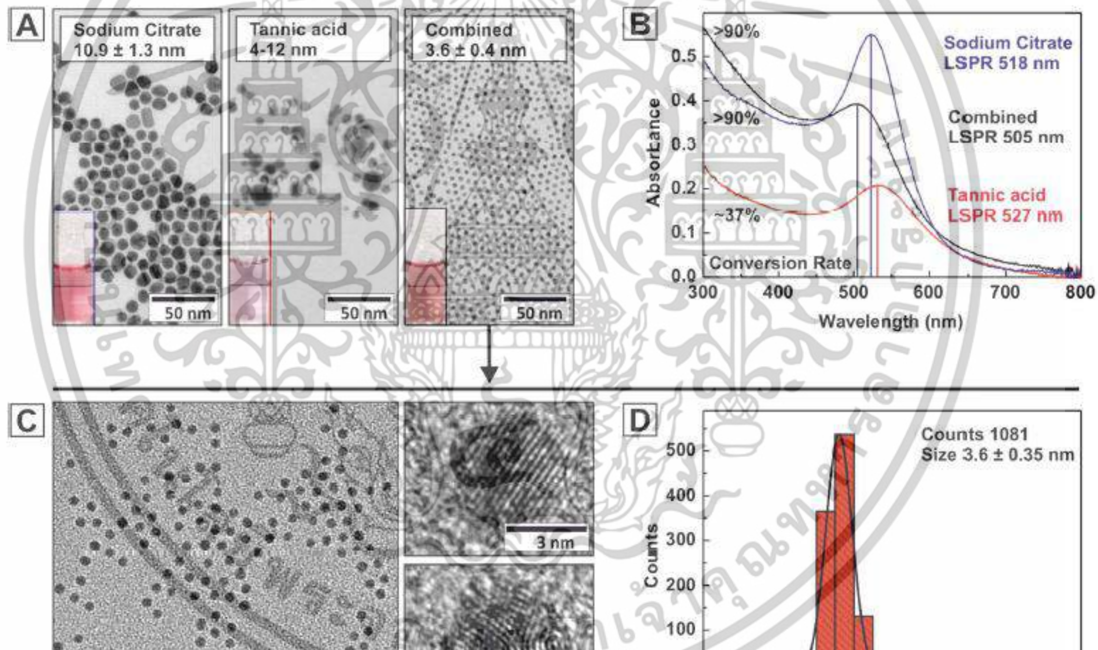
รูปที่ 2.11 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองตัวอย่าง (Au NPs) และรักษาเสถียรภาพด้วย 1,4-dithiothreitol (Au-DTT NPs) และ l-glutathione (Au-GSH NPs) [38]

2.3.1.2 ไฮดรอกซิล (–OH) และ คาร์บอกซิล (–COOH) [39]

จากงานวิจัยของ J. Piella และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยวิธี Inverse Turkevich และใช้โปรโตคอลการสังเคราะห์แบบค่อยเป็นค่อยไป (Step by step seeded-growth) โดยการเติมกรดแทนนิก (TA) ลงในสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรออเรตเล็กน้อย และอาศัยการรีดิวซ์ไฮโดรเจนเตตระคลอโรออเรตด้วยโซเดียมซิเตรต (SC) การใช้กรดแทนนิกในปริมาณเล็กน้อยในขั้นตอนแรก จะเป็นการสร้างนิวเคลียส ทำให้สามารถสร้างอนุภาคนาโนทองนาดเล็กประมาณ 3.5 นาโนเมตร ที่มีการกระจายตัวของขนาดต่ำได้ (Narrow size distributions) อนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนทองที่สังเคราะห์ขึ้นจะมีขนาดที่สม่ำเสมอ (Uniformity in size) และมีลักษณะเป็นวงกลม (Circularity) ดังรูป รูปที่ 2.12A และการที่สารละลายมีสีน้ำตาลอมส้มบ่งชี้ถึงการก่อตัวของอนุภาคนาโนทองที่มีขนาดเล็กมาก การใช้ TA ในปริมาณเล็กน้อยที่มีกำลังรีดิวซ์สูงกว่า SC มีความสำคัญต่อการก่อตัวของอนุภาคขนาดเล็กเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม ในการสังเคราะห์จำเป็นต้องใช้สารรีดิวซ์ทั้งสองชนิด มิฉะนั้นอนุภาคที่ได้จะมีขนาดใหญ่ หรือมีขนาดค่อนข้างกระจายไม่สม่ำเสมอ จากรูปที่ 2.12B เมื่อใช้สารรีดิวซ์ผสมจะแสดง LSPR ที่ความยาวคลื่นที่สั้นลงที่ตำแหน่ง 504-505 นาโนเมตร (Blue shift) ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของอนุภาคนาโนทองที่มีขนาดเล็กกว่า ในทำนองเดียวกัน การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 และ 527 นาโนเมตร แสดงถึงการสังเคราะห์โดยใช้ SC หรือ TA เท่านั้น จากภาพถ่าย TEM ในรูปที่ 2.12 C และ D) อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์จากการใช้สารรีดิวซ์ทั้งสองชนิดร่วมกัน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคจะมีลักษณะกลมขนาดเล็ก และมีการกระจายตัวของขนาดที่แคบมาก

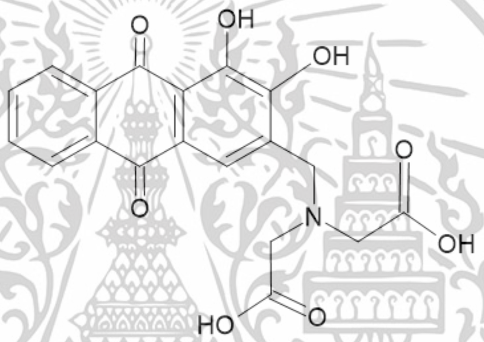


รูปที่ 2.12 (A) ภาพ TEM ของ AuNPs ที่สังเคราะห์โดยใช้ SC, TA และสารรีดิวซ์ผสม (B) แถบ LSPR ของอนุภาคนาโนทอง (C) ภาพ HR-TEM ของ AuNPs และ (D) ฮิสโทแกรมการกระจายของขนาดอนุภาค [39]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 Alizarin Complexone

Alizarin Complexone; ALz ($C_{19}H_{15}NO_8$) หรือ 2-[carboxymethyl-[(3,4-dihydroxy-9,10-dioxoanthracen-2yl)methyl]amino]acetic acid หรือ Alizarin Fluorine Blue เป็นสารคีเลตที่ใช้กันทั่วไปในงานทางเคมีวิเคราะห์เพื่อตรวจวัดไอออนของโลหะเชิงปริมาณ โดยเฉพาะแคลเซียมและแมกนีเซียม โดยการสร้างสารเชิงซ้อนที่เสถียรกับไอออนของโลหะในสารละลาย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสี ซึ่งสามารถตรวจติดตามได้โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หรือเทคนิคการวิเคราะห์อื่นๆ ความเข้มของสีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของไอออนของโลหะในสารละลาย [40] มากไปกว่านั้น ALz ยังมีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสงอีกด้วย (Flurophore) ซึ่งสามารถติดตามการเรืองแสงได้โดยการใช้เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ [41]



รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของ Alizarin Complexone

จากคุณสมบัติที่สามารถเกิดสารเชิงซ้อนที่เสถียรกับโลหะไอออน และคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสง อีกทั้ง ALz มีหมู่ฟังก์ชันหลายตำแหน่งบนโครงสร้าง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ ALz เป็นสารตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวิเคราะห์ฮิสตามีน โดยจะใช้เป็นสารรักษาสเถียรภาพอนุภาคนาโนทอง ซึ่งอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้นอกจากจะสามารถแสดงเอกลักษณ์ LSPR ได้แล้ว ยังช่วยส่งเสริมคุณสมบัติการเรืองแสงให้แก่ ALz อีกด้วย

2.5 Dual-signal sensor: Fluorometric and colorimetric

Dual-signal sensor เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์แบบโหมดคู่ โดยอาศัยวัสดุชนิดเดียวกันหรือสารเติมแต่งเพื่อต่อยอดเพิ่มเติมคุณสมบัติสำหรับวัสดุที่ใช้ในการตรวจวัด เพื่อแสดงเอกลักษณ์ที่หลากหลาย ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวัสดุนาโนที่สามารถแสดงเอกลักษณ์ได้ในสองโหมด ที่สามารถตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer โดยเทคนิค UV-visible spectrophotometry ถูกใช้เพื่อพัฒนาการตรวจวัดเชิงสี (Colorimetric

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

method) ซึ่งสามารถแบ่งช่วงการดูดกลืนแสงออกเป็นช่วงอัลตราไวโอเลต และช่วงที่มองเห็นได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นของสารดูดกลืนแสงที่ใช้ [42] ค่าการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดมีความเป็นเอกลักษณ์ และสามารถเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงจากการเกิดอันตรกริยาของสาร อีกกระทั่งในงานด้านอนุภาคนาโนยังสนใจการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงของสารเป็นสิ่งสำคัญอีกด้วย อย่างไรก็ตามเพื่อความไวและความจำเพาะที่มากขึ้น จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดการเรืองแสงและการวัดสีแบบสองโหมด ซึ่งเอื้อต่อการวิเคราะห์ที่หลากหลาย Fluorometric method เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยการติดตามการเรืองแสงของวัสดุ ซึ่งเป็นการปล่อยรังสีประเภทหนึ่งที่เกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลดูดซับพลังงานที่ความยาวคลื่นกระตุ้น พลังงานกระตุ้นที่ให้กับโมเลกุลที่สถานะพื้นจะส่งผลให้อิเล็กตรอนอยู่ในสถานะกระตุ้น หลังจากนั้นจะเกิดการคายพลังงานตกกลับสู่สถานะต่ำสุดของการกระตุ้น (Lowest excited singlet state) และปลดปล่อยพลังงานในรูปของแสงเพื่อกลับสู่สถานะพื้นของโมเลกุล [43] ในขณะที่การดูดกลืนแสงเกิดขึ้นในช่วงเวลาน้อยกว่า 10^{-15} วินาที กระบวนการคายแสงจากสถานะกระตุ้นไปจนถึงสถานะพื้นจะช้ากว่ามาก ดังนั้น สารเรืองแสงจึงให้ข้อมูลเกี่ยวกับอันตรกิริยาของฟลูออโรฟอร์กับโมเลกุลและตัวทำละลายที่อยู่รอบๆ ได้ ไม่เหมือนกับการดูดกลืนแสง

ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของแสงกระตุ้น

$$F = 2.303 * K * I_0 * \varepsilon bc$$

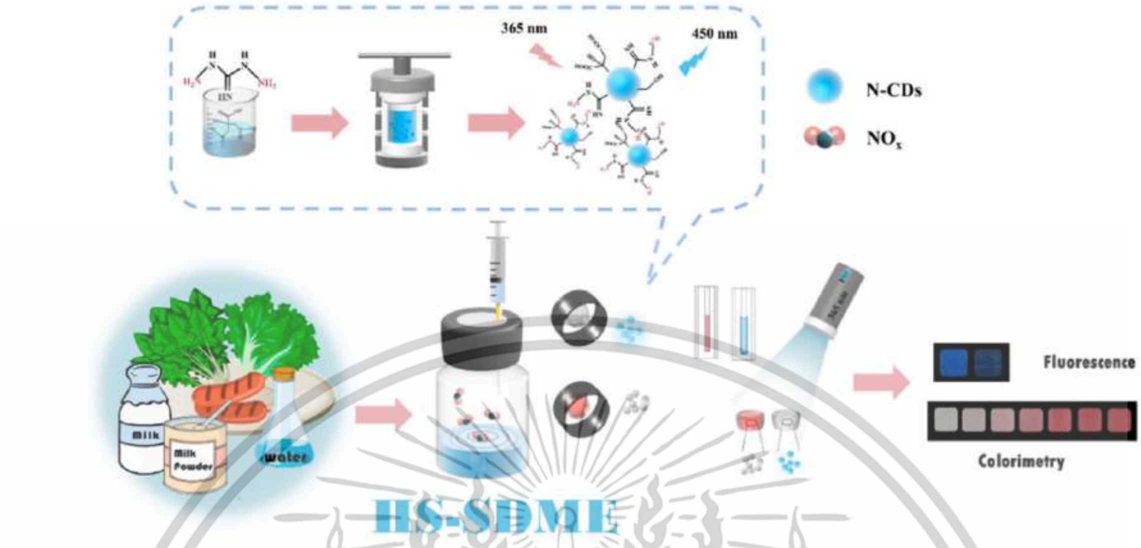
โดยที่ K คือ ค่าคงที่ของเครื่องมือ, I_0 คือ ความเข้มของแสงกระตุ้น, ε คือ ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง, b คือ ระยะของสารเรืองแสงต่อแหล่งกำเนิดแสง และ c คือ ความเข้มข้น เนื่องจากความเข้มของการเรืองแสงไม่ได้เป็นสัดส่วนต่อความเข้มของแสงตกกระทบ เช่นเดียวกับการวัดการดูดกลืนแสง ความไวของฟลูออเรสเซนซ์จึงสูงกว่ามาก เนื่องจากไม่ได้ถูกจำกัดโดยความสามารถของเครื่องมือในการแยกความแตกต่างระหว่างแสงตกกระทบและความเข้มแสงที่ตรวจพบ ด้วยเหตุนี้ การวัดจึงจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นน้อยลง ซึ่งทำให้เทคนิค Fluorometric method สามารถเพิ่มความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ได้ดียิ่งขึ้น

2.5.1 การเพิ่มประสิทธิภาพ Analytical performance ด้วย Dual-signal sensor

ในปัจจุบัน Dual-signal sensor ได้ถูกนำมาใช้งานทางด้านเคมีวิเคราะห์เป็นวงกว้าง โดยอาศัยวัสดุหลากหลายชนิด จากงานวิจัยของ J. Zhou และคณะ [44] ได้พัฒนาแพลตฟอร์มการตรวจจับไนไตรต์ที่มีความไวและเลือกจำเพาะสูง โดยใช้คาร์บอนดอตที่เจือไนโตรเจน (N-CDs) (รูปที่ 2.14) ร่วมกับกระบวนการสกัดแบบ Single-drop headspace microextraction และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคสองโหมดของฟลูออโรเมตริกและการวัดสี โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนไตรต์การเปลี่ยนแปลงสีจะเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ไม่มีสีไปจนถึงสีแดงเข้ม สำหรับการติดตามการเรืองแสง จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการเปลี่ยนแปลงจากมีความเข้มแสงสูงไปจนถึงไม่เกิดการเรืองแสงของ N-CDs ตามความเข้มข้นของไนไตรต์ที่สูงขึ้น



รูปที่ 2.14 แผนผังแสดงเทคนิคการตรวจวิเคราะห์แบบสองโหมดด้วยฟลูออโรเมตริกและการวัดสีด้วยสายตาของไนไตรต์ในตัวอย่างอาหาร [44]

จากงานวิจัยข้างต้นได้แสดงให้เห็นถึงข้อดี และขีดจำกัดการจรวจวัดที่ต่ำลงด้วยการพัฒนาเซนเซอร์เชิงสี สู่เซนเซอร์การตรวจวัดการเรืองแสง แต่ยังสามารถใช้การมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้ในการตรวจวิเคราะห์ภาคสนาม แต่ข้อด้อยการเลือกจำเพาะจากงานวิจัยดังกล่าวยังสามารถพัฒนาเพิ่มเติมได้ หากเพิ่มเติมตัวกลางสารเลือกจำเพาะ (Selective reagent) ต่อเป้าหมายได้

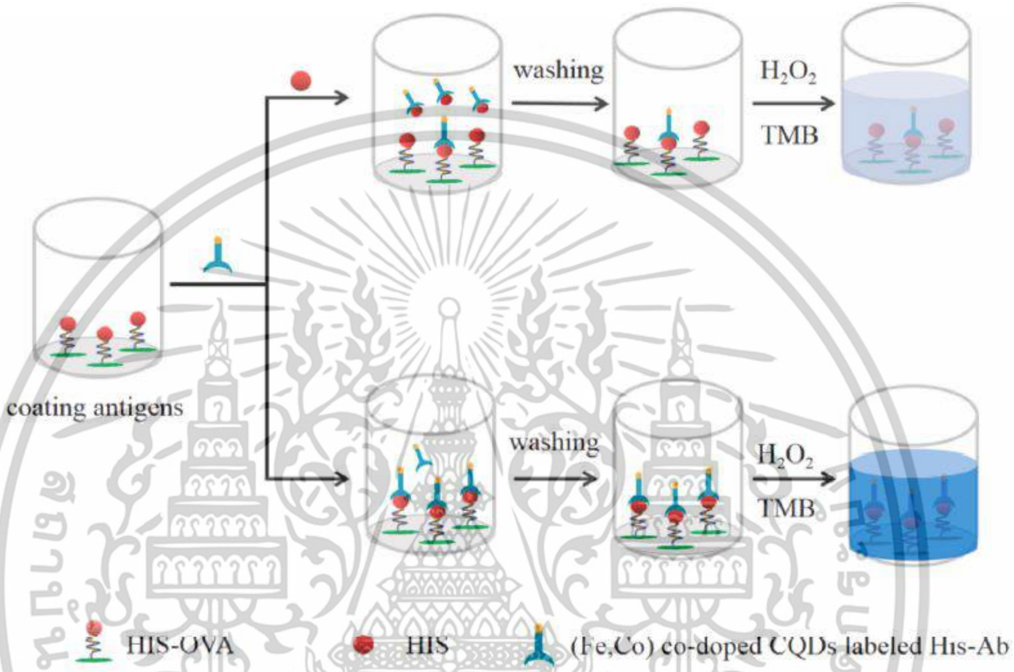
2.5.2 การเพิ่มประสิทธิภาพการเลือกจำเพาะ (Selectivity)

2.5.2.1 แอนติบอดี (Antibody)

จากงานวิจัยของ Yi-Fang Li และคณะ [45] ได้พัฒนา Fe&Co co-doped CDs สำหรับการตรวจวัดฮีสทามีน ซึ่งโพรบที่ได้พัฒนาขึ้นมีพฤติกรรมคล้ายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยทำการสังเคราะห์โดยใช้วิธี One-step hydrothermal อีกทั้งยังเพิ่มความเลือกจำเพาะด้วยแอนติบอดีโมโนโคลนอลของหนู (His-Ab) โดยหลักการในการตรวจวัดฮีสทามีนจะมีพื้นฐานมาจากวิธี ic-ELISA ในกระบวนการตรวจวัดจะทำการเคลือบ (Coating) แอนติเจนของฮีสทามีนบนแผ่นไมโครเวลล์ จากนั้นเติมฮีสทามีนลงในไมโครเวลล์ ตามด้วย Fe&Co co-doped CDs ที่มีฉลาก His-Ab ตามที่แสดงในรูปที่ 2.15 โดยการเปลี่ยนแปลงสีจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินจนถึงไม่มีสีตามความเข้มข้นของฮีสทามีน หากในตัวอย่างไม่มีฮีสทามีน Fe&Co co-doped CDs ที่ติดฉลาก His-Ab จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ถูกเคลือบไว้ และเมื่อเติม H_2O_2 และ TMB ลงในสารละลายผสม Fe&Co co-doped CDs จะเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ระหว่าง H_2O_2 และ TMB ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และหากในตัวอย่างมีฮีสทามีน แอนติเจนที่ Coat ไว้บนแผ่นจะไม่เหลือสำหรับการเข้าคู่ทำปฏิกิริยากับ Fe&Co co-doped CDs ได้ ดังนั้น ในขั้นตอนการล้าง Fe&Co co-doped CDs จะถูกกำจัดออก ทำให้การออกซิไดซ์ในขั้นตอนสุดท้ายไม่เกิดขึ้น สารละลายจึงมีสีใสไม่มีสี ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าปริมาณฮีสทามีนในตัวอย่างปลาสามารถตรวจจับได้อย่างรวดเร็วด้วยความไวและความแม่นยำสูง ที่ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 2.15 ภาพประกอบแผนผังของการตรวจวัดฮีสทามีนโดยใช้ Fe&Co co-doped CDs ที่มีฉลาก ic-ELISA [45]

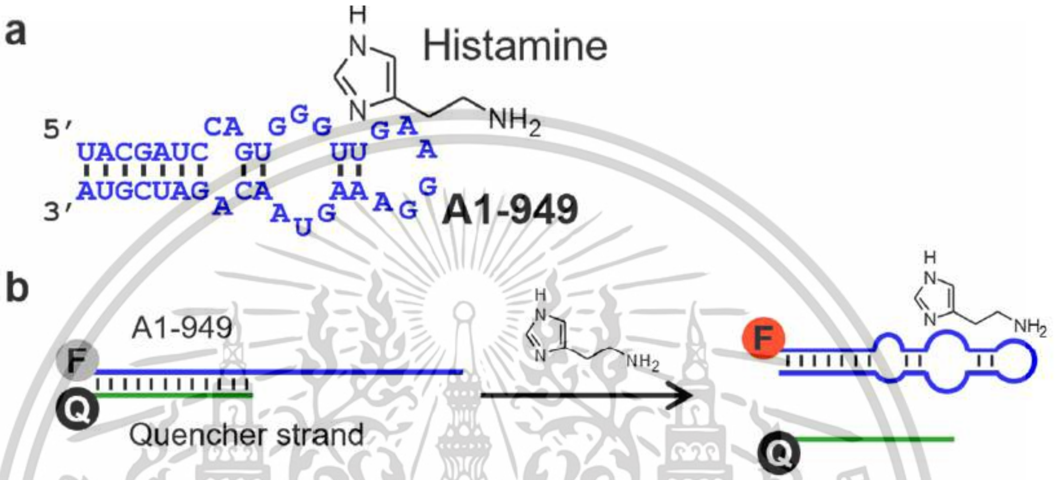
จากงานวิจัยข้างต้นพบว่า แอนติบอดีถูกใช้เป็นสารเลือกจำเพาะต่อฮีสทามีน ซึ่งสามารถพัฒนาสู่เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบ Dual-signal sensor ได้ ซึ่ง TMB เป็นหนึ่งใน Chromophore/Fluorophore ที่นิยมมากในปัจจุบัน และยังให้ขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำ และ เลือกจำเพาะอีกด้วย

2.5.2.2 แอปทาเมอร์ (Aptamer)

แอปทาเมอร์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว (DNA หรือ RNA) ที่สามารถจำแนกโมเลกุลด้วยความจำเพาะของโครงสร้างที่ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์มาเพื่อทำปฏิกิริยากับเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง แอปทาเมอร์สามารถสังเคราะห์ผ่านกระบวนการที่เรียกว่าวิวัฒนาการอย่างเป็นระบบของลิแกนด์โดยการเสริมสมรรถนะแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล (Systematic evolution of ligands

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

by exponential enrichment; SELEX) เป้าหมายอาจเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก โปรตีน หรือแม้แต่เซลล์ขนาดใหญ่ แอปทาเมอร์มีข้อได้เปรียบหลายประการเหนือแอนติบอดี ตัวอย่างเช่น แอปทาเมอร์สามารถสังเคราะห์ทางเคมีได้ จึงมีค่าใช้จ่ายในการผลิตน้อยกว่าและเสถียรกว่าเมื่อเทียบกับแอนติบอดี ยิ่งไปกว่านั้น ลักษณะที่คาดเดาได้ของไฮบริดิเซชันกรดนิวคลีอิกยังช่วยให้สามารถพัฒนากลยุทธ์ต่างๆ มากมายเพื่อออกแบบแอปทาเมอร์ให้เป็นเซนเซอร์ได้ (Aptasensor)



รูปที่ 2.16 (A) ลำดับแอปทาเมอร์ A1-949 และโครงสร้างทุติยภูมิที่ทำนายโดย Mfold (B) ภาพประกอบแผนผังของการออกแบบฮีสทามีนแอปทาเซนเซอร์ ฮีสทามีนแอปทาเมอร์ (สีน้ำเงิน) ติดฉลากเรืองแสงที่ปลาย 5′ และไฮบริไดซ์กับ Quencher DNA strand การจับกันของฮีสทามีนกับแอปทาเมอร์ทำให้ Quencher strand เคลื่อนที่ ส่งผลให้เรืองแสงเพิ่มขึ้น [46]

ในทางกลับกัน การพัฒนาแอปทาเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง ยังคงมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้แอปทาเมอร์ในการพัฒนาเซนเซอร์เชิงสีและและยิ่งไปกว่านั้นในเซนเซอร์การเรืองแสง แต่จากงานวิจัยของ Mohammed Dwidar และคณะ [46] แอปทาเมอร์ A1-949 ได้ถูกพัฒนาสู่เซนเซอร์การเรืองแสงได้สำเร็จ (รูปที่ 2.16) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับฮีสทามีนด้วยความเลือกสัมพันธ์ (Affinity) และความจำเพาะสูง แอปทาเมอร์ A1-949 ถูกใช้เพื่อออกแบบแอปทาเซนเซอร์ที่ใช้การเรืองแสง ซึ่งสามารถตรวจจับความเข้มข้นของฮีสทามีนที่ต่ำถึง 1 ไมโครโมลต่อลิตร

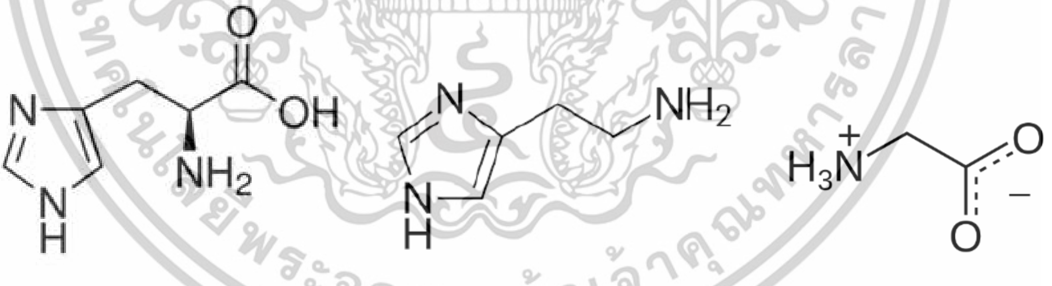
2.5.2.3 Metal affinity [47]

ไอออนของโลหะมีบทบาทสำคัญในระบบทางชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหมู่โปรตีน ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างไอออนของโลหะและโปรตีนเหล่านี้ รวมไปถึงการตรวจจับและระบุสารประกอบโลหะที่เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และง่ายดาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างของเปปไทด์ที่สำคัญประกอบด้วยกรดอะมิโนอัลฟา ซึ่งจะมีกลุ่มอะมิโนปลาย (-NH_2) และกลุ่มคาร์บอกซิลปลาย (-COOH) เสมอ รวมทั้ง Side chain (หมู่ R) ที่มีฟังก์ชันที่แตกต่างกัน กลุ่มอะมิโนและคาร์บอกซิล หรือ หมู่ฟังก์ชันต่างๆ Side chain เหล่านี้เป็นตำแหน่งสำคัญในการจับกับไอออนของโลหะ หากมีหมู่ให้ (Donor group) ที่สามารถจับกับไอออนของโลหะได้ ตัวอย่างเช่น อะลานีนประกอบไปด้วย Weakly coordinating side-chain donor groups ในขณะที่ซิสเตอีน (ไทออล) และฮีสทามีน (อิมิดาโซล-N) มีกลุ่มที่ชอบ Coordinating สูง ทำให้ไอออนของนิเกิล (II) สามารถสร้างคอมเพล็กซ์ที่เสถียรกับเปปไทด์และโปรตีนส่วนใหญ่ได้ โดยจะจับกับอะตอมไนโตรเจนของกลุ่มอะมิโนหรืออิมิดาโซลปลาย โดยลักษณะของสารเชิงซ้อนมักจะเกิดเป็นรูปทรงแปดหน้าและรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสมากที่สุด

จากงานวิจัยของ Y. Altun และคณะ [48] ได้ศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของสารเชิงซ้อนทั้งหมดที่เกิดขึ้นในสารละลาย รวมไปถึงโครงสร้างที่น่าจะเป็นไปได้มากที่สุดของสารผสมทั้งหมดดังรูปที่ 2.17 (ฮีสทิดีน ฮีสทามีน และไกลซีน) การศึกษาโดยส่วนมากจะเน้นที่ไอออน Cu (II), Ni (II) และ Zn (II) เนื่องจากโลหะทั้งสามชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด วงแหวนอิมิดาโซลหรือกลุ่มอะมิโนทำหน้าที่เป็นตำแหน่ง Binding site หลักสำหรับไอออนของโลหะ และด้วยเหตุนี้ จึงสามารถส่งเสริมการดีโปรโตเนตทีละขั้นตอน (Stepwise deprotonation) และการโคออร์ดิเนตที่ตามมาของตำแหน่ง Binding site อื่นๆ ส่งผลให้เกิดการก่อตัวของวงแหวนคีเลตที่มีห้าเหลี่ยมที่เสถียรทางไฮโดรไลซิสและมีพันธะ M-N



รูปที่ 2.17 โครงสร้างทางเคมีของ ฮีสทิดีน ฮีสทามีน และ ไกลซีน ตามลำดับ

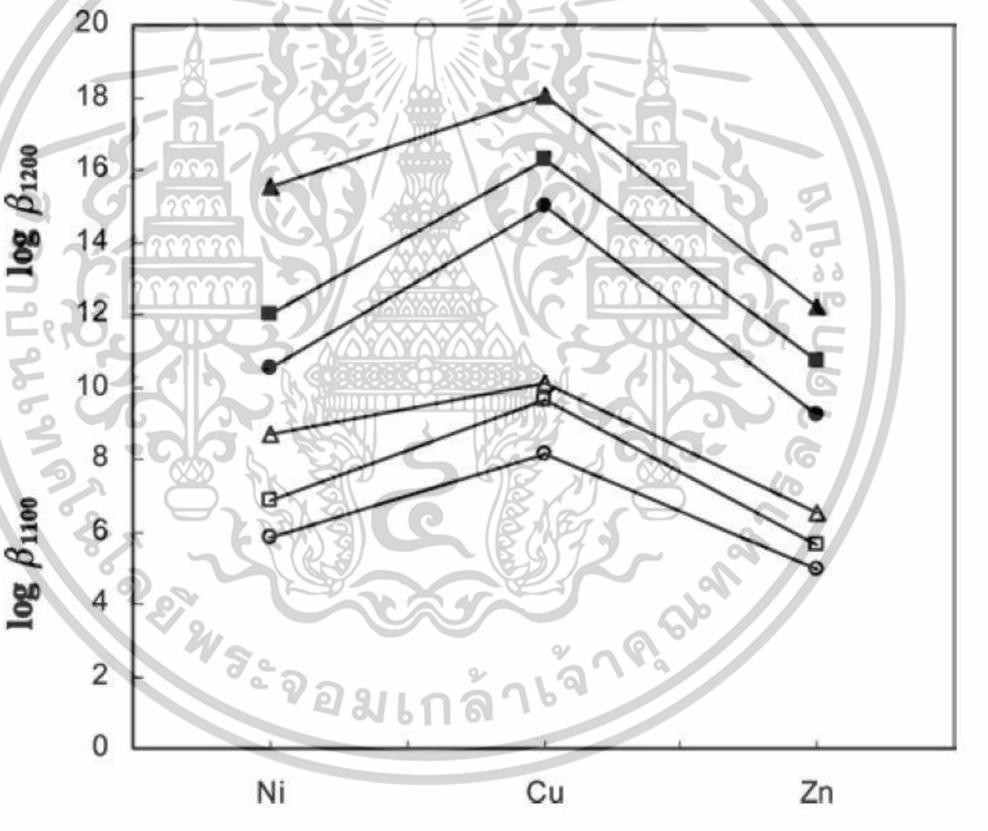
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ค่าคงที่ของการโปรโตเนตและความเสถียร β_{pqrs} ($[M_pA_qB_rH_s]\lambda([M]^p[A]^q[B]^r[H]^s)$ ของคอมเพล็กซ์หลัก ฮิสทิดีน (His) ฮีสทามีน (Him) และไกลซีน (Gly) ที่ (25.0 ± 0.1) °C และ I = 0.10 M (KCl) [48]

	ลิแกนด์	log β_{0101}	log β_{0102}	log β_{0103}	log β_{1100}	log β_{1101}	log β_{1200}	log β_{1201}	log β_{1202}	log β_{1300}
H (โปรตอน)	His	9.11	15.19	16.96						
		9.09(4)[a]	15.11(4)[a]	16.81(10)[a]						
	Him	9.79	15.77	–						
		9.83(3)[a]	15.90(5)[a]	–						
	Gly	9.58	11.92	–						
		9.56(2)[a]	11.92(4)[a]	–						
Cu (II)	His				10.11	14.07	18.01	23.88		
					10.135(2)[b]	14.13(1)[b]	18.095(6)[b]	23.921(5)[b]	27.23	–
					10.12(4)[c]	14.16(5)[c]	18.10(6)[c]	23.85(4)[c]	27.48(5)[b]	–
	Him				9.60	12.67	16.28	21.87	–	–
					9.56[d]	2.88[d]	16.06[d]	21.82[d]	–	–
	Gly				8.14	11.09	14.98	19.00	–	–
					8.13(7)[a]	11.05(30)[a]	15.00(10)[a]		–	–
Ni (II)	His				8.68	12.30	15.55	20.62	–	–
					8.636(2)[b]	12.28(3)[b]	15.456(6)[b]	20.49(5)[b]	–	–
	Him				6.87	11.86	11.97	–	–	15.17
					6.80(4)[a]	11.51[a]	11.85(10)[a]	–	–	15.0(1)[b]
	Gly				5.80	–	10.50	–	–	14.09
					5.78(5)[a]	–	10.58(7)[a]	–	–	14.00(2)[a]
Zn (II)	His				6.52	11.47	12.11	18.14	–	–
					6.476(3)[b]	11.42(2)[b]	12.075(5)[b]	17.89(2)[b]	–	–
	Him				5.62	12.45, 12.1[a]	10.71	–	–	–
					5.25(10)[a]	–	10.20(20)[a]	–		–
	Gly				4.93	–	9.23	–	–	11.65
					4.96(3)[a]	–	9.19(8)[a]	–	–	11.6(1)[b]

หมายเหตุ. Uncertainties in the equilibrium constants are estimated as ±0.5 in the last significant digit (σ fit (0.02) ซึ่ง a—HCl, b—Solution(a)+histidine, c—Solution(b)+metal(II), d—Solution(a)+histamine

ค่าคงที่ของการก่อตัว (ตารางที่ 2.3) ที่ได้จากการศึกษานั้นแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าลำดับความเสถียรของระบบไบนารีลิแกนด์คือ His > Him > Gly เมื่อเปรียบเทียบจากค่าการก่อตัวที่เสถียรของโครงสร้างในสารละลายทั้งหมด นอกจากนี้ รูปที่ 2.18 ยังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่ของเสถียรภาพ log β_{1100} และ log β_{1200} ตามลำดับ และเลขอะตอมของโลหะที่ใช้ อาจสังเกตได้ว่าแนวโน้มของเส้นโค้งแสดงให้เห็นว่าเสถียรภาพของสารเชิงซ้อนเป็นไปตามแนวโน้ม Cu (II) > Ni (II) > Zn (II) ซึ่ง Cu (II) มีความเสถียรในการก่อตัวสูงที่สุดในบรรดาสารเชิงซ้อนฮีสทิดีน ฮีสทามีน และไกลซีนทั้งหมด ไม่มีปัจจัยที่สามารถอธิบายลำดับความเสถียรของสารเชิงซ้อนนี้ได้อย่างน่าพอใจ อัตราส่วนของประจุต่อรัศมีถือว่ามีความสำคัญเป็นอันดับแรก ปัจจัยที่เป็นไปได้อื่นๆ ได้แก่ รัศมีไอออนิกที่ลดลงและศักย์ไอออนิกที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ปัจจัยทั้งหมดเหล่านี้เชื่อมโยงกัน ซึ่งรายงานไว้ก่อนหน้านี้สำหรับระบบที่คล้ายกันและสอดคล้องกับลำดับความเสถียรของเออร์วิง–วิลเลียมส์



รูปที่ 2.18 ความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของค่าคงที่เสถียรภาพ log β_{1100} และ log β_{1200} สำหรับฮีสทิดีน ฮีสทามีน และไกลซีน กับสารเชิงซ้อน Ni(II), Cu(II) และ Zn(II) และเลขอะตอมของโลหะที่ใช้ [(▲) ฮีสทิดีน (■) ฮีสทามีน (●) ไกลซีน สำหรับค่า log β_{1100} และ (△) ฮีสทิดีน (□) ฮีสทามีน (○) ไกลซีน สำหรับค่า log β_{1200} [48]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับคอมเพล็กซ์ $[M(HimH)]^{3+}$ ของฮีสทามีน การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบโมโนเดนเตตมีแนวโน้มมากกว่าสำหรับระบบ Cu (II) ตามความเป็นเบสที่ต่ำกว่า ไม่ว่าจะโดยอิมิดาโซลหรือไนโตรเจนอะมิโน ความแตกต่างหลักระหว่างฮีสทิดีนและฮีสทามีนคือโหมดการจับของลิแกนด์ 'HA' ที่มีโปรตอนเดียว ซึ่งมีอะตอมของตัวให้ไนโตรเจนอะตอมหนึ่งถูกโปรโตเนต (Nitrogen donor atoms protonated) ในกรณีของฮีสทามีน การโคออร์ดิเนตแบบโมโนเดนเตตเกิดขึ้นผ่านอะตอมไนโตรเจนอิมีดาโซล ในขณะที่กลุ่มอะมิโนที่เป็นเบสมากขึ้นจะถูกโปรโตเนต

ตารางที่ 2.4 ค่าคงที่เสถียรภาพ β_{pqrs} ($[M_pA_qB_rH_s]\lambda([M]^p[A]^q[B]^r[H]^s)$) ของคอมเพล็กซ์ลิแกนด์ผสมกับฮีสทิดีน (His) ฮีสทามีน (Him) และไกลซีน (Gly) ที่ (25.0 ± 0.1) °C และ I = 0.10 M (KCl) [48]

M(II)	ลิแกนด์ A	ลิแกนด์ B	log β_{1100}	log K^{MA}_{MAB}	log K^{MB}_{MBA}	Δlog K	log X	Δ_{1100}
Cu	His	Him	18.33	8.22	8.73	−1.38	2.37	0.88
	His	Gly	17.47	7.36	9.33	−0.78	1.95	0.68
	Him	Gly	17.04	7.44	8.90	−0.70	2.82	1.11
Ni	His	Him	14.57	5.69	7.50	−1.18	1.22	0.78
	His	Gly	13.43	4.75	7.63	−1.05	0.81	0.10
	Him	Gly	11.77	4.90	5.97	−1.09	1.07	0.23
Zn	His	Him	11.48	4.96	5.86	−0.66	0.14	−0.23
	His	Gly	10.95	4.43	6.02	−0.50	0.56	−0.02
	Him	Gly	10.00	4.38	5.07	−0.55	0.06	−0.27

หมายเหตุ. Uncertainties in the equilibrium constants are estimated as ±0.5 in the last significant digit (σ fit (0.02)
โดย M=metal ion [Cu(II), Ni(II) or Zn(II)], A = ligand A, B = ligand B, H = hydrogen ion (proton)

ต่อมาได้ทำการศึกษาค่าคงที่การก่อตัวของสารละลายที่มีลิแกนด์มากกว่าหนึ่งชนิดต่อการเกิดเป็นสารเชิงซ้อนของโลหะทั้ง 3 ชนิดแสดงดังตารางที่ 2.4 พบว่าการก่อตัวของสารเชิงซ้อน $[M(HisHim)]^+$ นั้นเกิดขึ้นได้น้อยกว่า [M(HisGly)] และ $[M(HimGly)]^+$ อาจเป็นเพราะความคล้ายคลึงกันของลิแกนด์ทั้งสองในแง่ของลักษณะของอะตอมผู้ให้ อีกทั้งการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Cu (II) ต่อฮีสทามีนจะเกิดพิษที่รุนแรงขึ้นและยืดอายุของฮีสทามีน อาจเป็นผลมาจากการก่อตัวของสารเชิงซ้อน $[Cu(HisHim)]^+$ ที่มีประจุบวก นอกจากนี้ สำหรับฮีสทิดีน ค่า log K แสดงให้เห็นชัดเจนว่าสารประกอบเชิงซ้อนไบนารีนั้นเกิดขึ้นได้มากกว่ากับสารให้ประจุลบ (ไกลซีน) เมื่อเทียบกับสารให้ที่เป็นกลาง (ฮีสทามีน)

ดังนั้น ในการพัฒนาวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจโลหะ Ni (II) มากกว่าเมื่อพิจารณาจากความเป็นไปได้ในการตรวจวัด การตรวจวัดในตัวอย่างจริงจะประกอบด้วยลิแกนด์ผสมหลายชนิด ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

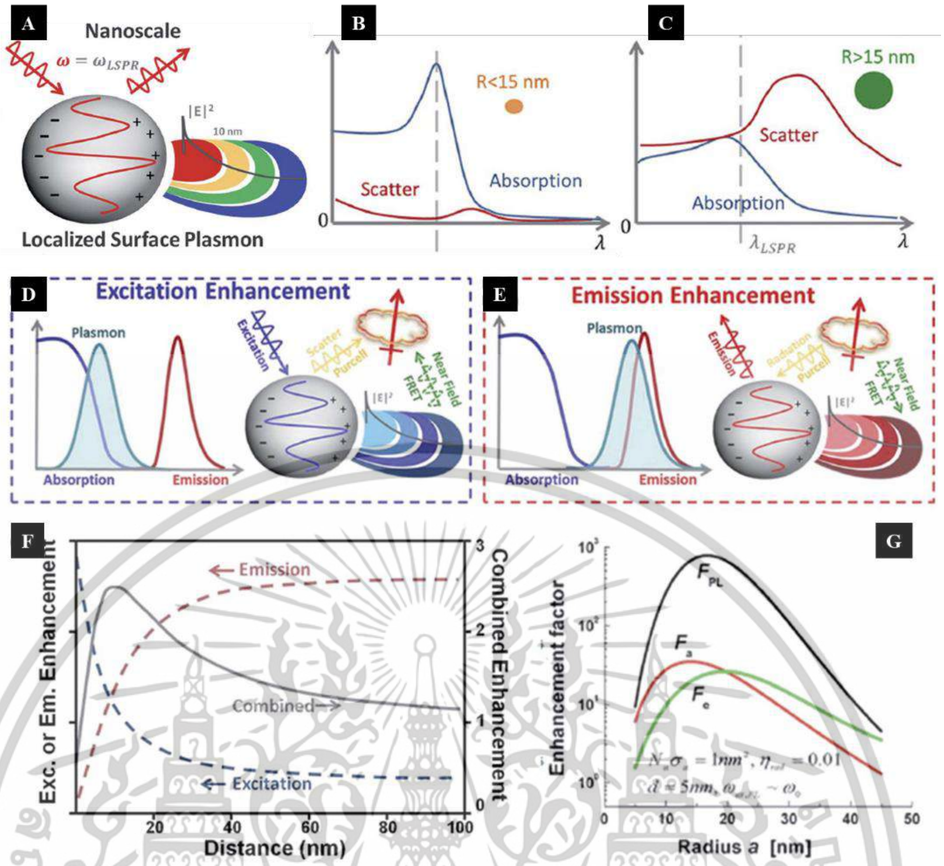
จากค่า log X ที่มากที่สุดเป็นลำดับต่อมาสำหรับคอมเพล็กซ์ลิแกนด์ผสมคือ Ni(II) มากไปกว่านั้น การก่อตัวของคอมเพล็กซ์ผสม Zn(II) จะเกิดได้ดีกับ ฮีสทิดีน ในขณะที่ฮีสทามีนจะเกิดได้ดีกับ Ni(II) อาจอธิบายได้บางส่วนจากอะตอมผู้ให้ที่แตกต่างกัน คือออกซิเจนในฮีสทามีน

2.5.3 ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นใน Dual-signal sensor

2.5.3.1 Plasmon-enhanced fluorescence [49]

เซนเซอร์ PEF ตัวแรกมีรายงานในปี 1991 PEF ยังเรียกอีกอย่างว่าสเปกโตรสโคปีเรืองแสงเสริมพลาสมอนพื้นผิว (Surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy; SPFS) หรือโลหะเสริมฟลูออเรสเซนต์ (Metal-enhanced fluoresecence; MEF) จนถึงขณะนี้ยังไม่มีข้อตกลงการตั้งชื่อมาตรฐานสำหรับเซนเซอร์ประเภทนี้ สำหรับกลไกของปฏิสัมพันธ์ระหว่างพลาสมอนกับฟลูออเรสเซนต์ ต้องเข้าใจสถานะที่ถูกกระตุ้นของฟลูออโรฟอร์และพลาสมอนเสียก่อนจึงจะอธิบายกลไกการเพิ่มค่าฟลูออเรสเซนต์ด้วยพลาสมอนได้ พลังงานของพลาสมอนจะถูกเก็บไว้ในสนามแม่เหล็กไฟฟ้าเข้มข้นในพื้นที่หลังจากการกระตุ้น (รูปที่ 2.19A) หากอนุภาคโลหะมีขนาดเล็กและการกระเจิง (Scattering) ของอิเล็กตรอนมีอิทธิพลเหนือพลังงานนี้ พลังงานจะถูกแปลงเป็นความร้อนในที่สุดและพลาสมอนจะดูดกลืนแสงที่ตกกระทบ (รูปที่ 2.19B) หากการหน่วง (Dampening) การแผ่รังสีมีอิทธิพลเหนือการสลายตัวของพลาสมอน (Plasmon's decay) พลังงานจะแผ่รังสีกลับเข้าไป (Re-radiated) ในความยาวคลื่นที่อยู่ไกลออกไปในลักษณะของการกระเจิง (รูปที่ 2.19C) สถานะที่กระตุ้นของฟลูออโรฟอร์สามารถอธิบายได้ด้วยแบบจำลองไดโพลการแผ่รังสีที่คล้ายกัน และจะผ่านกระบวนการกระตุ้น (Excitation) การคายแสง (Relaxation) และดูดกลืนแสงหรือแผ่รังสีกลับแบบเดียวกัน (Absorption หรือ re-radiation) เมื่อทำปฏิกิริยากับแสง อย่างไรก็ตาม มีความแตกต่างที่สำคัญหลายประการ สถานะกระตุ้นของฟลูออโรฟอร์มีเวลายาวนานในระดับนาโนวินาที ซึ่งจะแผ่รังสีอย่างรุนแรงหลังจากการปลดปล่อยทางความร้อน (Stoke's shift) แทนที่จะเป็นการกระเจิงของพลาสมอนที่แทบจะเกิดขึ้นทันที นอกจากนี้ อิเล็กตรอนในหน้าตัดการดูดกลืนแสงและ Local field ของฟลูออโรฟอร์เพียงไม่กี่ตัวก็ไม่แข็งแรงเท่ากับไดโพลพลาสมอนิกที่มีอิเล็กตรอนหลายตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.19 (A) เกิดการสั่นพ้องของพลาสมอนบนพื้นผิวเฉพาะที่ เมื่ออนุภาคนาโนโลหะมีขนาดเล็กกว่าความยาวคลื่นตกกระทบ (B) การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนที่มีขนาดมากกว่า 15 นาโนเมตร (C) การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กกว่า 15 นาโนเมตร (D) พลาสมอนทับซ้อนกับการดูดกลืนของฟลูออโรฟอร์ การเพิ่มการกระตุ้นจะเกิดขึ้นได้ผ่านสนามใกล้และ FRET หรือการกระเจิง (E) พลาสมอนทับซ้อนกับการปล่อยของสารเรืองแสง การเพิ่มการเปล่งแสงจะเกิดขึ้นได้ผ่านเอฟเฟกต์เพอร์เซลล์หรือ FRET (F) การเพิ่มการกระตุ้น (เส้นสีแดง) จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ห่างไกลในขณะที่การเพิ่มการเรืองแสง (เส้นสีน้ำเงิน) จะถูกดับลงเมื่ออยู่ห่างไกล (G) รัศมีทรงกลมที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกระตุ้น (เส้นสีแดง) การเรืองแสง (เส้นสีเขียว) และการเพิ่มการเรืองแสงรวม (เส้นสีดำ) จะแตกต่างกันไปตามความสมดุลระหว่างการดูดกลืนและการกระเจิง [49]

การถ่ายเทพลังงานระหว่างพลาสมอนและฟลูออโรฟอร์ถูกควบคุมโดยปฏิสัมพันธ์แบบไดโพล-ไดโพล โดยกลไกที่แน่นอนนั้นถูกกำหนดโดยระยะห่าง ขั้นแรก หากพลาสมอนและฟลูออโรฟอร์อยู่ห่างกันไม่เกิน 1–10 นาโนเมตร สนามที่ไม่แผ่รังสีของไดโพลหนึ่งสามารถกระตุ้นไดโพลที่สองได้ ซึ่งเรียกว่าการถ่ายเทพลังงานเรโซแนนซ์ฟอสเตอร์ (FRET) ประสิทธิภาพการถ่ายโอนพลังงานใน FRET ขึ้นอยู่กับปัจจัยสองประการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. พฤติกรรมของระยะทางนั้นขึ้นอยู่กับการเหลื่อมซ้อนกันของสเปกตรัมระหว่างการแผ่รังสีของสถานะกระตุ้นของผู้ให้และการดูดกลืนสถานะพื้นฐานของตัวรับ ค่าระยะทางโดยปกติจะอยู่ในช่วง 3–8 นาโนเมตรใน FRET ของพลาสมอน/ฟลูออโรฟอร์ FRET สามารถเกิดขึ้นได้จากพลาสมอนไปยังฟลูออโรฟอร์หรือจากฟลูออโรฟอร์ไปยังพลาสมอน
2. พลาสมอนสามารถเพิ่มอัตราการแผ่รังสีของฟลูออโรฟอร์ได้โดยใช้เอฟเฟกต์เพอร์เซลล์ หากไดโพลแผ่รังสีไว้ในโพรงเรโซแนนซ์ ความเข้มของการแผ่รังสีจะขยายขึ้นเมื่อเกิดการ on-เรโซแนนซ์ และดับลงเมื่อเกิดการ off-เรโซแนนซ์ เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ว่าง

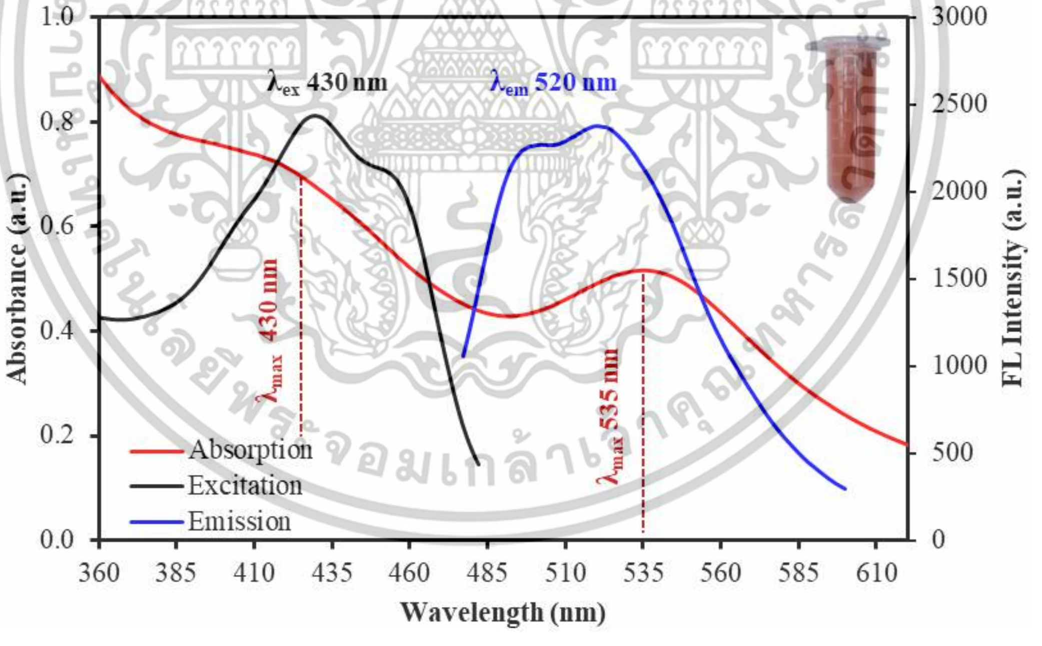
การเหลื่อมกันของสเปกตรัมระหว่างพลาสมอนและฟลูออโรฟอร์ จะกำหนดว่ามีเอฟเฟกต์ FRET หรือเพอร์เซลล์ และกลไกเหล่านี้จะนำไปสู่การเพิ่มหรือดับการแผ่รังสีฟลูออโรฟอร์หรือไม่ หากพลาสมอนเหลื่อมกับการดูดกลืนแสงของฟลูออโรฟอร์ อัตราการกระตุ้นของฟลูออโรฟอร์จะเพิ่มขึ้นจากค่าพื้นที่ว่าง (รูปที่ 2.19D) สำหรับอนุภาคนาโนโลหะที่ดูดกลืนแสงเป็นหลัก (Primarily absorb) ซึ่งโดยปกติจะมีขนาดเล็กกว่า 15 นาโนเมตร ฟลูออโรฟอร์จะถูกกระตุ้นผ่าน FRET โดย Local field ที่เข้มข้นของพลาสมอน สำหรับอนุภาคนาโนโลหะขนาดใหญ่ที่กระจายแสงเป็นหลัก (Primarily scatter) ซึ่งโดยปกติจะมีขนาดใหญ่กว่า 15 นาโนเมตร การเพิ่มจะเป็นไปได้ผ่านทั้ง FRET ในระยะใกล้ (10 นาโนเมตร) และเอฟเฟกต์เพอร์เซลล์ในระยะไกล (10–50 นาโนเมตร) (รูปที่ 2.19F) การเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นสูงสุด จะเกิดขึ้นได้โดยใช้อนุภาคนาโนที่ดูดกลืนแสงและไม่กระเจิงแสง รวมทั้งความเข้มของ Local field ของอนุภาค (รูปที่ 2.19G) เมื่อพิจารณาถึงการแลกเปลี่ยนระหว่าง FRET และผลกระทบของเพอร์เซลล์ การเปลี่ยนแปลงในระยะห่างไม่กี่นาโนเมตรจะเปลี่ยนแปลงการเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นอย่างมาก ทำให้สามารถสร้างเซนเซอร์ที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในสภาพแวดล้อมได้

หากพลาสมอนทับซ้อนกับการแผ่รังสีของฟลูออโรฟอร์ สามารถส่งผลให้เกิดทั้งการเพิ่มหรือการดับการแผ่รังสี (รูปที่ 2.19E) หากฟลูออโรฟอร์อยู่ภายในระยะไม่กี่นาโนเมตรของพลาสมอน การแผ่รังสีจะถูกดับลงโดย FRET (รูปที่ 2.19F) ที่ระยะเกินกว่า FRET การเพิ่มประสิทธิภาพของเพอร์เซลล์จะเกิดขึ้นเนื่องจาก Local density of optical states (LDOS) ที่เพิ่มขึ้นของสนามพลาสมอนิก และหากพลาสมอนสามารถกระเจิงแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการดูดกลืนแสง จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มประสิทธิภาพของการปล่อยฟลูออเรสเซนต์ (รูปที่ 2.19G) อย่างไรก็ตาม ระยะห่างที่เหมาะสมนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการเรืองแสง หรือ การดับแสง การดับแสงจะเกิดที่ระยะห่างเพียงไม่กี่นาโนเมตร และจะเปลี่ยนเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการเรืองแสง 10–100 เท่าในช่วง 10–30 นาโนเมตร จากนั้นจะค่อยๆ กลับสู่ระดับความเข้มของการแผ่รังสีปกติเมื่อระยะห่างเข้าใกล้หลายร้อยนาโนเมตร (รูปที่ 2.19F)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3.2 การประยุกต์ใช้ปรากฏการณ์สำหรับ Dual-signal sensor

ALz สามารถดูดกลืนแสงและเรืองแสงได้ เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติทางอิเล็กทรอนิกส์ที่เป็นเอกลักษณ์ ALz ประกอบด้วยวง Anthraquinone ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ติดอยู่ หมู่ไฮดรอกซิลเหล่านี้มีระบบอิเล็กตรอนแบบคอนจูเกตภายในโมเลกุล จึงสามารถดูดกลืนแสงและเรืองแสงได้ การดูดกลืนแสงใน ALz เกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลดูดกลืนโฟตอนของความยาวคลื่นจำเพาะภายในช่วงที่มองเห็นด้วยรังสี UV การดูดกลืนนี้เป็นผลมาจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างอิเล็กตรอนภายในระบบคอนจูเกตกับระดับพลังงานที่เกี่ยวข้องกับโฟตอนที่เข้ามา โฟตอนที่ถูกดูดกลืนจะส่งเสริมให้อิเล็กตรอนมีระดับพลังงานสูงขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลปรากฏเป็นสีในขณะที่ส่งผ่านหรือสะท้อนความยาวคลื่นที่เหลืออยู่ของแสง การเรืองแสงใน ALz จะสังเกตได้เมื่อโมเลกุลเกิดเหตุการณ์ที่เรียกว่าการคายพลังงานในรูปแบบการเรืองแสงหลังจากการดูดกลืนแสง อิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นในโมเลกุลสามารถกลับสู่สถานะพื้นได้โดยปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาเป็นแสง แสงที่ปล่อยออกมานี้มักจะมีความยาวคลื่นยาวกว่าแสงที่ถูกดูดกลืน และสามารถตรวจพบได้ว่าเป็นการเรืองแสง ความยาวคลื่นที่ปล่อยออกมาจำเพาะของ ALz ถูกกำหนดโดยโครงสร้างโมเลกุลและความแตกต่างของพลังงานระหว่างสถานะกระตุ้นและสถานะพื้น



รูปที่ 2.20 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง การกระตุ้นการเรืองแสงและการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz}

จากการทบทวนวรรณกรรมถึงข้อดีของ ALz ทางผู้วิจัยจึงได้เล็งเห็นถึงประโยชน์และความสามารถในการต่อยอด และ การประยุกต์ใช้ในงานด้านเซนเซอร์ รวมถึง ALz เป็นสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันหลากหลาย และสามารถเป็นตัวรักษาเสถียรภาพที่ดีให้แก่อนุภาคนาโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทองได้ โดยรวมแล้ว การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และ การเรืองแสงที่ตำแหน่ง 520 นาโนเมตร (รูปที่ 2.20) นั้นเป็นผลมาจากระบบคอนจูเกตที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลเมื่อมีปฏิกิริยากับแสง และในวิทยานิพนธ์ฉบับจึงนำคุณสมบัติของ ALz ที่กล่าวมาข้างต้น ประยุกต์ใช้เป็นตัวรักษาเสถียรภาพของอนุภาคนาโนทอง มากไปกว่านั้น อนุภาคนาโนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเรืองแสง ALz ได้ โดยการเพิ่มการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในระบบบนพื้นผิวของอนุภาค อีกกระทั่ง อนุภาคนาโนทองยังมีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงเอกลักษณ์ ภายใต้ปรากฏการณ์ SPR ณ ตำแหน่ง 535 นาโนเมตร ที่ยังสามารถติดตามเชิงสีได้อีกด้วย ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัดฮีสทามีน ด้วย Au^{0}-NPs_{ALz} ภายใต้ปรากฏการณ์การดูดกลืนแสงและการเรืองแสงในรูปแบบ Dual-signal sensor อีกทั้งยังพัฒนาโพรบการตรวจวัดจากปรากฏการณ์ Plasmon-enhanced fluorescence จากการเหลื่อมซ้อนทับกันของ Plasmon ของอนุภาคนาโนทองและการคายแสงของ ALz

นอกจากนี้ สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและการเรืองแสงมักเป็นภาพสะท้อนซึ่งกันและกัน เนื่องจากมีการกระจายที่เท่ากันระหว่างระดับพลังงานการสั่นสะเทือนของสถานะกระตุ้นและสถานะพื้น หลักการของ Franck-Condon [50] อธิบายว่าเนื่องจากนิวเคลียสมีขนาดค่อนข้างใหญ่ และการเปลี่ยนแปลงทางอิเล็กทรอนิกส์ที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสงและการดูดกลืนเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่รวดเร็วเช่นนี้ จึงไม่มีเวลาสำหรับการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส และ ระดับพลังงานการสั่นสะเทือน ดังนั้น จึงคงอยู่ประมาณเดิม ตลอดช่วงการเปลี่ยนผ่านทางอิเล็กทรอนิกส์

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยคลื่นความถี่อัลตราโซนิก

2.6.1.1 Sonochemical reduction method for controlled synthesis of metal nanoparticles in aqueous solutions

จากงานวิจัยของ Kenji Okitsu และคณะ [51] กระบวนการโซโนเคมิคัลได้รับการวิจัยอย่างมากในด้านการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะและวัสดุที่มีโครงสร้างนาโน สิ่งสำคัญคือการควบคุมการรีดักชันของไอออนโลหะ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการออกแบบและประยุกต์ใช้ให้เข้ากับการนำไปใช้งานในด้านต่างๆได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะประเภทต่างๆ เช่น MnO^{4-}, Au^{3+}, Au^{+} และ Pd^{2+} โดยศึกษาในสภาวะที่มีและไม่มีสารอินทรีย์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะ ซึ่งเกิดภายใต้ปฏิกิริยาต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

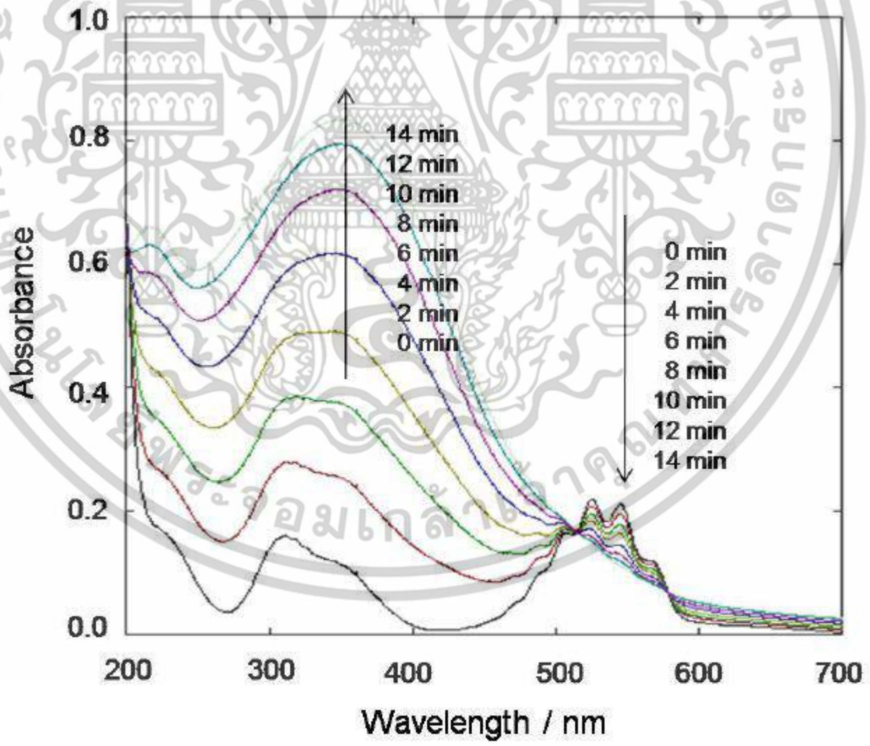
$H_2O \longrightarrow OH + H$ (thermolysis) ....(1)

$2OH \longrightarrow H_2O_2$ ....(2)

$2H \longrightarrow H_2$ ....(3)

$OH + H \longrightarrow H_2O$ ....(4)

เทอร์โมไลซิสของโมเลกุลของน้ำเกิดขึ้นเนื่องจากอุณหภูมิและแรงดันสูงจากฟองอากาศคาวิเทชันที่เกิดขึ้นในสารละลาย อนุมูล OH และอะตอมของ H ที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกันอย่างรวดเร็วจนเกิดเป็น H_2O_2, H_2 และ H_2O ซึ่งทำหน้าที่ในการรีดักชัน MnO^{4-} เป็น MnO_2 ประเภทของสารอินทรีย์ตัวกลางก็มีผลต่ออัตราการเกิดรีดักชันอีกด้วย โดยลำดับอัตราการเกิดรีดักชันจากสารอินทรีย์ตัวกลางที่ศึกษาได้คือ เมทานอล < เอทานอล < 1-โพรพานอล < 1-บิวทานอล จากผลการทดลองสรุปได้ว่า อัตราการเกิดรีดักชันขึ้นกับความไม่ชอบน้ำของโมเลกุลแอลกอฮอล์ในสารอินทรีย์นั้นๆ โมเลกุลที่มีความไม่ชอบน้ำสูงสามารถก่อตัวได้ง่ายในการเกิดฟองอากาศคาวิเทชันอะคูสติก ส่งผลให้มีการผลิตรีดักแทนท์ที่จำนวนมากขึ้น



รูปที่ 2.21 การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนของสารละลาย MnO_4 ในน้ำระหว่างการฉายรังสีอัลตราโซนิกภายใต้บรรยากาศอาร์กอน [51]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อทำความเข้าใจกลไกการรีดักชันของ MnO_4^- ด้วยวิธีโซโนเคมิคัลอย่างละเอียดมากขึ้น เราจึงได้ทำการศึกษาผลของแอลกอฮอล์เพิ่มเติม รูปที่ 2.21 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย MnO_4^- ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1-บิวทานอล 3.0 มิลลิโมลต่อลิตร ระหว่างการฉายรังสีอัลตราโซนิกจะเห็นได้ว่าค่าของการดูดกลืนแสงที่สอดคล้องกับ MnO_4^- ที่ความยาวคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตรจะค่อยๆลดลง และค่าการดูดกลืนแสงใหม่ที่มีความยาวคลื่นประมาณ 360 นาโนเมตรก็ปรากฏขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่า MnO_4^- ถูกรีดิวซ์เพื่อสร้างอนุภาค MnO_2 แบบคอลลอยด์โดยการฉายรังสีอัลตราโซนิกอย่างแน่นอน โดยการลด MnO_4^- เป็น MnO_2 สิ้นสุดลงที่ระยะเวลาการฉายรังสี 14 นาที

2.6.1.2 One-pot synthesis of gold nanorods via autocatalytic growth of sonochemically formed gold seeds: The effect of irradiation time on the formation of seeds and nanorods

จากงานวิจัยของ Kenji Okitsu และคณะ [52] การสังเคราะห์วันพอทสำหรับอนุภาคนาโนทองแท่งได้รับการพัฒนาโดยใช้วิธีโซโนเคมิคัลเพื่อรีดิวซ์ไอออนทองคำในสารละลายที่เป็นน้ำ โดยมีเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ซิลเวอร์ไนเตรต และกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเรามุ่งเน้นไปที่การเติบโตแบบตัวเร่งปฏิกิริยาอัตโนมัติของเมล็ดทอง (The autocatalytic growth of gold seeds formed) ที่เกิดจากการฉายรังสีอัลตราโซนิกในระยะเวลาสั้น ในการโซโนไลซิสของน้ำที่มีสารประกอบอินทรีย์จะเกิดรีดักแทนท์หลายชนิดขึ้น เนื่องจากสภาวะอุณหภูมิและความดันสูงในฟองอากาศแบบคาวิเทชัน เป็นผลให้เกิดการลดลงของ Au(I) และการก่อตัวของ Au^0 เกิดขึ้น ภายใต้ระบบการให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกในระบบบรรยากาศ Ar ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้:

$H_2O \longrightarrow {\cdot}OH + {\cdot}H$ ....(1)

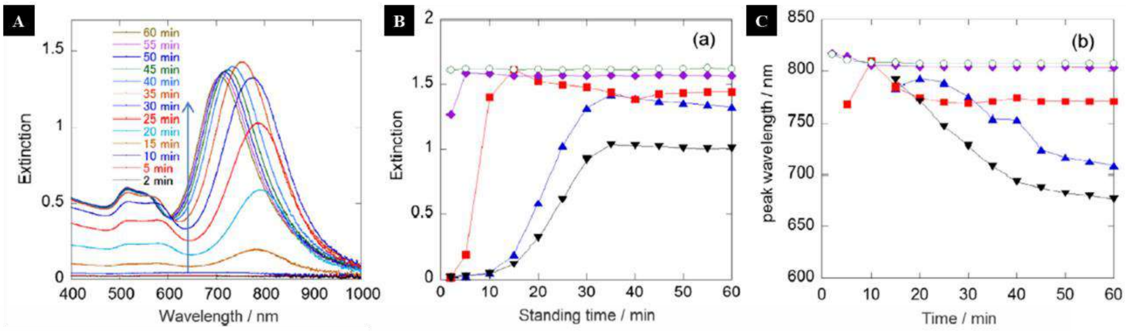
$RH + {\cdot}OH \longrightarrow$ reducing species $+ H_2O$ ....(2)

$RH + {\cdot}H \longrightarrow$ reducing species $+ H_2$ ....(3)

$RH + H_2O \longrightarrow$ pyrolysis radicals and unstable products....(4)

โดยที่ RH คือ CTAB หรือกรดแอสคอร์บิก และปฏิกิริยา (1) – (4) บ่งชี้ถึงการก่อตัวของโซโนเคมิคัลของการเกิดรีดักชัน ในปฏิกิริยาที่ (1) ·H เกิดขึ้นจากการโซโนไลซิสของน้ำ ในปฏิกิริยาที่ (2) และ (3) รีดิวซ์สปีชีส์และ H_2 เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการดึงโปรตรอนจาก CTAB หรือกรดแอสคอร์บิกด้วย ·OH หรือ ·H และในการปฏิกิริยาที่ (4) จะเกิดอนุมูลอิสระต่างๆขึ้น ซึ่งบางส่วนทำหน้าที่เป็นตัวรีดักแทนท์ โดยเกิดขึ้นผ่านไพโรไลซิสของ CTAB กรดแอสคอร์บิกและน้ำ

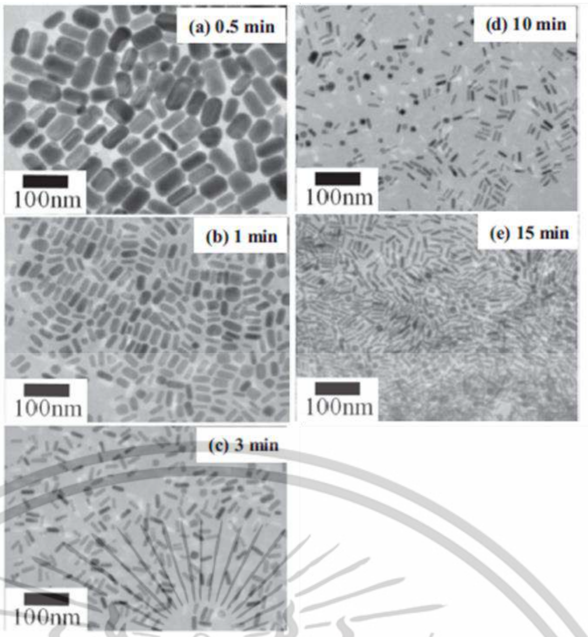
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.22 (A) การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนของสารละลาย MnO_4 ในน้ำระหว่างการฉายรังสีอัลตราโซนิกภายใต้บรรยากาศ Ar (B) ผลกระทบของเวลาการฉายรังสีและเวลาการทิ้งไว้ต่อจากนั้นต่อ Extinction และ (C) ต่อความยาวคลื่นจุดสูงสุดของการสั่นพ้องพลาสมอนตามยาวเวลาการฉายรังสี: (▼) 0.5 นาที; (▲) 1 นาที; (■) 3 นาที; (♦) 10 นาที; (○) 15 นาที [52]

รูปที่ 2.22A แสดงสเปกตรัมการเปลี่ยนแปลงของสารละลายตัวอย่างหลังจากการฉายรังสีเป็นเวลา 1 นาที และได้ตรวจวัดสเปกตรัมที่เวลา 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 นาที ผลการทดลองพบว่า เมื่อตรวจวัดทันทีหลังจากการฉายรังสี 1 นาที สารละลายจะไม่มีสี (เช่นเดียวกับสารละลายที่ไม่ได้รับการฉายรังสี) หลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 2 หรือ 5 นาที สารละลายยังคงไม่มีสีและไม่มีการดูดกลืนแสงที่ชัดเจนในช่วงความยาวคลื่น 400–1000 นาโนเมตร หลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที การดูดกลืนแสงของสารละลายเริ่มเพิ่มขึ้นจนถึงเวลาที่ทิ้งไว้ 35 นาที ซึ่งจะสังเกตเห็นแถบ SPR ของอนุภาคนาโนทองแท่งได้อย่างชัดเจนที่ 754.5 นาโนเมตร หลังจากทิ้งไว้เป็นเวลานานกว่า 35 นาที ความยาวคลื่นสูงสุดจะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงิน พฤติกรรมนี้สอดคล้องกับกระบวนการเติบโตของเมล็ดทอง (Seed-mediated growth) เป็นอนุภาคนาโนทองแท่ง รูปที่ 2.22B แสดงผลกระทบของเวลาการฉายรังสีและเวลาที่ทิ้งไว้ในเวลาต่อมาต่อความเข้มสูงสุดของค่า Extinction การเปลี่ยนแปลงในการดูดกลืนแสงสามารถตีความได้ในแง่ของการก่อตัวของเมล็ดทองและอนุภาคนาโนทองแท่ง เมื่อฉายรังสี 15 นาที การดูดกลืนแสงนั้นเกือบจะคงที่สำหรับเวลาการทิ้งไว้ 2–60 นาที ซึ่งบ่งชี้ว่าอนุภาคนาโนทองแท่งเกิดขึ้นภายในเวลาการฉายรังสี 15 นาทีและเวลาการทิ้งไว้ 2 นาที เมื่อฉายรังสี 10 นาที การดูดกลืนแสงจะถึงจุดสูงสุดหลังจากทิ้งไว้ 5 นาที ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการก่อตัวของอนุภาคนาโนทองแท่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว รูปที่ 2.22C แสดงผลกระทบของระยะเวลาการฉายรังสีและเวลาการทิ้งไว้ต่อความยาวคลื่นสูงสุดที่การสั่นพ้องพลาสมอนตามยาว (Longitudinal plasmon resonance) เมื่อฉายรังสี 10 และ 15 นาที การเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นสูงสุดที่ระยะเวลาการทิ้งไว้ 2–60 นาทีจะน้อยมาก (หรือไม่มีเลย) อย่างไรก็ตาม ในเวลาฉายรังสี 1 และ 3 นาที ความยาวคลื่นสูงสุดจะเลื่อนไป Red shift ก่อนแล้วจึงเลื่อนไปทาง Blue shift

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.23 ภาพ TEM ของอนุภาคนาโนทองแท่งที่ผลิตขึ้นจากเมล็ดทองคำซึ่งก่อตัวหลังจากการฉายรังสีอัลตราโซนิกเป็นเวลา (A) 0.5, (B) 1, (C) 3, (D) 10 และ (E) 15 นาที [52]

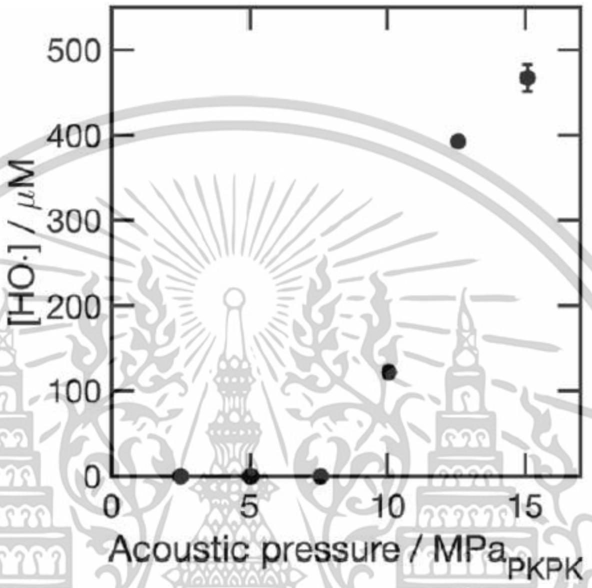
รูปที่ 2.23 แสดงภาพ TEM ของอนุภาคนาโนทองแท่งที่ก่อตัวจาก Gold seed ที่เวลาฉายรังสี 0.5, 1, 3, 10 และ 15 นาที เห็นได้ชัดว่าความยาวและความกว้างของอนุภาคนาโนทองแท่งที่ผลิตได้นั้นลดลงเมื่อระยะเวลาการฉายรังสีเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาในการฉายรังสีสั้นลง จำนวน Seed ก็จะน้อยลง ดังนั้นไอออนทองคำที่เหลือจะกระจายระหว่างจำนวน Seed ที่น้อยลง ส่งผลให้ขนาดของแต่ละ Seed เติบโตมากขึ้น นอกจากนี้ Aspect ratio ของอนุภาคจะลดลงจาก 3.6 สำหรับเวลา 10-15 นาที และลดลงจาก 3.2, 2.6 และ 2.0 สำหรับการฉายรังสี 3, 1 และ 0.5 นาที ตามลำดับ โดยอนุภาคที่มี Aspect ratio น้อยกว่า 1.5 จะถูกแยกออกจากการคำนวณนี้ (เนื่องจากไม่ถือว่าเป็นอนุภาคนาโนทองแท่ง)

2.6.1.3 Enhancement of sonochemical production of hydroxyl radicals from pulsed cylindrically converging ultrasound waves

จากงานวิจัยของ Cherie C.Y. Wong และคณะ [53] โซโนเคมิคัลคือการใช้อัลตราโซนิกเพื่อสร้างอนุมูลอิสระ (Radical) ที่ไวต่อปฏิกิริยาสูงและเป็นทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน การบำบัดน้ำเสีย และการสังเคราะห์หรือการดัดแปลงทางเคมี ในงานวิจัยนี้ ได้ออกแบบเครื่องปฏิกรณ์โซโนเคมิคัลแบบใหม่ที่สร้างคลื่นอัลตราโซนิกแบบทรงกระบอก (SonoCYL) เพื่อสร้างบริเวณที่มีความเข้มเฉพาะจุดของแอมพลิจูด และในงานวิจัยนี้ยังได้มีการศึกษาอัตรากาเกิด HO• อีกด้วย ปัจจัยที่ต้องพิจารณาในอัตราการเกิด HO• คือความถี่ที่เหมาะสมสำหรับโซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โนเคมิคัล งานวิจัยส่วนใหญ่แนะนำว่าช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับโซโนเคมิคัลคือประมาณ 300 ถึง 500 kHz อย่างไรก็ตาม SonoCYL 1 MHz มีประสิทธิภาพมากกว่าโซโนเคมิคัลแบบทั่วไป ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ถึงความสำคัญของการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์อย่างมีประสิทธิผล อย่างไรก็ตามความถี่ที่ให้และร้อยละการกระจายพลังงาน (%Amp) ที่มากขึ้นในระดับที่เหมาะสม สามารถลดเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (อัตราการผลิต HO• ที่สูงขึ้น) และผลิต HO• ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น



รูปที่ 2.24 ความเข้มข้นของ HO• ที่ความดันต่างกัน [53]

รูปที่ 2.24 แสดงความเข้มข้นของ HO• ที่ได้มาจากแอมพลิจูดความดันที่ต่างกัน ที่แอมพลิจูดความดันต่ำกว่า 7.5 MPa_{PKPK} ไม่พบ HO• ที่สังเกตได้สำหรับปฏิกิริยา ที่ 10.1 MPa_{PKPK} จะตรวจพบการก่อตัว HO• ที่ชัดเจน ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการเกิดฟองอากาศระหว่าง 7.5 MPa_{PKPK} และ 10.1 MPa_{PKPK} และสามารถยืนยันได้ว่าการเกิดฟองอากาศจากแรงเฉื่อยของคลื่นความถี่ (Acoustic inertial cavitation) เป็นแหล่งที่มาของ HO• แอมพลิจูดความดันที่สูงขึ้นอาจนำไปสู่การเกิดนิวเคลียสของฟองอากาศจำนวนมากขึ้น ซึ่งทำให้ฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้นจนถึงรัศมีสูงสุดก่อนช่วงเวลาของการแตกออก โดยทั่วไปจะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้น ทั้งจำนวนนิวเคลียสที่มากขึ้นและรัศมีฟองอากาศที่ใหญ่ขึ้นจึงมีส่วนทำให้มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 การเพิ่มประสิทธิภาพการเรืองแสงด้วยอนุภาคนาโนโลหะ

2.6.2.1 Application of Metal-Enhanced Fluorescence Technology in Evanescent Wave Fluorescent Biosensor

จากงานวิจัยของ Yu-Zheng Su และคณะ [54] อนุภาคนาโนได้นำมาใช้เพื่อเพิ่มการเรืองแสงตามหลักการ Metal-Enhanced Fluorescence (MEF) การใช้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟลูออโรฟอร์กับโลหะนั้นเรียกว่า วิศวกรรมการสลายตัวของรังสี (Radiative decay engineering) การที่มีโครงสร้างนาโนโลหะในบริเวณใกล้เคียงจะสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพช่องว่างอิสระได้ (Free space) และอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมอย่างมาก ที่น่าสังเกตคือ พื้นผิวโลหะสามารถเพิ่มหรือลดอัตราการสลายตัวของรังสีของฟลูออโรฟอร์และเพิ่มระดับการถ่ายเทพลังงานเรโซแนนซ์ได้ หลังจากการกระตุ้นฟลูออโรฟอร์ในช่องว่างอิสระ ฟลูออโรฟอร์จะสามารถปล่อยโฟตอนที่มีอัตราการลดการแผ่รังสี (Radiative deactivation rate; Γ) หรือกลับสู่สถานะพื้นด้วยอัตราการไม่แผ่รังสี (Non-radiative rate; k_{nr}) ผลผลิตควอนตัม (Q_0) และ Lifetime (τ_0) ของฟลูออโรฟอร์ในสภาวะช่องว่างอิสระนั้นกำหนดโดย:

$$Q_0 = \Gamma / (\Gamma + k_{nr}) \qquad (1)$$

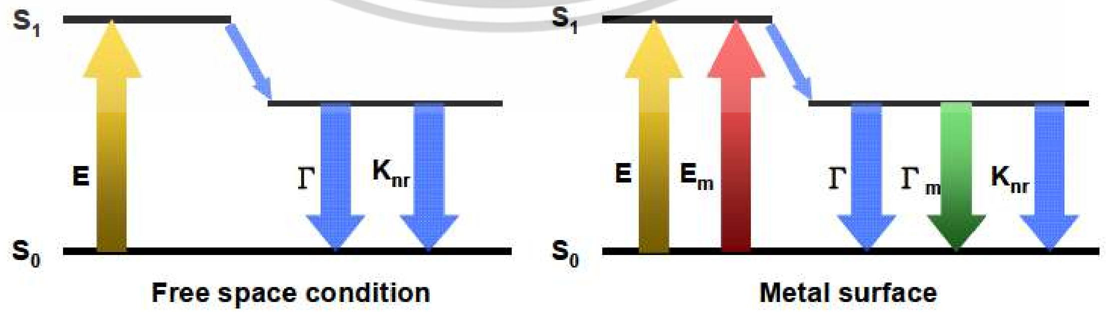
$$\tau_0 = 1 / (\Gamma + k_{nr}) \qquad (2)$$

การมีอยู่ของพื้นผิวโลหะใกล้เคียงจะเพิ่มอัตราการแผ่รังสีโดยการเพิ่มอัตราการแผ่รังสีใหม่ขึ้น (Γ_m) ในกรณีนี้ ผลผลิตควอนตัม (Q_m) และ Lifetime ของฟลูออโรฟอร์ (τ_m) ใกล้พื้นผิวโลหะนั้นจะกำหนดโดย:

$$Q_m = (\Gamma + \Gamma_m) / (\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}) \qquad (3)$$

$$\tau_m = 1 / (\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}) \qquad (4)$$

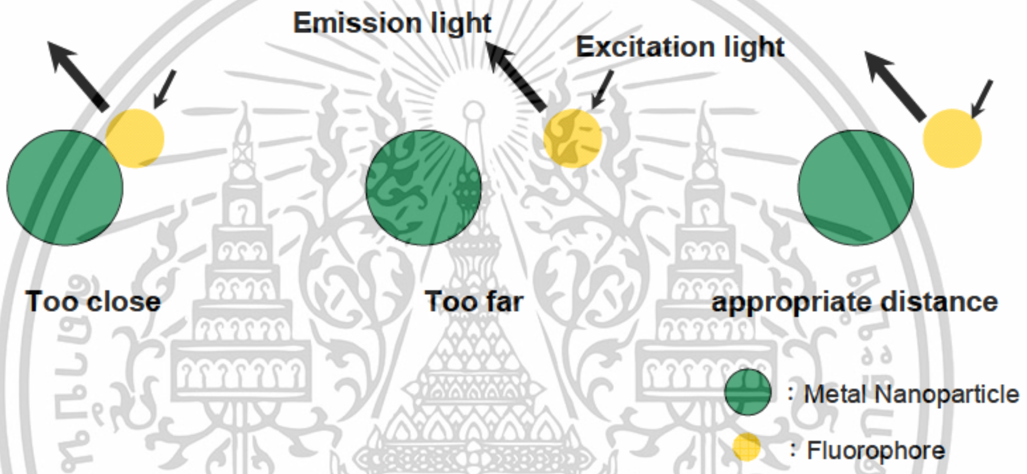
ซึ่งจากสมการ เราจะเห็นได้ว่า เมื่อค่า Γ_m เพิ่มขึ้น ผลผลิตควอนตัม Q_m จะเพิ่มขึ้นในขณะที่ Lifetime τ_m ลดลง ดังรูปที่ 2.25



รูปที่ 2.25 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคนาโนโลหะและสารเรืองแสง [54]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคนาโนโลหะ เช่น AuNPs และ AgNPs เป็นที่รู้กันว่ามีคุณสมบัติทางแสงที่สำคัญและการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเรืองแสงเมื่อใกล้กับฟลูออโรฟอร์ การเรืองแสงของฟลูออโรฟอร์อาจเพิ่มขึ้นหรือดับลงเนื่องจากมีอนุภาคนาโนโลหะอยู่ ความสามารถของการเพิ่มประสิทธิภาพหรือการดับแสงได้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนโลหะ การจัดเรียงโมเมนต์ไดโพลของฟลูออโรฟอร์ (Orientation of the fluorophore dipole moments) ระยะห่างระหว่างฟลูออโรฟอร์และอนุภาคนาโน ตัวทำละลายอินทรีย์และผลผลิตควอนตัมของฟลูออโรฟอร์ ในงานนี้ ได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระยะห่างระหว่างฟลูออโรฟอร์และอนุภาคนาโน



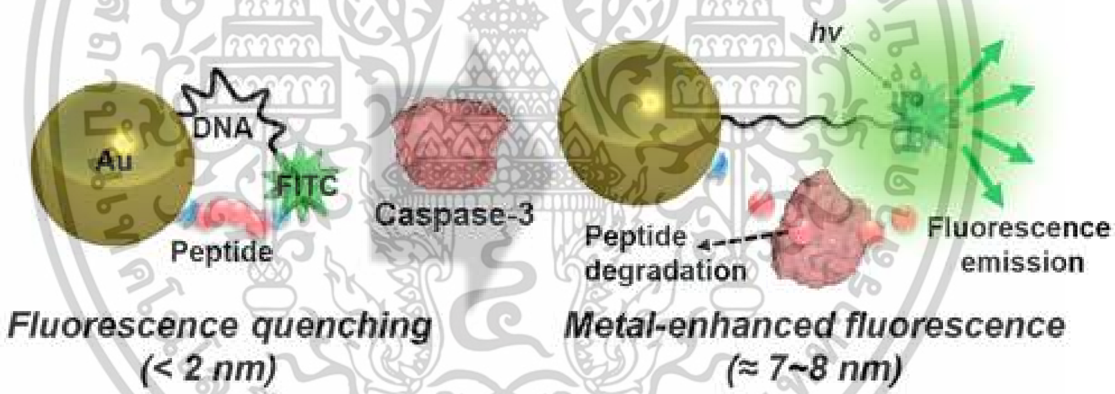
รูปที่ 2.26 ผลของระยะห่างระหว่างอนุภาคนาโนโลหะและฟลูออโรฟอร์ [54]

จากรูปที่ 2.26 บ่งชี้ว่าระยะห่างระหว่างฟลูออโรฟอร์-โลหะที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการเรืองแสง หากอนุภาคนาโนอยู่ใกล้กับฟลูออโรฟอร์มากเกินไป อนุภาคนาโนจะดึงอิเล็กตรอนทั้งหมดในสถานะกระตุ้นออกจากฟลูออโรฟอร์ หากอยู่ห่างจากฟลูออโรฟอร์มากเกินไป สนามแม่เหล็กหรือพลาสมอนที่พื้นผิวอาจไม่ไปถึงฟลูออโรฟอร์ และจะไม่ส่งผลต่อความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ เมื่ออยู่ในระยะห่างที่เหมาะสม การเรืองแสงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการถ่ายโอนอิเล็กตรอนอิสระของฟลูออโรฟอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.2 Metal-Enhanced Fluorescence by Bifunctional Au Nanoparticles for Highly Sensitive and Simple Detection of Proteolytic Enzyme

จากงานวิจัยของ Jin-Ha Choi และคณะ [55] การเรืองแสงที่เสริมด้วยโลหะ (MEF) เป็นหนึ่งในวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขยายความเข้มของการเรืองแสงเมื่อโมเลกุลของฟลูออโรฟอร์อยู่ใกล้กับโครงสร้างนาโนโลหะ Localized surface plasmon resonance (LSPR) ของโลหะสามารถขยายการดูดกลืนแสงที่ตกกระทบได้อย่างมาก พลังงานสามารถถ่ายโอนไปยังฟลูออโรฟอร์ได้หากแถบ LSPR ซ้อนทับสเปกตรัมการกระตุ้นหรือการเรืองแสงของโมเลกุลอย่างมีนัยสำคัญด้วยระยะห่างที่เหมาะสม ในทางตรงกันข้าม สนามแม่เหล็กไฟฟ้าความเข้มสูงที่เกิดจากปรากฏการณ์ LSPR สามารถดับการเรืองแสงได้เมื่อระยะห่างจากพื้นผิวโลหะมีใกล้มาก (<2 นาโนเมตร) ดังนั้นการควบคุมระยะห่างจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อใช้ประโยชน์จากการกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์ MEF ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการตรวจวิเคราะห์เอนไซม์โปรตีโอไลติก โดยระยะห่างสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเข้มข้นของเอนไซม์โปรตีโอไลติก ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อค่าการเรืองแสง



รูปที่ 2.27 ภาพจำลอง MEF-based caspase-3 ไบโอเซนเซอร์ [55]

โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์โปรตีโอไลติกมีมากมายหลายชนิด ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกแคสเปส-3 เป็นตัวแทนในกลุ่มตัวอย่าง กลไกการตรวจวัดจะเกิดภายใต้กรเปลี่ยนแปลงระห่างระหว่างฟลูออโรฟอร์และโลหะ ซึ่งความเข้มข้นของแคสเปส-3 จะมีผลกระทบต่อการเรืองแสงจากการทำลายพันธะของเปปไทด์ ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องปรับปรุงค่าการเรืองแสงให้เหมาะสมตามสัดส่วนกับความเข้มข้นของแคสเปส-3 (รูปที่ 2.27) แคสเปส-3 ส่งผลต่อระยะห่างที่เปลี่ยนแปลงไปของโลหะและฟลูออโรฟอร์ โดยจะเกิด Enzymatic cleavage reaction กับสายโซ่โปรตีน การเรืองแสงของโพรบจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแคสเปส-3 เนื่องจาก แคสเปส-3 จะทำลายสายโซ่โปรตีนให้ฟลูออ

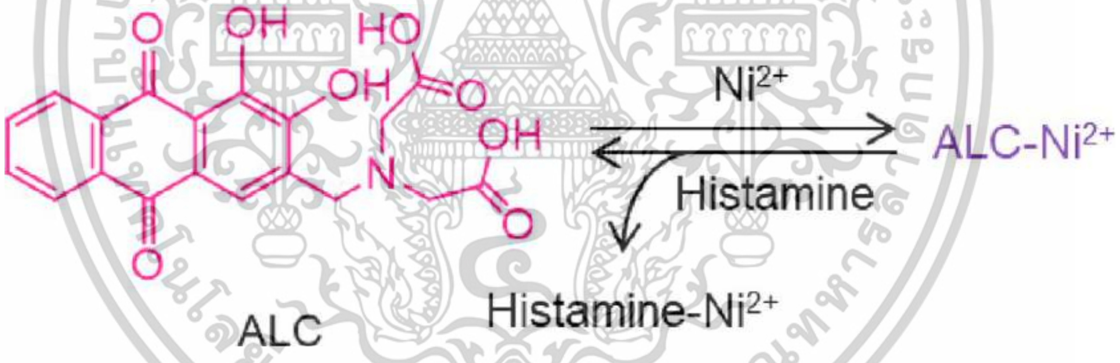
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรฟอร์จัดเรียงตัวด้วยระยะห่างที่เหมาะสมตามความยาวของสาย DNA ที่ได้ปรับปรุงไว้บนพื้นผิว โดยความเข้มของการเรืองแสงจะมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ แคสเปส-3 มากขึ้น

2.6.3 หลักการตรวจวัดฮีสทามีนด้วยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง และ การเรืองแสง

2.6.3.1 Colorimetric sensing of histamine in aqueous solution by a system composed of alizarin complexone and Ni^{2+} complex via indicator displacement approach.

จากงานวิจัยของ Yasumasa Fukushima และคณะ [15] ในงานวิจัยนี้ได้นำเสนอ Alizarin complexone (ALC หรือ ALz) ในฐานะเซนเซอร์เชิงสีสำหรับตรวจวัดฮีสทามีนผ่านกลไกการแลกเปลี่ยน Ni (II) โดย ALz สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะได้ดี เช่น Al (III), Cd (II), Cu (II) และ Ni (II) โดยเกิดผ่านพันธะโควาเลนต์กับหมู่อะมิโน คาร์บอกซิเลต คาร์บอนิล และไฮดรอกซิล ซึ่ง Ni (II) มีความเลือกจำเพาะในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับฮีสทามีนได้ดี ดังนั้น สารเชิงซ้อน ALz-Ni (II) จึงสามารถตรวจจับฮีสทามีนโดยวิธีอินดิเคเตอร์ดิสเพลสเมนต์ (IDA) (รูปที่ 2.28)

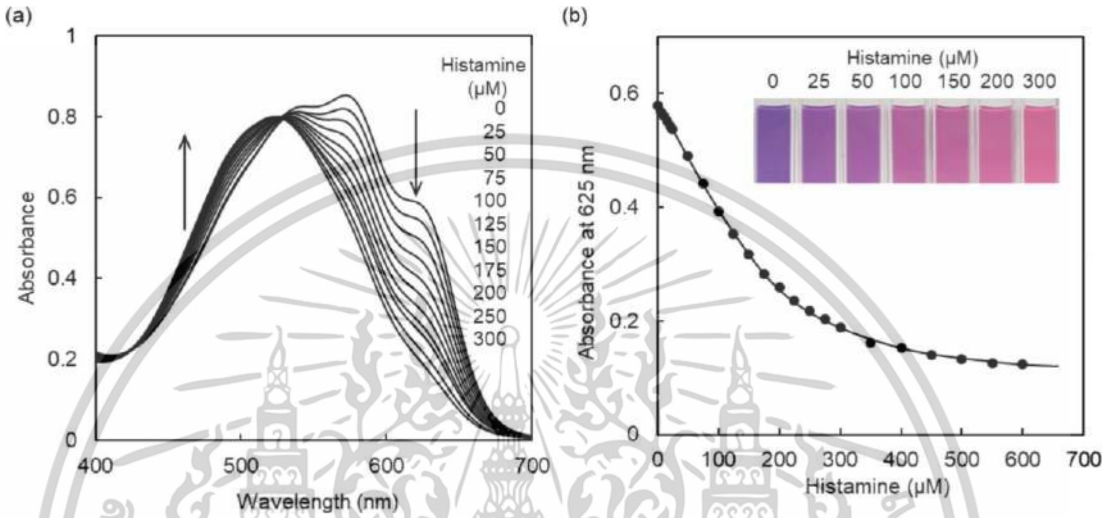


รูปที่ 2.28 กลไกการตรวจวัดฮีสทามีน [15]

ปฏิกิริยาการตรวจวัดคือผ่านปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน Ni (II) ระหว่าง ALZ และฮีสทามีน สารประกอบเชิงซ้อน ALz-Ni (II) จะแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง 625 นาโนเมตร และสังเกตเห็นสีม่วงได้ด้วยตาเปล่า ปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก Ni (II) สู่ ALz ที่ทำให้สีเปลี่ยนเกิดผ่านสภาวะการถ่ายเทประจุ (Charge transfer transitions) โดยสัดส่วนการเข้าทำปฏิกิริยา ALz : Ni (II) คือ 1 : 1 หากมีฮีสทามีนอยู่ในตัวอย่าง ฮีสทามีนสามารถดึง Ni (II) ออกจากโครงสร้าง ALz ได้ ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน Ni (II)-histamine ส่งผลให้สัญญาณการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตรลดลงตามความเข้มข้นของฮีสทามีนที่เพิ่มขึ้น และสีจะเปลี่ยนกลับมาเป็นสีแดงตามความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสารประกอบเชิงซ้อน Ni (II)-histamine ที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.29 ภายใต้การเพิ่มประสิทธิภาพเซนเซอร์การตรวจวัด ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ดีที่พีเอช 10.0 โดยช่วงการตรวจวัดความเข้มข้นของฮีสทามีนจะอยู่ในช่วง 5–150 ไมโครโมลต่อลิตร และขีดจำกัดการตรวจวัดคือ 7.68 ไมโครโมลต่อลิตร

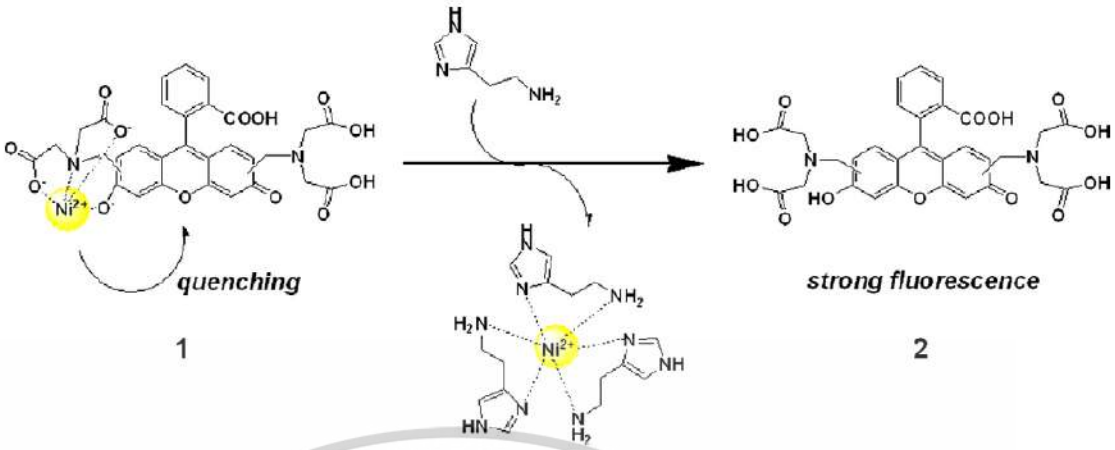


รูปที่ 2.29 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ ALz-Ni (II) ตามความเข้มข้นของฮีสทามีนตั้งแต่ 0-300 ไมโครโมลต่อลิตรใน 10 มิลลิโมลต่อลิตรของ CHES buffer ที่ pH 10.0 (B) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรของ ALz-Ni(II) ตามความเข้มข้นของฮีสทามีนที่สอดคล้องกัน [15]

2.9.3.2 Selective fluorescence detection of histamine based on ligand exchange mechanism and its application to biomonitoring.

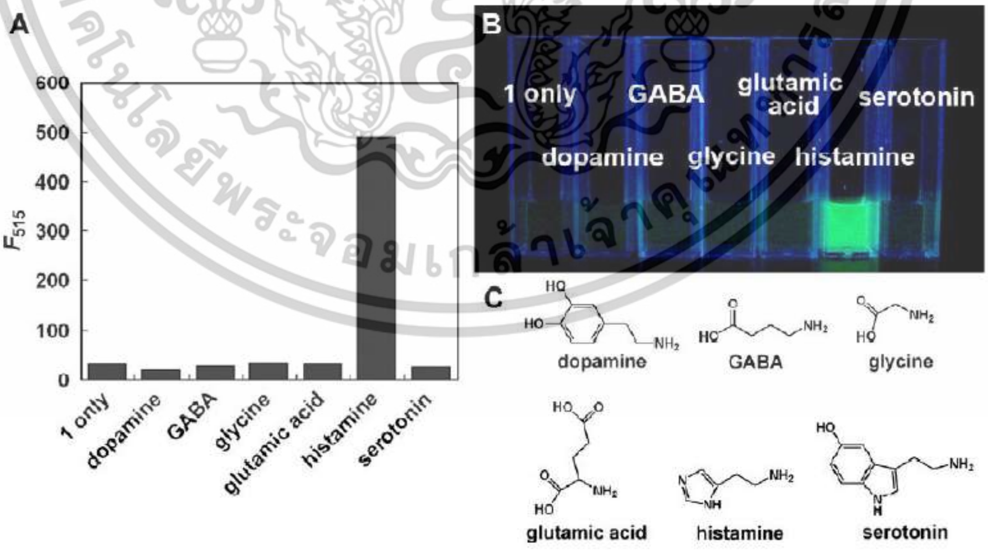
จากงานวิจัยของ Daisuke Seto และคณะ [56] ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดฮีสทามีนโดยใช้โพรบเรืองแสง ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนระหว่าง Ni (II) และแคลซีน โดยอาศัยกลไกการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ ความเข้มการเรืองแสงของโพรบจะถูกดับลงเนื่องจาก ไอออนของ Ni (II) กักกันการถ่ายโอนของอิเล็กตรอนในโมเลกุลดังรูปที่ 2.30 ในสารประกอบที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.30 กลไกการตรวจวัดฮีสทามีนโดยใช้สารประกอบ 1 [56]

การเรืองแสงของสารประกอบ 1 จากมอยอิตีแคลซีนจะดับลงอย่างมากด้วยผลกระทบของ Ni (II) ที่จับกับมอยอิตีของกรดอิมิโนไดอะซิติก เมื่อเติมฮีสทามีนลงในสารประกอบ 1 Ni (II) ในสารประกอบ 1 ฮีสทามีนจะสามารถดึง Ni (II) ให้หลุดออกจากโครงสร้างและเกิดเป็นสารประกอบสารเชิงซ้อน ฮีสทามีน–Ni (II) ดังนั้นการเรืองแสงจึงเพิ่มขึ้น จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโทรสโกปีด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) พบว่าฮีสทามีนมีความเลือกจำเพาะในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ดีกับ Ni (II) และ Ni (II) ชอบที่จะเกิดสารเชิงซ้อนฮีสทามีนมากกว่า



รูปที่ 2.31 ความเลือกจำเพาะของสารประกอบ 1 สำหรับฮีสทามีน (A) การตอบสนองของการเรืองแสงของสารประกอบ 1 ต่อสารสื่อประสาทต่างๆ (B) ภาพถ่ายของสารประกอบ 1 ที่มีและไม่มีโดปามีน GABA ไกลซีน กรดกลูตามิก ฮีสตามีน เซโรโทนิน (C) โครงสร้างทางเคมีของสารสื่อประสาท [56]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาความเลือกจำเพาะของวิธีวิเคราะห์โดยทำการเติมสารประกอบ 1 ลงในสารละลายที่มีสารสื่อประสาทต่างๆ รูปที่ 2.31A แสดงความเข้มการเรืองแสงของสารประกอบ 1 ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรหลังจากการเติมโดพามีน GABA ไกลซีน กรดกลูตามิก ฮีสทามีน และเซโรโทนิน การเรืองแสงของสารประกอบ 1 เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อมีการเติมสารสื่อประสาทในขณะที่ความเข้มของการเรืองแสงเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อมีฮีสทามีนอยู่ การเพิ่มขึ้นของความเข้มของการเรืองแสงอันเนื่องมาจากการเติมฮีสทามีนสามารถแยกแยะได้อย่างง่ายดายจากสารสื่อประสาทอื่นๆ ด้วยตาเปล่า (รูปที่ 2.31B) ซึ่งสามารถอธิบายได้จากข้อเท็จจริงที่ว่าฮีสทามีนมีทั้งกลุ่มอิมิดาโซลและกลุ่มอะมิโนที่อยู่ใกล้กัน ส่งผลให้เกิดการก่อตัวของสารเชิงซ้อน Ni (II) ที่เสถียร (รูปที่ 2.31C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้แบ่งขั้นตอนการดำเนินงานออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วย ALz (Au^0-NPs_{ALz}) โดยใช้วิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับการใช้คลื่นความถี่อัลตราโซนิก

2. ศึกษากลไกการตรวจวัดฮีสทามีนและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด โดยมีตัวแปรที่ศึกษา ดังนี้ ความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz}, ชนิดของโลหะทรานซิสชัน, ความเข้มข้นโลหะทรานซิสชัน, ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตต, ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท, ลำดับในการเติมสารละลายตรวจวัด และ เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

3. ศึกษาคุณลักษณะเด่นของวิธี เช่น ช่วงความเป็นเส้นตรง ความไวในการวิเคราะห์ ความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำ ความเลือกจำเพาะ และขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด

4. ประยุกต์ใช้ Au^0-NPs_{ALz} เป็นเซนเซอร์ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล และศึกษาความถูกต้องของวิธี โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้วิธีการทางสถิติ

3.1 เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	สูตรโมเลกุล/ชื่อย่อ	บริษัทที่ผลิต
Histamine	$C_5H_9N_3$	Sigma-Aldrich
Nickel (II) chloride	$NiCl_2$	Carlo Erba
Alizarin complexone (ALz)	$C_{19}H_{15}NO_8$	Sigma-Aldrich
Gold (III) chloride trihydrate	$H_7AuCl_4O_3$	Sigma-Aldrich
Sodium borohydride	$NaBH_4$	Sigma-Aldrich
Sodium acetate	$C_2H_3NaO_2$	Carlo Erba
Acetic acid	CH_3COOH	J.T. Baker
Sodium hydroxide	NaOH	Carlo Erba
Potassium dihydrogenphosphate	KH_2PO_4	Carlo Erba
Sodium sulfate	Na_2SO_4	Carlo Erba
Sodium chloride	NaCl	Carlo Erba

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L-Cysteine	$C_3H_7NO_2S$	Sigma-Aldrich
Dopamine hydrochloride	$C_8H_{12}ClNO_2$	Sigma-Aldrich
L-Lysine monohydrochloride	$C_6H_{14}N_2O_2$	Himedia
L-Threonine	$C_4H_9NO_3$	Himedia
Serine	$C_3H_7NO_3$	Himedia
Valine	$C_5H_{11}NO_2$	Himedia
L-Tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Himedia
Phenylalanine	$C_9H_{11}NO_2$	Himedia
L-Isoleucine	$C_6H_{13}NO_2$	Himedia
Perchloric acid	$HClO_4$	Sdfichem
Sodium bicarbonate	$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich
Dansyl chloride	$C_{12}H_{12}ClNO_2S$	Sigma-Aldrich
Acetone	CH_3COCH_3	THOMAS BAKER
Ammonium acetate	$CH_3CO_2NH_4$	Loba Chemie
Ammonium hydroxide	NH_4OH	Sigma-Aldrich
Acetonitrile	CH_3CN	Carlo Erba

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- บีกเกอร์
- หลอดหยด
- แท่งแก้วคนสาร
- กระบอกน้ำกลั่น
- เครื่องปั่นกวน
- ขวดรูปชมพู่
- จานเพาะเชื้อ
- ไมโครปิเปต
- ช้อนตักสาร
- ขวดปรับปริมาตร
- พีเอชมิเตอร์ –Toledo AG 8603 Switzerland
- น้ำปราศจากไอออน- ZENEER UP 900, Human
- UV - visible spectrophotometer - SHIMADZU UV-1900i, JAPAN
- Fluorescence Spectrofluorometer - Jasco FP-8200, USA
- ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ IRTracer–100 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- เครื่องตรวจวัดเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (Rikagu smartlab, Japan) ใช้ CuKα (**λ**= 0.15406 nm) ตรวจวัดด้วยมุม 2**θ** ระหว่าง of 5°– 80°
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน JEM–2010 model, JEOL Co., Ltd Japan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ศักย์ซีต้า (Malvern, UK)
- โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง ต่อกับระบบวัดค่าการเรืองแสง (LC-20 series, Shimadzu, Kyoto, Japan) คอลัม C18 (4.6 mm × 150 mm × 5 µm particle size, GL Sciences, Japan) ต่อเข้ากับการ์ดคอลัม LC–18 (4.0 cm × 10 mm × 5 µm particle size).

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วย ALz

3.2.1.1 ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก

การสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} ดำเนินการภายใต้การให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกร่วมกับวิธีการรีดักชันทางเคมี โดยผสมโกลด์ (III) คลอไรด์ไตรไฮเดรต 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 6.4 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ หลังจากนั้น เติม ALz 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรลงในสารละลายผสมและทำให้เข้ากันด้วยคลื่นความถี่อัลตราโซนิก 35 %Sonic amplification เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยเติม $NaBH_4$ 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกต่อเป็นเวลา 40 นาที ในตอนสุดท้าย สารละลายสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นไวน์แดงเป็นการยืนยันการเกิด Au^0-NPs_{ALz}

2. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยวิธีการรีดักชันทางเคมี

การสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} ด้วยวิธีรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียว ทำได้โดยการผสมโกลด์ (III) คลอไรด์ ไตรไฮเดรต 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 6.4 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ หลังจากนั้น เติม ALz 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรลงในสารละลายผสมและปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยเติม $NaBH_4$ 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และปั่นกวนต่อเป็นเวลา 40 นาที ในตอนสุดท้าย สารละลายสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีแดงดำและตกตะกอนในเวลาต่อมาเมื่อทิ้งไว้หากอนุภาคไม่สามารถคงตัวอยู่ได้ในสารละลาย

3.2.1.2 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาด รูปร่าง และความเสถียรภาพในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} ด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก

1. ศึกษาความเข้มข้นของ ALz ที่ใช้ในการรักษาเสถียรภาพ

ความเข้มข้นของ ALz ที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดขนาด และ ความคงตัวในสารละลาย โดยอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์จะใช้ความเข้มข้นของ ALz ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.2 ต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นต่างๆ ของ ALz ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ลำดับ	อัตราส่วนความเข้มข้น $H_7AuCl_4O_3$:$C_{19}H_{15}NO_8$: $NaBH_4$ (mM)	ปริมาตรองค์ประกอบต่างๆ (ml)			
		Gold 10 mM	ALz 10 mM	$NaBH_4$ 50 mM	H_2O
1	1 : 0.2 : 10	1	0.2	2	6.8
2	1 : 0.4 : 10	1	0.4	2	6.6
3	1 : 0.6 : 10	1	0.6	2	6.4
4	1 : 0.8 : 10	1	0.8	2	6.2
5	1 : 1.0 : 10	1	1.0	2	6.0

2. ศึกษา %Sonic amplification ที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

ดำเนินการโดยผสมโกลด์ (III) คลอไรด์ ไตรไฮเดรต 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 6.4 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ หลังจากนั้น เติม ALz 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรลงในสารละลายผสมและทำให้เข้ากันด้วยคลื่นความถี่อัลตราโซนิก 20, 25, 30, 35 และ 40 %Sonic amplification เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยเติม $NaBH_4$ 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกต่อเป็นเวลา 40 นาที

3. ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

ดำเนินการโดยผสมโกลด์ (III) คลอไรด์ ไตรไฮเดรต 10 มิลลิโมลาร์ และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 6.4 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์และทำให้เข้ากันด้วยคลื่นความถี่อัลตราโซนิก 35 %Sonic amplification หลังจากนั้น เติม ALz 10 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรลงในสารละลายผสมและให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกต่อเป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยเติม $NaBH_4$ 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรและให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกต่อเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยเปลี่ยนเวลาหลังจากเติม $NaBH_4$ โดยเวลาที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 เวลาต่างๆที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

เวลาทั้งหมด	เวลาหลังจากเติม ALz	เวลาหลังจากเติม $NaBH_4$
20 นาที	10 นาที	10 นาที
30 นาที	10 นาที	20 นาที
40 นาที	10 นาที	30 นาที
50 นาที	10 นาที	40 นาที
60 นาที	10 นาที	50 นาที
70 นาที	10 นาที	60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วย ALz

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ได้ จะทำการศึกษาคุณลักษณะต่างๆ เช่น การดูดกลืนแสง การเรืองแสง และ สัณฐานวิทยา เป็นต้น โดยใช้เครื่องมือพิสูจน์เอกลักษณ์ ดังตารางที่ 3.4 ต่อไปนี้

ตารางที่ 3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ Au^0-NPs_{ALz}

เครื่องมือ	การพิสูจน์เอกลักษณ์
UV-visible spectrophotometer	ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสง
Fluorescence spectrophotometer	ตรวจสอบค่าการเรืองแสง
Transmission Electron Microscope, TEM	ตรวจสอบรูปร่าง ขนาดของอนุภาค การกระจายตัว
Zeta Potential Analyzer	ตรวจสอบประจุบนพื้นผิว
X-ray Diffraction, XRD	ตรวจสอบผลึกของอนุภาคนาโนทอง
3D contour fluorescence spectrometer	ตรวจสอบค่าการเรืองแสงแบบ 3 มิติ
Time resolved fluorescence spectrometer	ตรวจสอบค่าการสลายตัวของสารเรืองแสง
Raman Spectrometer	ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีและปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล

3.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีนโดยใช้ Dual-signal Au^0-NPs_{ALz} sensor

3.2.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดฮีสทามีนด้วย Au^0-NPs_{ALz}

1. การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของ Au^0-NPs_{ALz}

ปิเปตสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} 4.7 นาโนโมลต่อลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ตามด้วย นิกเกิล (II) คลอไรด์ 600 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายฮีสทามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ (100, 500, 1000, 2000, 3000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยเติม บัฟเฟอร์ Acetate/Acetic ที่ pH 4.0 10 มิลลิโมลต่อลิตร จนครบปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยเปลี่ยนปริมาตรของ Au^0-NPs_{ALz} เป็น 500, 750, 1000 และ 1500 ไมโครลิตร

2. การศึกษาประเภทไอออนของโลหะทรานซิชัน

ปิเปตสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} 4.7 นาโนโมลต่อลิตร ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตามด้วย นิกเกิล (II) คลอไรด์ 600 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายฮิสทาความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ (100, 500, 1000, 2000, 3000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยเติม บัฟเฟอร์ Acetate/Acetic ที่ pH 4.0 10 มิลลิโมลต่อลิตร จนครบปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยเปลี่ยนโลหะเป็น Ag (I), Ca (II), Cd (II), Mg (II) และ Zn (II)

3. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ นิกเกิล (II) คลอไรด์

ปิเปตสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} 4.7 นาโนโมลต่อปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตามด้วย นิกเกิล (II) คลอไรด์ 200 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายฮีสทามีนความเข้มข้นต่างๆ (100, 500, 1000, 2000, 3000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยเติม บัฟเฟอร์ Acetate/Acetic ที่ pH 4.0 10 มิลลิโมลต่อลิตร จนครบปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของนิกเกิล (II) คลอไรด์ 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครโมลต่อลิตร

4. การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด

ปิเปตสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} 4.7 นาโนโมลต่อลิตร ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตามด้วย นิกเกิล (II) คลอไรด์ 600 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายฮีสทามีนความเข้มข้นต่างๆ (100, 500, 1000, 2000, 3000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยเติม บัฟเฟอร์ Acetate/Acetic ที่ pH 4.0 10 มิลลิโมลต่อลิตร จนครบปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยเปลี่ยน pH เป็น 5.0, 6.0, และ 7.0

5. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์

ปิเปตสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} 4.7 นาโนโมลต่อลิตร ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตามด้วย นิกเกิล (II) คลอไรด์ 600 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายฮิสทาความเข้มข้นต่างๆ (100, 500, 1000, 2000, 3000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยเติม บัฟเฟอร์ Acetate/Acetic ที่ pH 4.0 10 มิลลิโมลต่อลิตร จนครบปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 10 และ 15 มิลลิโมลต่อลิตร

6. การศึกษาลำดับในการตรวจวัดฮีสทามีน

ปิเปตสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} 4.7 นาโนโมลต่อลิตร ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตามด้วย นิกเกิล (II) คลอไรด์ 600 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายฮิสทาความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ (100, 500, 1000, 2000, 3000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยเติม บัฟเฟอร์ Acetate/Acetic ที่ pH 4.0 10 มิลลิโมลต่อลิตร จนครบปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที และศึกษาลำดับการตรวจวัดเพิ่มเติมโดยเรียงลำดับการเติมคือ i) Au^0-NPs_{ALz} ii) นิกเกิล (II) คลอไรด์ iii) ฮีสทามีน iv) บัฟเฟอร์

7. การศึกษาเวลาในการตรวจวัดฮีสทามีน

ปิเปตสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} 4.7 นาโนโมลต่อลิตร ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตามด้วย นิกเกิล (II) คลอไรด์ 600 ไมโครโมลต่อลิตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายฮีสทามีนความเข้มข้นต่างๆ (100, 500, 1000, 2000, 3000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยเติม บัฟเฟอร์ Acetate/Acetic ที่ pH 4.0 10 มิลลิโมลต่อลิตร จนครบปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer ตามลำดับ ที่เวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยเปลี่ยนเวลาที่ตรวจวัดเป็น 3, 5, 7, 10, 15 และ 20 นาที

3.2.2.2 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์

ปิเปตสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} 4.7 นาโนโมลต่อลิตร ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และสารละลายนิกเกิล (II) คลอไรด์ 600 ไมโครโมลต่อลิตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร และทำการเขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมฮีสทามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามด้วยเติม บัฟเฟอร์ Acetate/Acetic ที่ pH 4.0 จนครบปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ทำการ Vortex สารละลายผสมเป็นเวลา 5 นาทีและตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer ตามลำดับ คุณลักษณะของวิธีที่ศึกษาแสดงดังตารางที่ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.5 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์

คุณลักษณะ	สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์	รายละเอียดที่ใช้ในการประเมิน
1.ศึกษาความเป็นเส้นตรงของการตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีน (Linearlity)	ฮีสทามีนที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000 และ 9000 ไมโครโมลต่อลิตร	ทดสอบที่ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ สร้างสมการเส้นตรงจาก Y = mx + c เพื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)
2.ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Relative Standard Deviation; %RSD)	ฮีสทามีนที่ความเข้มข้น 500, 2000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร	$\mathrm{RSD}\ (\%) = \frac{\mathrm{SD}}{\overline{\mathrm{X}}} \times 100$ เมื่อ RSD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ $\overline{\mathrm{X}}$ = ค่าเฉลี่ยของชุดข้อมูล SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำ 10 ซ้ำ
3.ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)	น้ำปราศจากไอออน	$\mathrm{LOD} = \frac{3\ (\mathrm{SD\ of\ Au^0\text{-}NPsAL_z\text{-}Ni\ (II)\ complexes})}{\mathrm{Slope}}$ เมื่อ SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำ 10 ซ้ำ โดยที่สัมประสิทธิ์ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ LOQ = 10
4.ศึกษาการเลือกจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Selectivity study)	กรดอะมิโน (Acetaldehyde, Cysteine, Leucine, Lysine, Phenylalanine, Serine, Threonine, Valine, Aminobutyric acid) และโลหะไอออน (Mg (II), Zn (II), Ca (II), K (I), และ Na (I)) ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลต่อลิตร	ทดสอบที่ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

3.2.3 ศึกษาร้อยละการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (%Recovery) ในตัวอย่างอาหารทะเล โดยใช้ Au^0-NPs_{ALz}

การวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล 4 ชนิด ได้แก่ กุ้งขาว กุ้งลายเสือ ปลาหมึกกระดอง และปลาหมึกยักษ์ ที่ได้จากซูเปอร์มาร์เก็ต โดยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์เป็นดังนี้ ขั้นแรก บดตัวอย่างด้วยเครื่องปั่น และผสมตัวอย่างที่ผ่านการบดแล้ว 5.0 กรัมกับน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นกวนเป็นเวลา 10 นาทีในอ่างน้ำแข็ง ตามด้วยเติมฮีสทามีนมาตรฐาน (Spiked standard histamine) ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 100, 400 และ 1,000 ไมโครโมลต่อลิตร ในสารละลายตัวอย่าง ปั่นกวนต่อเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงสารละลายผสมที่ 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองสารละลายส่วนที่เป็นของเหลวใสผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 42 และไส้กรองเมมเบรนไนลอนขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน จากนั้นนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลทั้ง 4 ชนิดวิเคราะห์โดยใช้ Au^0-NPs_{ALz} ผลลัพธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ถูกนำมาคำนวณร้อยละการคืนกลับด้วยสมการ

$$\%\text{Recoveries} = \frac{\text{Spiked sample - Sample}}{\text{Standard}} \times 100$$

เมื่อ Spiked sample คือ ความเข้มข้นของฮีสทามีนในตัวอย่างที่เติมสารฮีสทามีนมาตรฐาน

Sample คือ ความเข้มข้นของฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล

Standard คือ ความเข้มข้นของสารฮีสทามีนมาตรฐาน

3.2.4 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณฮีสทามีนด้วยเทคนิค HPLC

เปรียบเทียบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเลกับวิธีมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ตัวอย่างจะต้องทำให้เกิดอนุพันธ์ก่อน (Derivertization) โดยใช้วิธีของ I. Altieri และคณะ [57] และมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังนี้ ขั้นแรก ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหารทะเลที่ผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันประมาณ 5.0 กรัม ผสมกับกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) 0.4 โมลต่อลิตรปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยปั่นกวนอย่างต่อเนื่องในอ่างน้ำแข็ง หลังจากนั้น 10 นาที สารละลายผสมจะถูกปั่นที่เหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 °C จากนั้นเก็บส่วนที่เป็นของเหลวใสออก และสกัดตะกอนอีกครั้งด้วยกรดเปอร์คลอริก 0.4 โมลต่อลิตร 10 มิลลิลิตร ปั่นกวนในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำส่วนที่เป็นของเหลวใสส่วนบนกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 42 สารอนุพันธ์ถูกเติมด้วยสารฮีสทามีนมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ คือ 100, 400 และ 4,000 ไมโครโมลต่อลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างผสม 1.0 มิลลิลิตร เติมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0 โมลต่อลิตรปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 20 โมลต่อลิตรปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายแดนซิลคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรลงในสารละลายผสม แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา แดนซิลคลอไรด์ส่วนเกินจะถูกกำจัดออกด้วยสารละลาย NH_4OH 25% v/v ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยเขย่าต่อเนื่องในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยอะซีโตไนไตรล์ จนครบ 10.00 มิลลิลิตร กรองสารละลายอนุพันธ์ด้วยตัวกรองเมมเบรนไนลอนขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน ก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยมีสภาวะต่างๆ ของเครื่องดังในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 สภาวะของ High-Performance Liquid Chromatography, HPLC

พารามิเตอร์	รายละเอียด		
Column	C 18 – Reversed-phase 4.6 mm × 150 mm × 5 µm particle size		
Column temperature	25 ℃		
Detector	Diode array (UV) detector (254 นาโนเมตร)		
Mobile phase	0.1 โมลต่อลิตร แอมโมเนียมอะซีเตต/อะซีโตไนไตรล์		
Stationary phase	C 18 – Reversed-phase		
Flow rate	1 มิลลิลิตรต่อนาที		
Separation time	0-6 นาที		
Injection volume	10 ไมโครลิตร		
Gradient conditions	เวลา (นาที)	สัดส่วนโดยปริมาตรของแอมโมเนียมอะซีเตต	สัดส่วนโดยปริมาตรของอะซีโตไนไตรล์
	0.0	50	50
	19.0	10	90
	20.0	50	50
	29.0	50	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

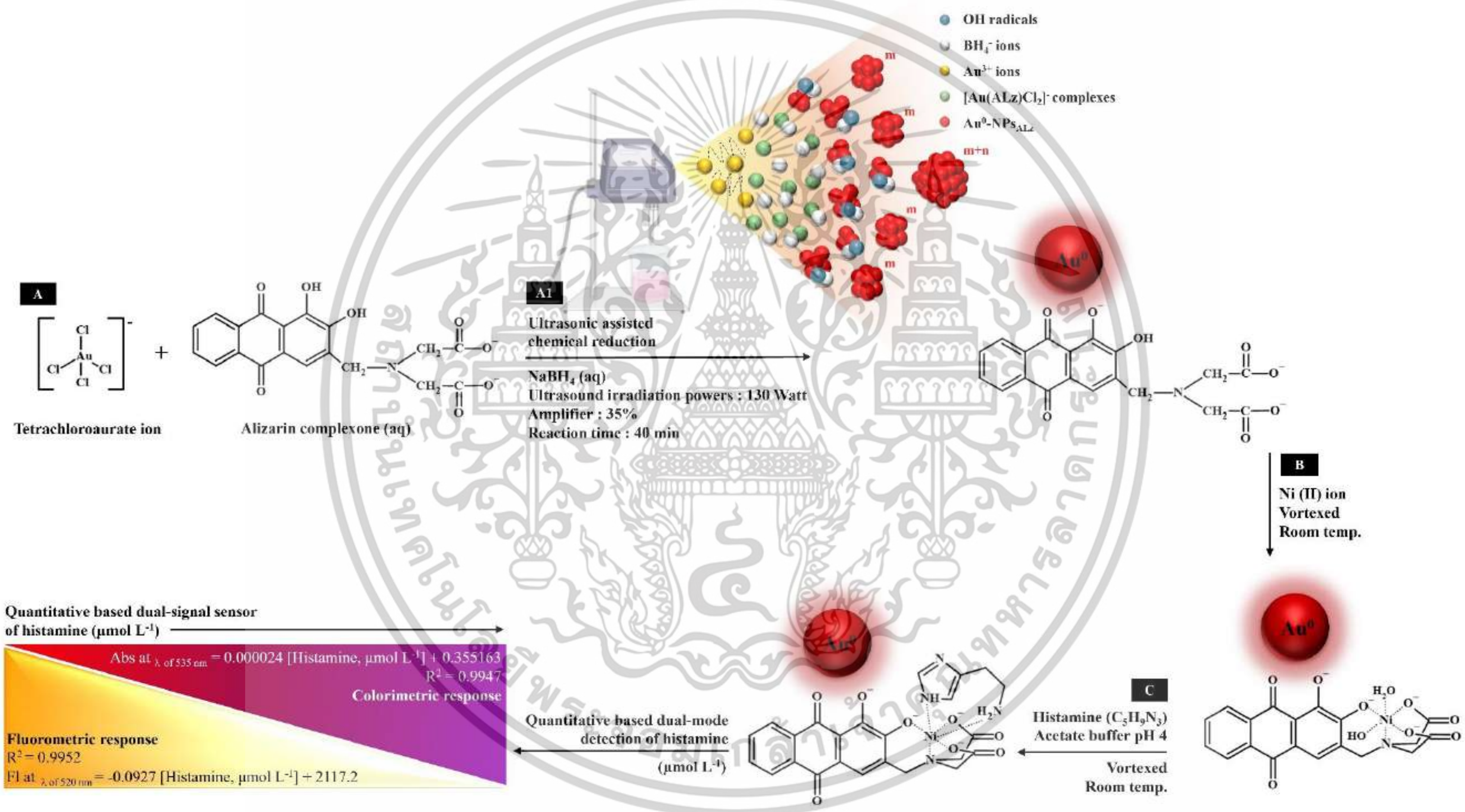
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเซนเซอร์แบบ Dual-signal sensor โดยทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่ดัดแปลงด้วย Alizarin complexone (Au^0-NPs_{ALz}) ภายใต้วิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก โดยใช้ ALz และ $NaBH_4$ เป็นสารรักษาเสถียรภาพและสารทำปฏิกิริยารีดักชัน ตามลำดับ หลังจากสังเคราะห์เซนเซอร์ได้แล้วจะทำการศึกษาเอกลักษณ์ต่างๆ ของเซนเซอร์และประยุกต์ใช้เซนเซอร์ Au^0-NPs_{ALz} สำหรับตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีนในอาหารทะเลด้วยเทคนิคเชิงสีและการวัดการเรืองแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.1

รูปแบบการพัฒนาเซนเซอร์

1. สังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} โดยวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก (รูปที่ 4.1 A) ภายใต้การเกิดอันตรกิริยาโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ของสารประกอบเชิงซ้อน $[Au(ALz)Cl_2]^-$ และเกิดการรีดักชันด้วย BH_4^-, $H^•$, H_2, $HO^•$, H_3O^+, และ H_2O_2 (รูปที่ 4.1A1)
2. พัฒนาการเลือกจำเพาะของเซนเซอร์ด้วยโลหะตัวกลางนิกเกิล (II) ภายใต้การเกิดอันตรกิริยาโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ของสารประกอบ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes (รูปที่ 4.1 B)
3. พัฒนาเซนเซอร์การตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีน ภายใต้การเกิดอันตรกิริยา Ligand complexation (Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine) (รูปที่ 4.1 C)
4. การแสดงผลการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในรูปแบบโหมดคู่ (Colorimetric response และ Fluorometric response)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

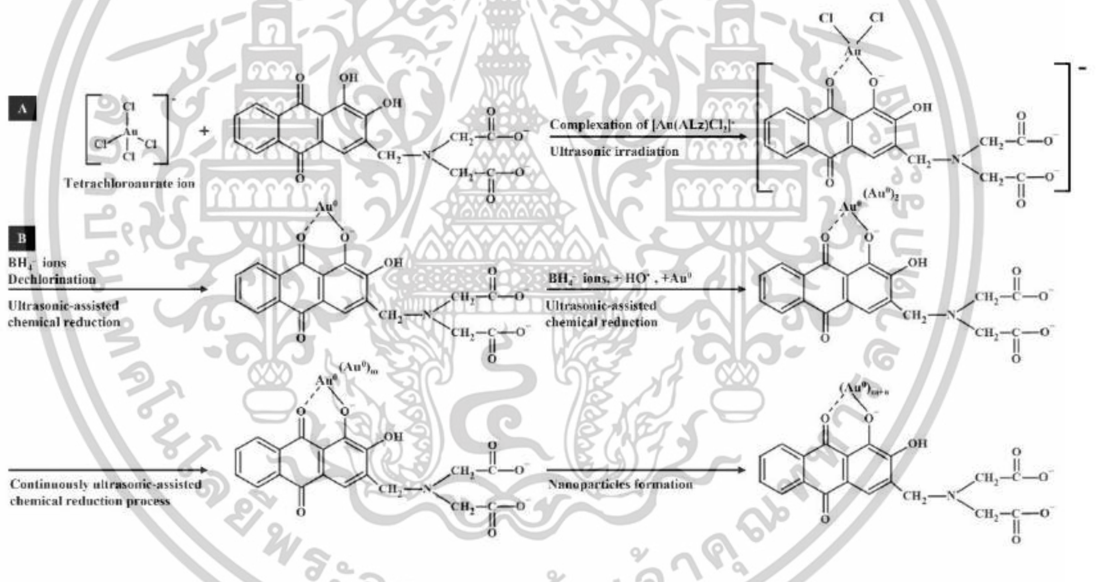


รูปที่ 4.1 (A) ภาพประกอบแผนผังของการสังเคราะห์ Au^0-NPs$_{ALz}$, (B)-(C) กลไกการตรวจวัดฮีสทามีน

4.1 การสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

4.1.1 กลไกการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

การสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} เกิดภายใต้การรีดักชันทางเคมี โดยใช้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกในการเร่งปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างไอออนเตตระคลอโรออเรต $[AuCl_4]^-$ และ ALz โดยคลื่นอัลตราโซนิกจะก่อให้เกิด Acoustic cavitation ภายในสารละลาย ซึ่งส่งผลให้เกิดการแตกพันธะของโมเลกุลน้ำเกิดเป็นอนุมูลไฮโดรเจน ($H^{\bullet}$) และอนุมูลไฮดรอกซิล ($HO^{\bullet}$) จึงสามารถเร่งปฏิกิริยาให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ $[Au(ALz)Cl_2]^-$ ได้ดังปฏิกิริยาในรูปที่ 4.2A โดยสารประกอบ ALz เป็นสารประกอบไดไฮดรอกซีแอนทราควิโนน ประกอบด้วยด้วยไนโตรเจนและออกซิเจนที่เป็นตำแหน่งในการสร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ที่ดี การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Au(ALz)Cl_2]^-$ จะเกิดผ่านอะตอมออกซิเจน 2 อะตอมในกลุ่มคาร์บอนิล (–C=O) และหมู่ไฮดรอกซิล (–OH) ของ ALz ผ่านพันธะโคออร์ดิเนชันในรูปแบบ Bidentate-bridging

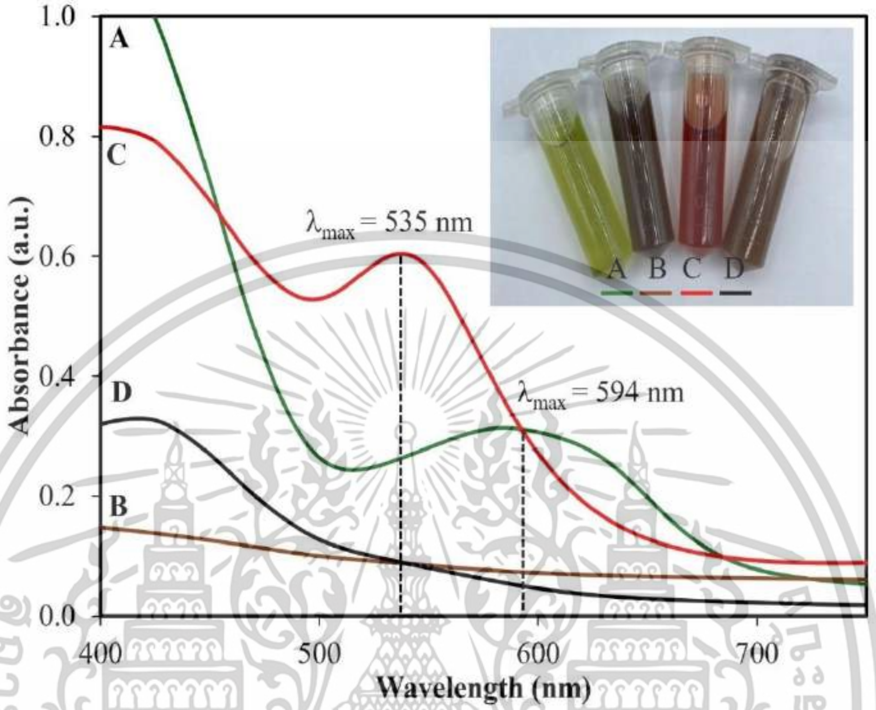


รูปที่ 4.2 (A) กลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง ไอออนเตตระคลอโรออเรต $[AuCl_4]^-$ กับสารประกอบ ALz (B) กลไกการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} โดยวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก

สารประกอบเชิงซ้อน $[Au(ALz)Cl_2]^-$ ที่เกิดขึ้น แสดงคุณลักษณะการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ตำแหน่ง 594 นาโนเมตร ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้นั้นมีสีเขียว (รูปที่ 4.3A) และเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการให้คลื่นอัลตราโซนิก พบว่าได้สารละลายที่มีสีน้ำตาลดำ (รูปที่ 4.3B) ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดสารเชิงซ้อนที่ไม่สมบูรณ์ โดยที่สารประกอบเชิงซ้อน $[Au(ALz)Cl_2]^-$ อาจเกิดขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยมากหรือไม่เกิดขึ้นเลย ดังนั้น คลื่นอัลตราโซนิกมีส่วนช่วยในการเร่งปฏิกิริยาในการสร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ของ $[Au(ALz)Cl_2]^-$ ได้ดี



รูปที่ 4.3 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ (A) $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes ภายใต้การให้คลื่นอัลตราโซนิก, (B) $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes ภายใต้สภาวะที่ไม่มีคลื่นอัลตราโซนิก, (C) Au^0-NPs_{ALz} ที่ได้จากวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก และ (D) Au^0-NPs_{ALz} ที่ได้จากวิธีการรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียว

ภายใต้วิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับการให้คลื่นอัลตราโซนิกซึ่งส่งผลให้อุณหภูมิและความดันภายในสารละลายสูงขึ้นมาก หลังจากเกิดสารเชิงซ้อน $[Au(ALz)Cl_2]^-$ แล้ว ไอออนของทอง (III) ภายในโมเลกุลของ $[Au(ALz)Cl_2]^-$ จะถูกรีดิวซ์ด้วย $NaBH_4$ อย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันสูงนี้ ส่งผลให้สารเชิงซ้อน $[Au(ALz)Cl_2]^-$ ลดลง และเกิดการก่อตัวของอนุภาคนาโนทองที่มี Alz เป็นสารรักษาเสถียรภาพ (Au^0-NPs_{ALz}) หลังจากการก่อตัวของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สภาวะอุณหภูมิและความดันสูง [58] คลื่นความถี่อัลตราโซนิกจะทำลายพันธะของโมเลกุลน้ำบางส่วนออกเป็นทั้งอนุมูลไฮโดรเจน ($H^\bullet$) และอนุมูลไฮดรอกซิล ($HO^\bullet$) ซึ่งสามารถแพร่กระจายไปสู่เฟสของสารละลาย BH_4^- ส่งผลให้เกิดเร่งปฏิกิริยารีดักชั่น และริเริ่มการก่อตัวให้ใหญ่ขึ้นของอนุภาค ซึ่งสามารถก่อตัวด้วยการดูดซับ (Adsorbed) $(Au^0)_n$-NPs_{ALz} บนพื้นผิวของ $(Au^0)_m$-NPs_{ALz} ก่อให้เกิด $(Au^0)_{m+1}NPs_{ALz}$ หรือ $(Au^0)_{m+n}$-NPs_{ALz}; โดยที่ m คือนิวเคลียสของอนุภาคนาโน และ m+n คือการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติบโตของคลัสเตอร์ (รูปที่ 4.2B) การเติบโตของอนุภาคเกิดจากการรวมตัวกันได้เอง (Spontaneously assemble) ดังนั้น ขนาดของ $(Au^0)_{m+1}NPs_{ALz}$ หรือ $(Au^0)_{m+n}$-NPs_{ALz} โดยทั่วไปจะเพิ่มขึ้นโดยผ่านการรีดักชันทางเคมีของ $NaBH_4$ ร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก แถบพลาสมอนของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ได้พบว่ามีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร และปรากฏสีของสารละลายเป็นสีแดงเข้ม (รูปที่ 4.3C) ในทางตรงกันข้าม Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียวพบว่าสารละลายที่ได้มีสีน้ำตาล และสเปกตรัม SPR ของอนุภาคนาโนทองที่ตำแหน่ง 535 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำมาก (รูปที่ 4.3D) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีอนุภาคนาโนทองเกิดขึ้นน้อยมาก และความเสถียรต่ำ จึงสรุปได้ว่าการใช้วิธีรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิกสามารถสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้วิธีรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียว

4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

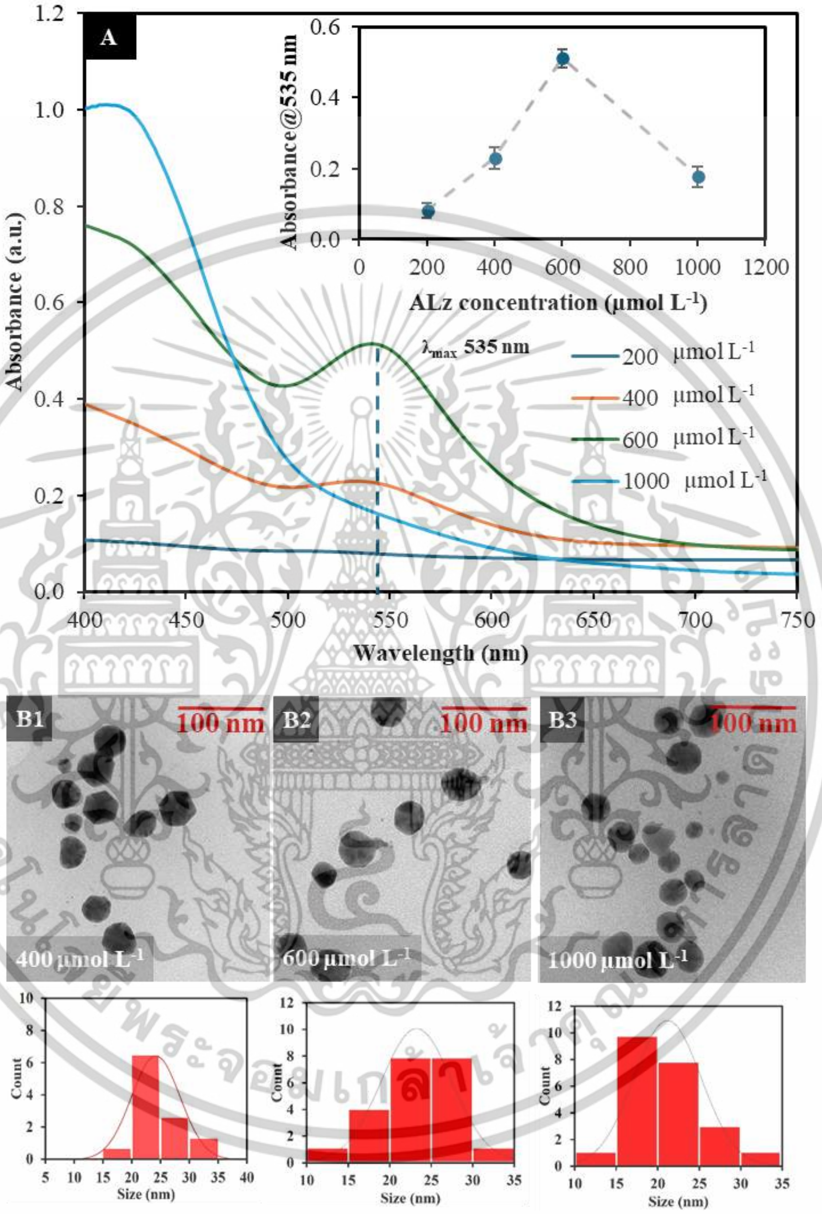
สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} ได้ทำการศึกษา 3 ตัวแปร ดังนี้ 1) ความเข้มข้นของ ALz โดยศึกษาตั้งแต่ 200 ถึง 1000 ไมโครโมลต่อลิตร, 2) Sonic amplification โดยศึกษาตั้งแต่ 20-40% และ 3) ระยะเวลาการให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิก โดยศึกษาตั้งแต่ 10-60 นาที โดยศึกษาจากความเข้มข้นเริ่มต้นของ $[AuCl_4]^-$ ที่ 1000 ไมโครโมลต่อลิตร และ $NaBH_4$ ที่ 10 มิลลิโมลต่อลิตร

4.1.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของ ALz

รูปที่ 4.4A แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก โดยศึกษาความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ ALz (200 - 1000 ไมโครโมลต่อลิตร) จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ ALz เข้มข้น 600 ไมโครโมลต่อลิตร จะปรากฏแถบ SPR ที่ชัดเจนที่สุด โดยพบที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ซึ่งเป็นเป็นเอกลกษณ์ของ Au^0-NPs_{ALz} ในขณะที่ ALz ที่ความเข้มข้น 400 และ 1,000 ไมโครโมลต่อลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า และที่ 200 ไมโครโมลต่อลิตร ไม่ปรากฏแถบเอกลักษณ์นี้ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีอนุภาคนาโนทองเกิดขึ้น เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำ ALz ไม่สามารถรักษาการคงตัวของอนุภาคได้อย่างเพียงพอ และเมื่อพิจารณาภาพ TEM และฮิสโทแกรมการกระจายตัวของขนาดอนุภาคของ Au^0-NPs_{ALz} ที่รักษาเสถียรภาพด้วย ALz ความเข้มข้น 400, 600 และ 1000 ไมโครโมลต่อลิตร (รูปที่ 4.4B) พบว่า Au_0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะทรงกลม มีขนาดอนุภาค 23.23 ± 4.26, 20.02±4.36 และ 17.63±4.07 นาโนเมตร ตามลำดับ จากขนาดที่เล็กลงนี้เป็นผลมาจากความเข้มข้น ALz ที่มากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารรักษาเสถียรภาพสูงขึ้น แรงผลัก (Repulsive force) ระหว่างอนุภาคจึงสูงขึ้น ส่งผลให้ขนาดของอนุภาคเล็กลง อย่างไรก็ตามการใช้ ALz ที่ความเข้มข้นสูงเกินไปอาจบดบังพีคเอกลักษณ์ของ Au^0-NPs_{ALz} ได้ รวมถึงความเกะกะของโครงสร้าง ALz ที่อาจขัดขวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การก่อตัวของ $(Au^0)_n$-NPs_{ALz} บน $(Au^0)_m$-NPs_{ALz} ได้ จึงทำให้ความเข้มข้นของอนุภาคต่ำและไม่สามารถสังเกตเห็นเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ ALz ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครโมลต่อลิตร ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}



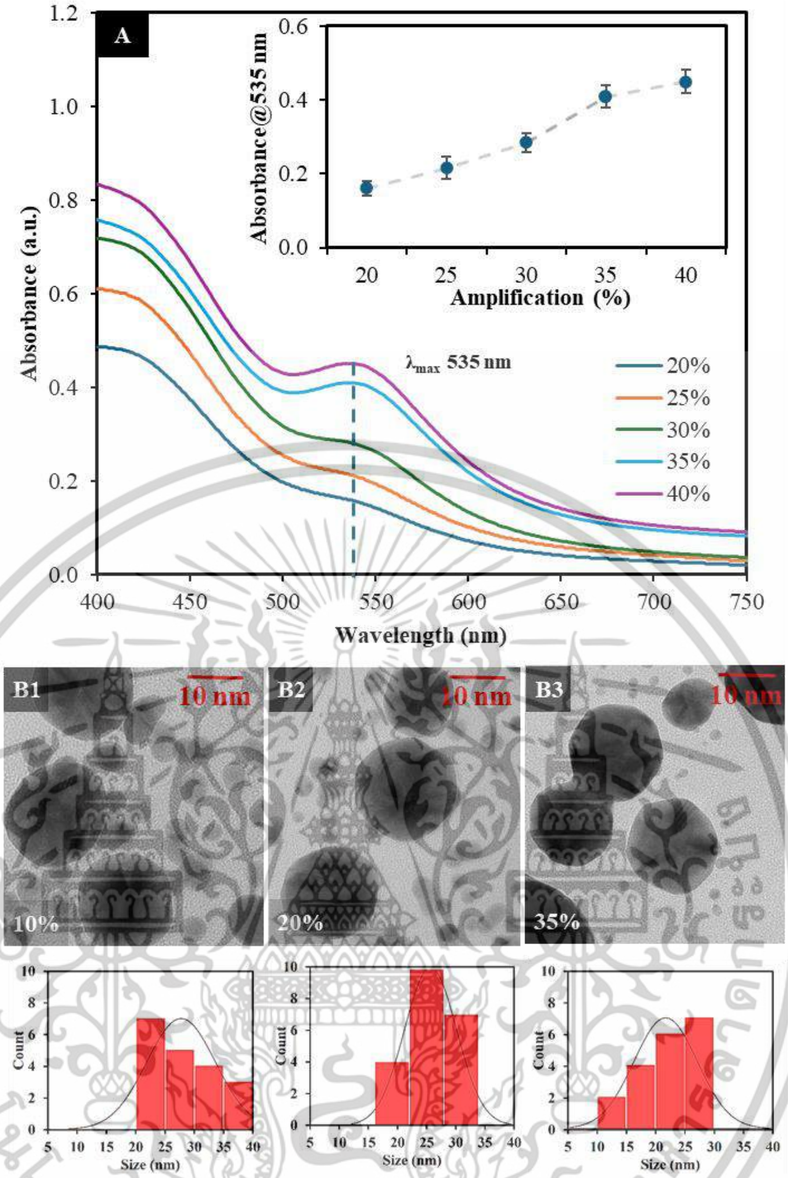
รูปที่ 4.4 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย Au^0-NPs_{ALz} ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารรักษาเสถียรภาพ (B) ภาพ TEM ของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ด้วย ALz ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และ ฮิสโทแกรมการกระจายตัวของขนาดอนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.2 ศึกษา %Sonic amplification ที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

ในการศึกษาอิทธิพลของความแรงของคลื่นอัลตราโซนิกต่อขนาดและสัณฐานวิทยาของ Au^0-NPs_{ALz} ได้ทำการศึกษา Sonic amplification ที่ 20 - 40% จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มกำลังของคลื่นความถี่อัลตราโซนิก ค่า λ_{max} เกิดการเลื่อนไปทางความยาวคลื่นสั้นลง (Blue shift) และมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงขึ้น (รูปที่ 4.5A) แต่เมื่อเพิ่ม Sonic amplification ตั้งแต่ 35% ขึ้นไปพบว่าแถบ SPR ไม่เกิดการ shift ใดๆ ซึ่งสัมพันธ์กับการก่อตัวของคอลลอยด์ Au^0-NPs_{ALz} จากภาพ TEM และฮิสโทแกรมในรูปที่ 4.5B ชี้ให้เห็นว่า Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์โดยการใช้กำลังของความถี่ที่ 10, 20 และ 35% มีขนาดอนุภาค 26.96±6.11, 25.69±4.50 และ 23.15±3.56 นาโนเมตร ซึ่งลดลงตามลำดับ นอกจากนี้การสังเคราะห์ที่กำลัง 10% พบว่าความเร็วในการก่อตัวนิวเคลียสของ Au^0-NPs_{ALz} จะเกิดขึ้นช้า ซึ่งส่งผลต่อการก่อตัวของอนุภาค ทำให้การมีการกระจายขนาดอนุภาคของ Au^0-NPs_{ALz} กว้าง (19.66 นาโนเมตร – 38.18 นาโนเมตร) สามารถสังเกตได้จากภาพ TEM ที่พบคลัสเตอร์การก่อตัวที่ไม่สมบูรณ์ด้วยเช่นเดียวกัน แต่เมื่อใช้การสังเคราะห์ที่กำลัง 35% อัตราการรีดักชันจะถูกเร่งเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การกระจายขนาดอนุภาคของ Au^0-NPs_{ALz} แคบลงที่ 18.54 นาโนเมตรถึง 28.41 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ 35% Sonic amplification ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

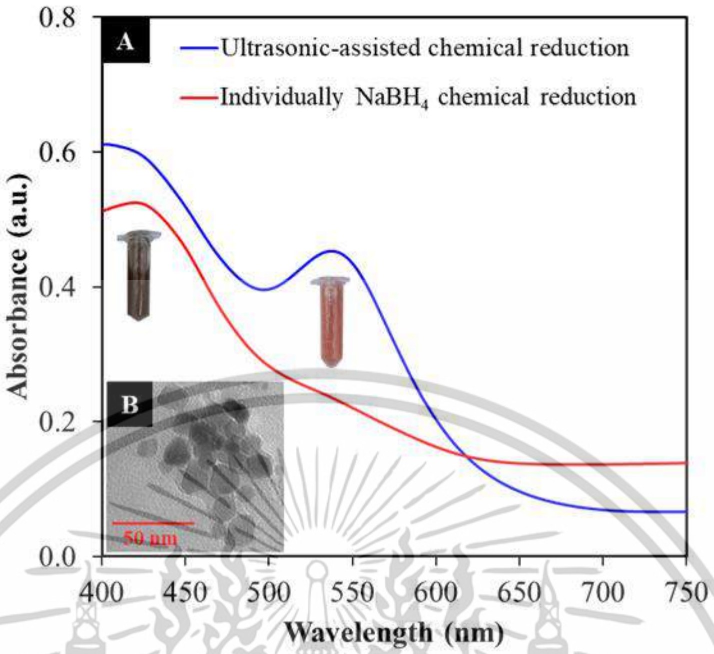
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย Au^0-NPs_{ALZ} ที่ %Sonic amplification ต่างในการสังเคราะห์ (B) ภาพ TEM ของ Au^0-NPs_{ALZ} ที่สังเคราะห์ %Sonic amplification ที่แตกต่างกันในการสังเคราะห์ และฮิสโทแกรมการกระจายของขนาดอนุภาค

ในกรณีที่สังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALZ} ด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นชัดเจนว่าไม่พบสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนทอง (รูปที่ 4.6A) และจากภาพ TEM รูปที่ 4.6B แสดงให้เห็นถึงการรวมตัวกัน (Aggregated) หรือการตกตะกอนเกิดขึ้น บ่งชี้ได้ถึงความสเถียรภาพต่ำของอนุภาค ซึ่งสามารถยืนยันเพิ่มเติมถึงความสำคัญของคลื่นความถี่อัลตราโซนิกต่อการก่อตัวของ Au^0-NPs_{ALZ} อีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการลดการกระจายตัวของขนาดอนุภาคให้แคบลงอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

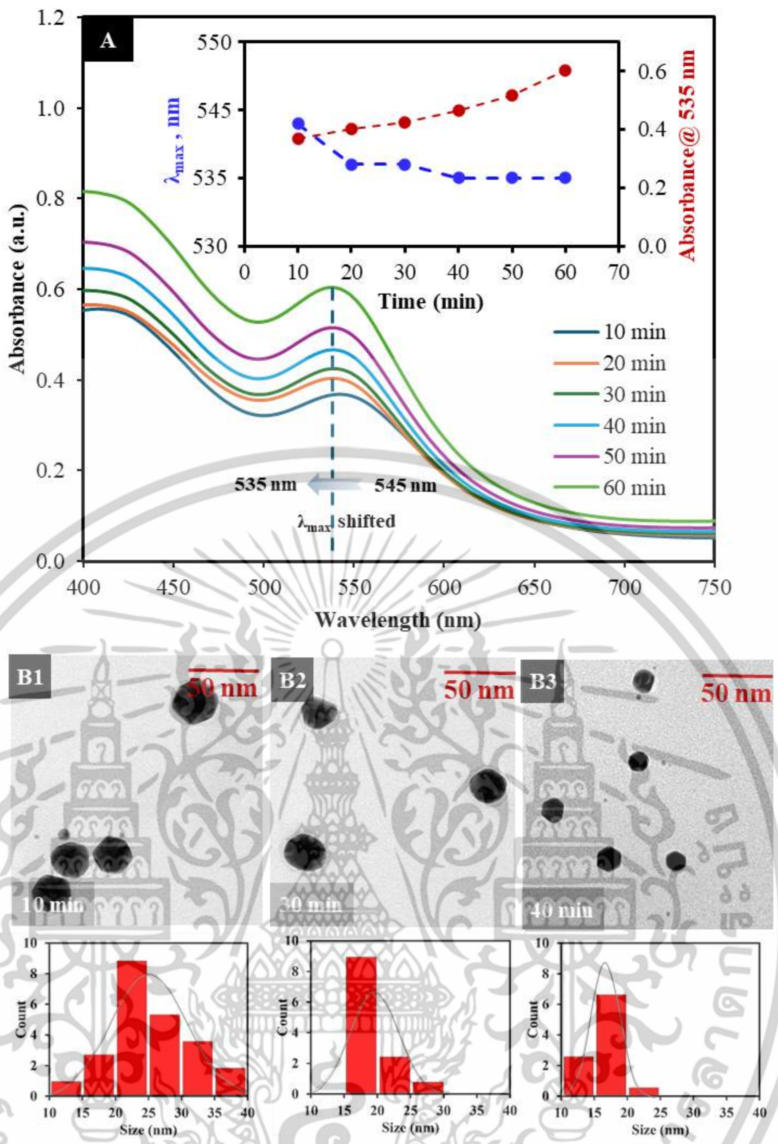


รูปที่ 4.6 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิกเทียบกับวิธีการรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียว (B) ภาพ TEM ของ Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการรีดักชันทางเคมีเพียงอย่างเดียว

4.1.2.3 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz}

อิทธิพลของระยะเวลาการให้คลื่นอัลตราโซนิก ได้ทำการศึกษาในช่วง 10 - 60 นาที ผลแสดงดัง รูป 4.7A ซึ่งพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงขึ้น ตามระยะเวลาการให้คลื่นอัลตราโซนิกที่นานขึ้น และ ค่า λ_{max} เกิด Blue shift จาก 542 นาโนเมตร (ที่ 10 นาที) เป็น 535 นาโนเมตร (ที่ 40 นาที ขึ้นไป) แสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาอัลตราโซนิกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ขนาดอนุภาค Au^0-NPs_{ALz} (รูปที่ 4.7B) เล็กลงจาก 25.02±2.70 นาโนเมตร เหลือ 17.84±1.37 นาโนเมตร และการกระจายของขนาดอนุภาคลดลงเมื่อใช้เวลาอัลตราโซนิกนานขึ้น ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากระยะเวลาที่นานขึ้น คลื่นความถี่อัลตราโซนิกสามารถสร้างอนุมูล (e^-_{aq}, $H^•$, H_2, $HO^•$, H_3O^+, และ H_2O_2) ได้มากขึ้น [31] ส่งผลให้เกิดการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารตั้งต้น $[AuCl_4]^-$ และการเติบโตของ Au^0-NPs_{ALz} ให้มากขึ้น และยังช่วยให้การกระจายอนุภาคมีการกระจายตัวที่ดี (Dispersion) มีขนาดที่สม่ำเสมอ (Uniformity) และความเป็นผลึก (Crystallinity) ของ Au^0-NPs_{ALz} ดีขึ้น [59]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

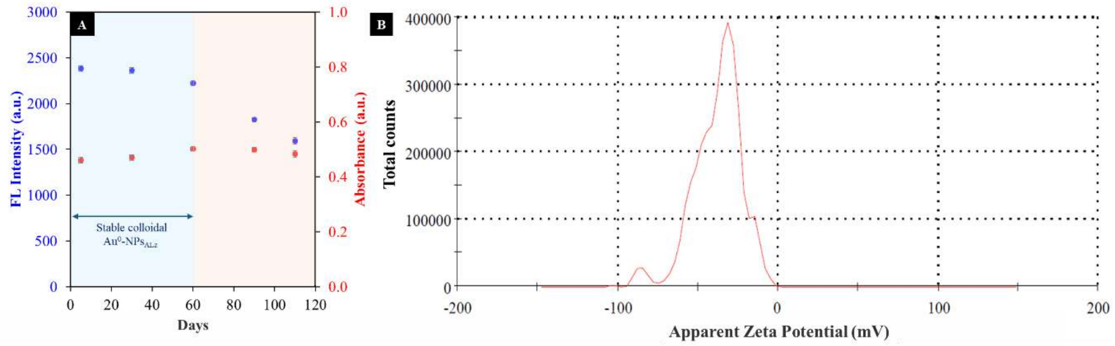


รูปที่ 4.7 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย Au^{0}-NPs$_{ALz}$ ที่เวลาแตกต่างกันในการสังเคราะห์ (B) ภาพ TEM ของ Au^{0}-NPs$_{ALz}$ ที่เวลาแตกต่างกันในการสังเคราะห์ และฮิสโทแกรมการกระจายของขนาดอนุภาค

4.1.2.4 ศึกษาเสถียรภาพของ Au^{0}-NPs$_{ALz}$ ที่สังเคราะห์ได้

จากการศึกษาสภาวะในการสังเคราะห์ Au^{0}-NPs$_{ALz}$ สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ดังนี้ 1) ใช้ ALz เข้มข้น 600 ไมโครโมลต่อลิตร 2) 35% Sonic amplification และ 3) อัลตราโซนิกเป็นเวลา 40 นาที ซึ่งพบว่า Au^{0}-NPs$_{ALz}$ ที่สังเคราะห์ได้เป็นสารคอลลอยด์ที่มีความเสถียรที่ดีเยี่ยมภายใต้ระยะเวลา 60 วัน (รูปที่ 4.8A) และการวัดศักย์ซีตาแสดงให้เห็นว่า ค่าศักย์ไฟฟ้าบนพื้นผิวของ Au^{0}-NPs$_{ALz}$ อยู่ที่ -38.17 ± 3.01 มิลลิโวลต์ (รูปที่ 4.8B) ซึ่งบ่งชี้ถึงความเสถียรที่ดีของคอลลอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



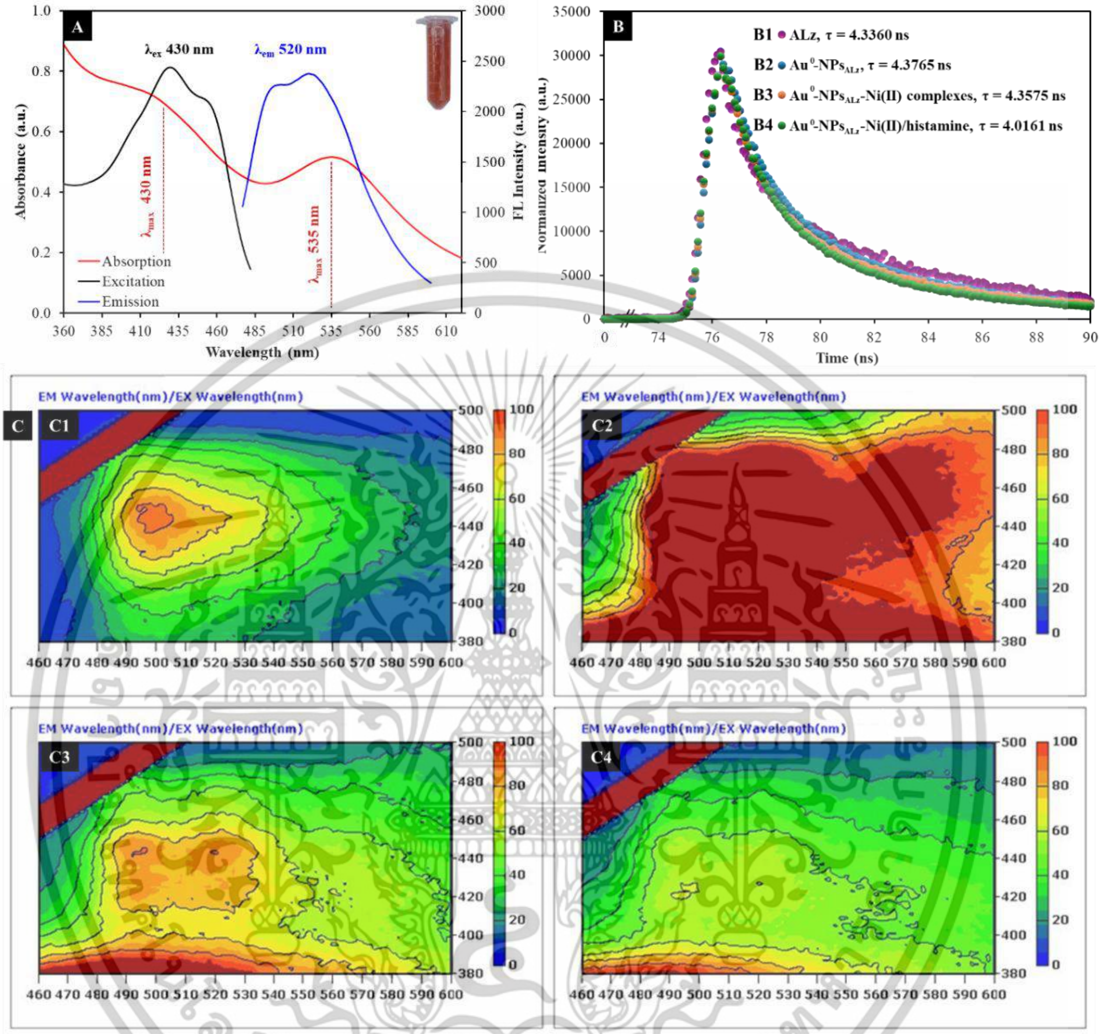
รูปที่ 4.8 (A) กราฟจุดพลอตระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และ ค่าการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz} เทียบกับจำนวนวันในการเก็บสารละลายหลังการสังเคราะห์ และ (B) กราฟศักย์ซีตาของ Au^0-NPs_{ALz}

4.1.3 พิสูจน์เอกลักษณ์ของ Au^0-NPs_{ALz}

สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-vis และสเปกตรัมการกระตุ้นและการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.9A สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} แสดงแถบการดูดกลืนแสงสองแถบที่ 430 นาโนเมตรและ 535 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนจาก $\pi \rightarrow \pi^*$ ในวงอะโรมาติก C=C ของสารประกอบ ALz บนพื้นผิวของอนุภาค [60] และไดโพลาร์ LSPR ของ Au^0-NPs_{ALz} [61] ตามลำดับ ความยาวคลื่นการเรืองแสงสูงสุดของ Au^0-NPs_{ALz} อยู่ที่ประมาณ 520 นาโนเมตร โดยมีการกระตุ้นที่ 430 นาโนเมตร อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ขึ้น มีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเรืองแสงของ ALz บนพื้นผิวของอนุภาค เนื่องจากการทับซ้อน (Overlap) กันเล็กน้อย ระหว่างการดูดกลืนแสง LSPR (535 นาโนเมตร) และสเปกตรัมการเรืองแสง (520 นาโนเมตร) การเกิดอันตรกิริยาในระยะห่างที่เหมาะสม สนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากการสั่นของพลาสมอน (Local density of optical states) จะช่วยลดช่องว่างอิสระ (Free space light incident) ของ ALz ทำให้เกิดการเรโซแนนซ์ของอิเล็กตรอนได้มากขึ้น อีกทั้ง พลังงานที่สูงขึ้นจากการกระตุ้น $\pi \rightarrow \pi^*$ ของอะโรมาติก C=C ใน ALz ได้ถ่ายโอนไปยังพื้นผิว Au^0-NPs_{ALz} ซึ่งสามารถเพิ่มการเรโซแนนซ์ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic resonance) ที่ซ้อนทับกัน ทำให้การเรืองแสงของอนุภาคโดยรวมนั้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ประสิทธิภาพของการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นได้รับการยืนยันเพิ่มเติมโดยใช้ Fluorescence lifetime และการวัดสเปกตรัมของฟลูออเรสเซนซ์ 3 มิติ รูปที่ 4.9B (B1-B2) แสดงสเปกตรัม Fluorescence lifetime ของ Au^0-NPs_{ALz} พบว่า ค่า τ = 4.3765 ns ซึ่งมากกว่าสารประกอบ ALz อิสระ (τ = 4.3360 ns) แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนทองด้วย ALz นั้นมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเรืองแสงแบบไดนามิกได้ (Dynamic enhancement) ยิ่งไปกว่านั้น สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนซ์ 3 มิติ (รูปที่ 4.9C (C1-C2)) แสดงให้เห็นถึงการกระตุ้นการเรืองแสง และการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น จากแผนผังแถบพื้นที่สีแดงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรากฏกว้างขึ้น โดยสรุปแล้ว การเพิ่มประสิทธิภาพเรืองแสงของ ALz จากการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} ถือเป็นผลสำเร็จ



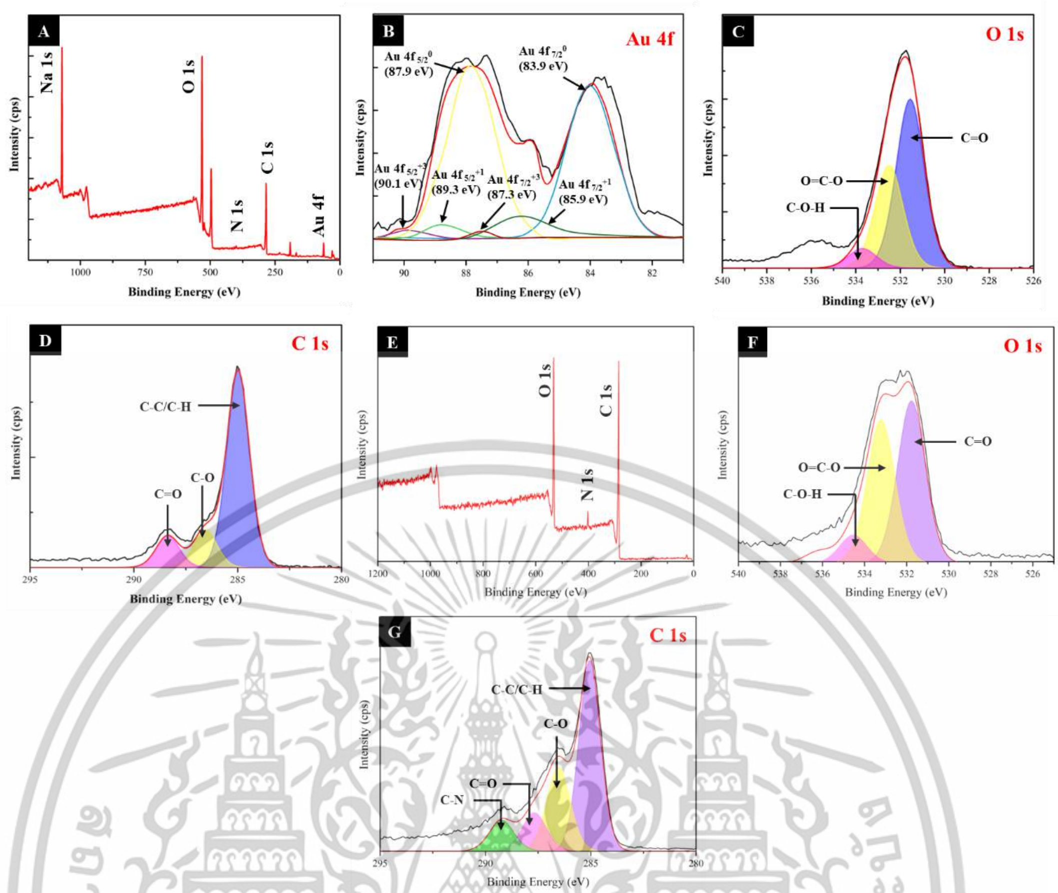
รูปที่ 4.9 คุณลักษณะ Au^0-NPs_{ALz} (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสง และการกระตุ้นและการเรืองแสง (B) Time-resolved fluorescence (B1) ALz, (B2) Au^0-NPs_{ALz}, (B3) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes และ (B4) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine. (C) สเปกตรัมเรืองแสง 3 มิติของ (C1) ALz, (C2) Au^0-NPs_{ALz}, (C3) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes และ (C4) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine

นอกจากนี้การเกิดอันตรกิริยาของ ALz บนอนุภาค Au^0-NPs_{ALz} ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Raman spectroscopy, X-ray diffraction (XRD) และ Transmission electron microscopy (TEM) สเปกตรัม XPS ใช้เพื่อยืนยันองค์ประกอบธาตุและสถานะทางเคมีของ Au^0-NPs_{ALz} สเปกตรัม Full survey ของ Au^0-NPs_{ALz} และสเปกตรัมที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการขยายออก (Deconvolution) ของ Au 4f, O 1s, และ C 1s แสดงในรูปที่ 4.10 รูปที่ 4.10A แสดงให้เห็นการมีอยู่ของ Au 4f ร่วมกับ O 1s, N 1s และ C 1s ใน Au^0-NPs_{ALz} และ XPS ความละเอียดสูง (HR-XPS) ของสเปกตรัม Au 4f แสดงค่าพลังงานยึดเกาะ (Binding energy; BE) ที่ชัดเจนสองค่า (รูปที่ 4.10B) คือ 87.9 eV และ 83.9 eV ซึ่งสอดคล้องกับ $Au4f_{5/2}$ และ $Au4f_{7/2}$, ตามลำดับ สเปกตรัมที่ถูกขยายออก (Deconvolution) ของ Au 4f และการปรับเส้นโค้ง (Curve fitting) แสดงให้เห็น Spin-orbit splitting สามชนิด (สถานะออกซิเดชัน) สำหรับ Au^0, Au^+ และ Au^{3+} โดยค่า BE ที่ตำแหน่ง 87.9 และ 83.9 eV แสดงถึงโลหะ Au (Au^0) ของ Au $4f_{5/2}$ และ Au $4f_{7/2}$ ในระดับแกนกลาง (Core levels), ตามลำดับ และค่า BE ที่ตำแหน่ง 90.1 eV, 89.3 eV, 87.3 eV และ 85.9 eV แสดงถึง Au $4f_{5/2}{}^{+3}$, Au $4f_{5/2}{}^{+1}$, Au $4f_{7/2}{}^{+3}$ และ Au $4f_{7/2}{}^{+1}$ ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกการมีอยู่ของโลหะทอง (Au^0) ใน Au^0-NPs_{ALz} นอกจากนี้ รูปที่ 4.10 C และ D แสดงค่าพลังงานสูงสุดของ O 1s และ C 1s ซึ่งเกิดจาก ALz ที่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของ Au^0-NPs_{ALz} เมื่อเปรียบเทียบกับค่าพลังงาน (รูปที่ 4.10 E-F) ของสารประกอบ ALz อิสระในตารางที่ 4.1 พบว่า ค่าพลังงานที่ตำแหน่งของ C=O (C 1s) ของ Au^0-NPs_{ALz} คือ 288.363 3V ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปจาก สารประกอบ ALz คือ 289.248 eV ซึ่งสอดคล้องกับค่าพลังงานที่ตำแหน่งของ O=C-O (O 1s) ที่เปลี่ยนแปลงไป (533.213 eV เป็น 532.484 eV) ซึ่งบ่งชี้ว่า ตำแหน่งในการฟังก์ชัน สารประกอบ ALz เกิดผ่าน กลุ่มคาร์บอกซิลบนวงแหวนอะโรมาติกในโครงสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 XPS สเปกตราของ Au^0-NPs_{ALz} (A) XPS survey (B) สเปกตรัมความละเอียดสูง XPS ของ Au 4f และ Deconvolution ของ สเปกตรัมความละเอียดสูง XPS (C) O 1s และ (D) C 1s XPS สเปกตราของสารประกอบ ALz อิสระ (E) XPS survey และ Deconvolution ของ สเปกตรัมความละเอียดสูง XPS (F) O 1s (G) C 1s

ตารางที่ 4.1 Binding energies ของ C 1s และ O 1s, และ Δ (eV) ของ ALz และ Au^0-NPs_{ALz}

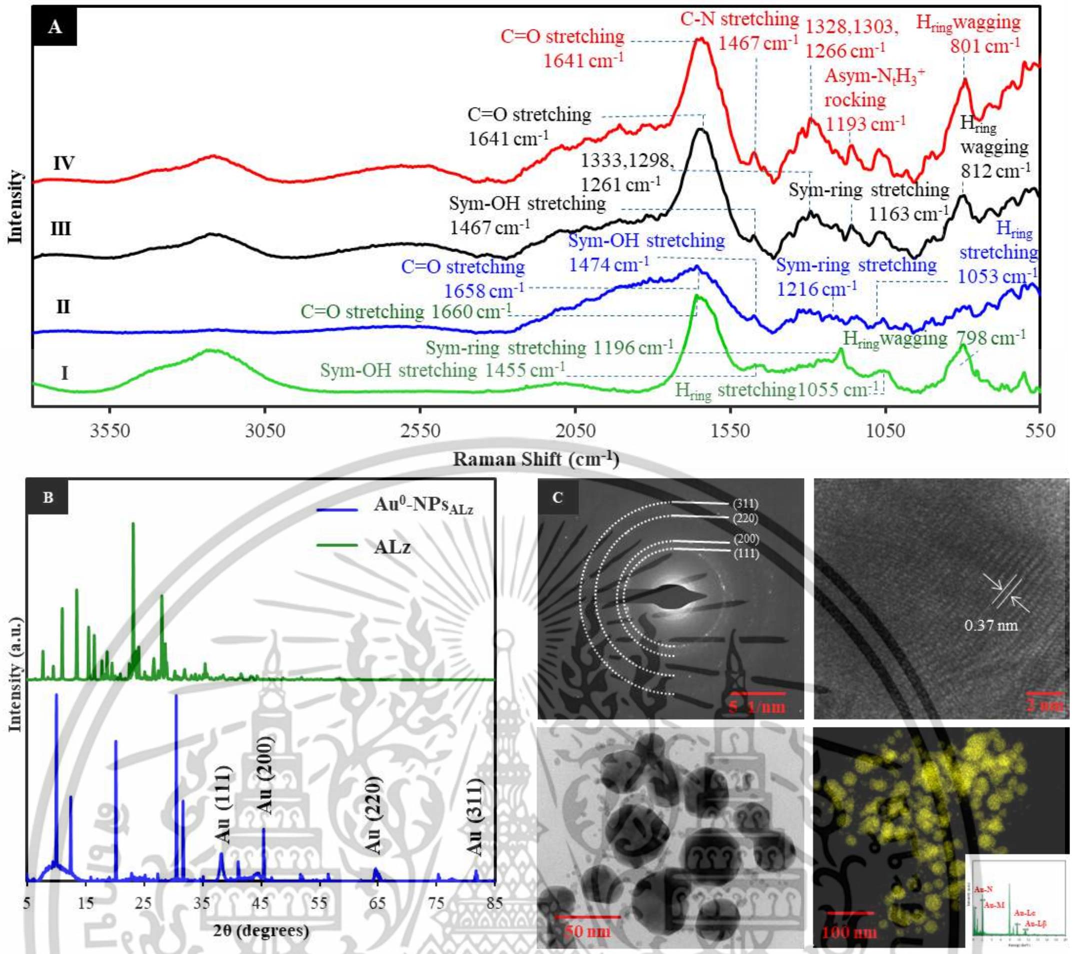
สารประกอบ	ตำแหน่งค่าพลังงาน C 1s (eV)	Δ (eV)	ชนิดของพันธะ	ตำแหน่งค่าพลังงาน O 1s (eV)	Δ (eV)	ชนิดของพันธะ
ALz	285.049	-	C-C or C-H	531.764	-	C=O
	286.521	1.472	C-O	533.213	1.449	O=C-O
	287.696	2.647	C=O	534.529	2.765	C-O-H
	289.248	4.199	C-N			
Au^0-NPs_{ALz}	285	-	C-C or C-H	531.536	-	C=O
	286.548	1.548	C-O	532.484	0.948	O=C-O
	288.363	3.363	C=O	533.687	2.151	C-O-H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.11A (I-II) สเปกตรัมรามานของ ALz แสดงแถบเอกลักษณ์เฉพาะที่ตำแหน่ง 1660, 1455, 1196 1055 และ 798 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับแถบการสั่นของ C=O stretching, Sym-OH stretching, Sym-ring stretching และ H_{ring} wagging ของวงแหวนอะโรมาติก ตามลำดับ [62] นอกจากนี้ ค่าการดูดกลืนที่ชัดเจนที่เกิดการ shift ไปเล็กน้อย ณ ตำแหน่ง 1,658 cm^{-1} ของ Au^0-NPs_{ALz} แสดงถึงการสั่นของกลุ่ม C=O stretching ของวงแหวนแอนทราควิโนนในโครงสร้างของ ALz ซึ่งยืนยันการเกิดอันตรกิริยาร่วมกันของ C=O บนพื้นผิวของ Au^0-NPs_{ALz}

นอกจากนี้ได้ศึกษาโครงสร้างผลึกของ Au^0-NPs_{ALz} จากสเปกตรัม XRD ของ Au^0-NPs_{ALz} ในรูปที่ 4.11B แสดงค่าการเลี้ยวเบนที่มุม 2θ สี่ตำแหน่งคือ 38.1, 44.3, 64.5 และ 77.5 ซึ่งสอดคล้องกับ Bragg reflections มาตรฐานของ (111), (200), (220) และ (311) ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ถึงระนาบของ Face-centered cubic (fcc) (JCPDS 04-0784) [63] สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของ Au^0-NPs_{ALz} ได้วิเคราะห์เอกลักษณ์โดยเทคนิค TEM ดังที่แสดงในรูปที่ 4.11C พบว่า Au^0-NPs_{ALz} มีสัณฐานวิทยาเป็นรูปทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 17.84 ± 1.37 นาโนเมตร โดยขนาดมีการกระจายอยู่ในช่วง 16.30–20.04 นาโนเมตร เมื่อวัดจากภาพ HR-TEM ระยะห่าง Lattice spacing ของ Au^0-NPs_{ALz} คือ 0.37 นาโนเมตร และรูปแบบของ SAED ได้บ่งชี้ตาม Reflections (111), (200), (220) และ (311) ของทอง fcc บนพื้นฐานของค่าระยะห่าง d ของวงแหวนเลี้ยวเบนที่ 0.27 นาโนเมตร, 0.22 นาโนเมตร, 0.17 นาโนเมตร และ 0.14 นาโนเมตร ตามลำดับ และสเปกตรัม EDS แสดงพีคของทองที่ 0.27 keV, 2.12 keV, 9.62 keV และ 11.44 keV จากผลทั้งหมดชี้ให้เห็นว่างานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} ได้เป็นผลสำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

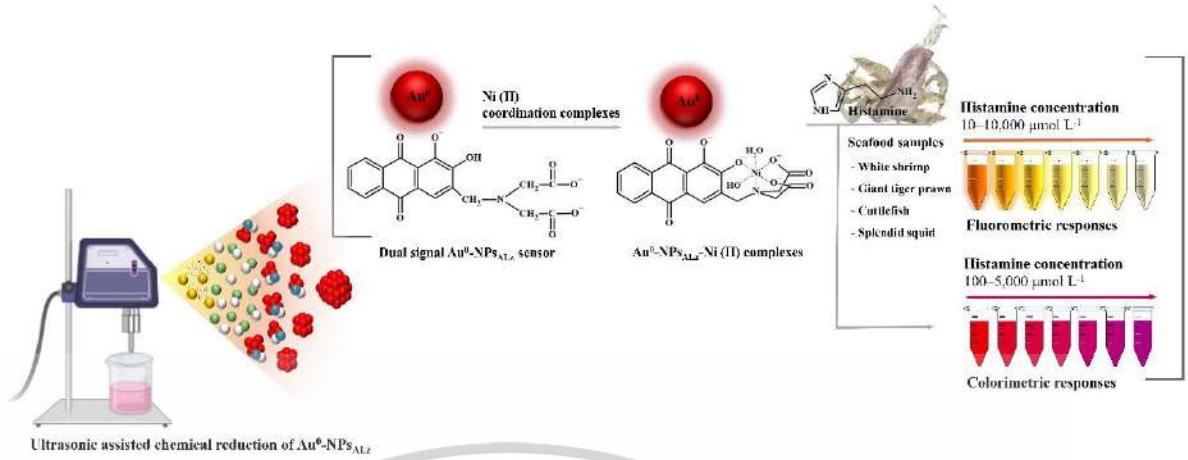


รูปที่ 4.11 (A) สเปกตรัมรามานของ (i) ALz, (ii) Au^0-NPs_{ALz}, (iii) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes และ (iv) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine, (B) รูปแบบ XRD ของ – ALz และ – Au^0-NPs_{ALz}. และ (C) ภาพ SAED, HR-TEM, TEM และภาพการทำแผนที่องค์ประกอบที่แทรกสเปกตรัม EDX

4.2 การตรวจวัดฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วย ALz ที่มีนิกเกิล (II)

การตรวจวัดฮีสทามีนจะอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฮีสทามีนกับ Ni (II) ที่เป็นสารสื่อกลางเลือกจำเพาะบนพื้นผิวของอนุภาค และเกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในระบบระหว่าง ฮีสทามีน, Ni (II) และ ALz บนพื้นผิวอนุภาคนาโนทอง ในงานนี้ได้ใช้อนุภาคนาโนทองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเรืองแสงโดยอาศัยอิเล็กตรอนอิสระบนพื้นผิว (Electron clouds) ของอนุภาคนาโนทองเพื่อขยายสัญญาณสำหรับการตรวจวัด โดยสามารถนำเสนอรูปแบบการตรวจวิเคราะห์ได้ถึงสองโหมด คือ Colorimetric response และ Fluorometric response โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังนี้

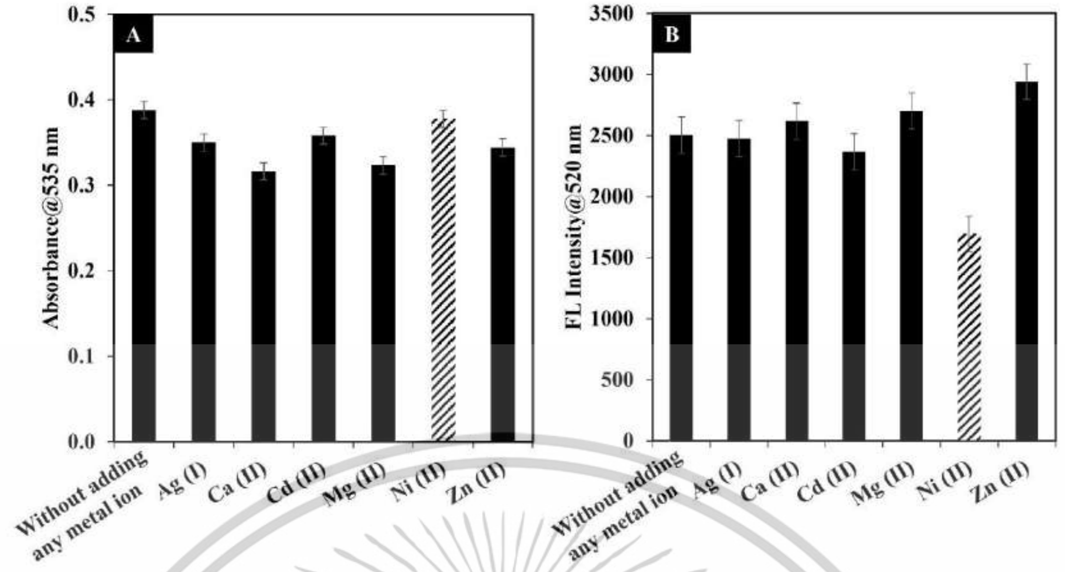
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 กลไกการตรวจวัดฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทอง

ขั้นแรกทำการเติม Ni (II) เพื่อให้ Au^0-NPs_{ALz} สร้างพันธะเชิงซ้อน (Coordinate covalent) กับ Ni (II) ก่อน โดยที่ Ni (II) จะไม่รบกวนการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} และยังคงให้ค่าการเรืองแสงอยู่ โดยจะใช้เป็นสารช่วยเพิ่มความจำเพาะต่อฮีสทามีน ซึ่งจากการค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า Ni (II) มีความไว (Sensitivity) และความเลือกจำเพาะ (Selectivity) ต่อฮีสทามีนที่ดี [64-66] จะได้สารเชิงซ้อน Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในลักษณะ Pseudo-octahedron geometry (รูปที่ 4.12) ด้วยการเกิดโคออร์ดิเนตสี่ตำแหน่งจากอะตอมของไนโตรเจน (N) และออกซิเจน (O) ของสารประกอบ ALz บนพื้นผิวของอนุภาค และโคออออร์ดิเนตอีกสองตำแหน่งจากไฮดรอกไซด์ไอออน (-OH) และโมเลกุลของน้ำ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าได้มีการศึกษาอิทธิพลของไอออนของโลหะชนิดต่างๆ ซึ่ง Ni (II) Cu (II) และ Zn (II) มีความสามารถในการเลือกจำเพาะต่อกลุ่มอะมิโนมากที่สุด สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือก Ni (II) สารตัวกลางการเลือกจำเพาะเนื่องจาก ในอาหารทะเลมีกลุ่มอะมิโนที่หลากหลาย ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแข่งขันในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน และจากงานวิจัยของ Y. Altun และคณะ [48] แสดงให้เห็นว่า Ni (II) สามารถการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับฮีสทามีนได้ดีที่สุด และจากการทดลองการเลือกจำเพาะ รูปที่ 4.13A Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine แสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และ รูปที่ 4.13B Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine แสดงค่าการเรืองแสงต่ำสุด เนื่องมาจากการดับแสงจากการเกิดสารประกอบ Histamine บนพื้นผิวของอนุภาค จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า Ni (II) มีความเลือกจำเพาะที่ดีต่อฮีสทามีน และสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงได้ในสองโหมดของการตรวจวัด ทั้งการตรวจวัดการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Colorimetric response) และการตรวจวัดการเรืองแสง (Fluorometric response)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

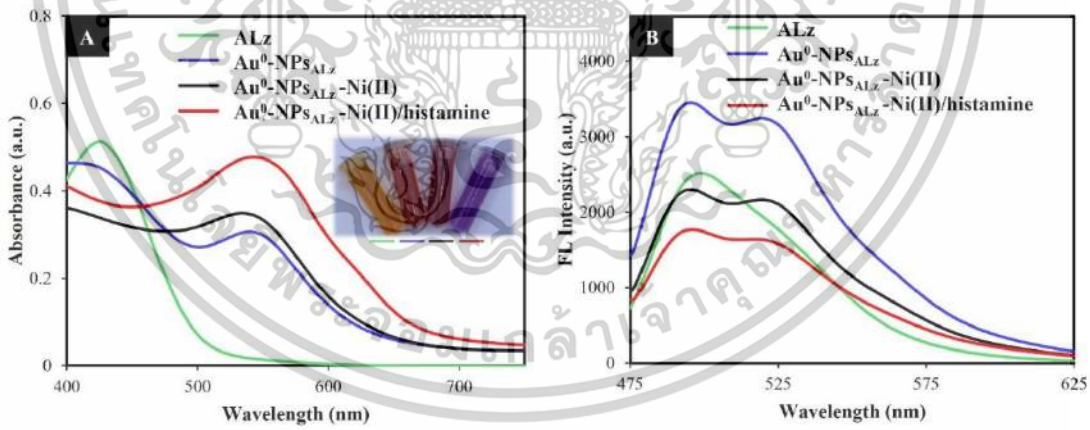


รูปที่ 4.13 การเกิดโคออร์ดิเนตชั่นของ Au^0-NPs_{ALz} กับไอออนโลหะทรานซิสชั่นและฮีสทามีนที่ความเข้มข้น 5000 ไมโครโมลต่อลิตร (A) Colorimetric response (B) Fluorometric response

จากนั้นได้นำ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes มาใช้เป็นเซนเซอร์ในการตรวจวัดฮีสทามีนทั้งสองโหมด ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ดัง รูปที่ 4.14 สำหรับโหมดการวัดค่าการดูดกลืนแสง Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes แสดงมีค่า λ_{max} ที่ 535 นาโนเมตร โดยสารละลายจะมีสีแดงเข้ม (Vivid red) เมื่อเติมฮีสทามีนเข้าไป ค่า λ_{max} จะเกิดการเลื่อนไปทางความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น (Bathochromic shift) เล็กน้อย โดยสังเกตได้ที่ 545 นาโนเมตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงขึ้น และสีสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง (รูปที่ 4.14A) สำหรับโหมดการตรวจวัดการเรืองแสง Au^0-NPs_{ALz} เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรภายใต้ความยาวคลื่นการกระตุ้น 430 นาโนเมตร และการเรืองแสงนั้นถูกดับลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับ Ni (II) (รูปที่ 4.14B) การมีอยู่ของ Ni (II) บนพื้นผิว Au^0-NPs_{ALz} เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความเข้มของการเรืองแสง เนื่องจากการถ่ายโอนพลังงานจากสถานะกระตุ้นต่ำสุด (Lowest excited singlet state) ของ Au^0-NPs_{ALz} ไปยังสถานะอิเล็กทรอนิกส์ Octahedral d^8 Ni (II) ส่งผลให้เกิดการเรืองแสงลดลง หลังจากนั้นการเรืองแสงจะลดลง (Quenched) อย่างมีนัยสำคัญหลังจากเติมฮีสทามีนในระบบ โมเลกุลฮีสทามีนประกอบด้วยวงแหวนอิมิดาโซลและกลุ่มอะมิโนอะลิฟาติก (Imidazole ring และ aliphatic amino group) ซึ่งเป็นตำแหน่งในการเข้าทำปฏิกิริยาในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine การเข้าทำปฏิกิริยาเกิดที่ตำแหน่งนิวคลีโอฟิลิกบนคอมเพล็กซ์ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) ผ่านการเกิด Ligand complexation จนเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine (รูปที่ 4.1C) เพื่ออธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลระหว่างฮีสทามีนโคออร์ดิเนตกับ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes ได้ทำการตรวจสอบด้วย Raman spectroscopy และ Fluorescence lifetime

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามที่แสดงในรูปที่ 4.10B-III สเปกตรัมรามานใช้เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาทางเคมีบนพื้นผิวของ Au^0-NPs_{ALz} สเปกตรัมรามานของสารเชิงซ้อน Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) แสดงแถบการดูดกลืนที่ตำแหน่ง 1641 cm^{-1}, 1467 cm^{-1} และ 1163 cm^{-1} ที่บ่งชี้ถึงการสั่นของ C=O stretching ของกลุ่มคาร์บอกซิเลทในโครงสร้าง ALz, Symmetric OH stretching และ Symmetric stretching ของวงแหวนไฮดรอกซีอันทราควิโนนของ ALz ตามลำดับ การดูดกลืนสามตำแหน่ง (Triple peaks) ที่ 1261, 1298 และ 1333 cm^{-1} ได้บ่งชี้ถึง N-Ni-O/N [67] จากรูปที่ 4.10B-IV ได้ยืนยันความสำเร็จในการเกิดสารเชิงซ้อน Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine โดยแสดงแถบการดูดกลืนใหม่ที่ตำแหน่ง 1,193 cm^{-1} ของ Asymmetric $N_tH_3^+$ rocking ปรากฏขึ้น บ่งชี้ว่าโมเลกุลฮีสทามีนเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อน Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) มากไปกว่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญที่ 1266, 1303 และ 1328 cm^{-1} ของ N-Ni-O/N สามารถยืนยันได้ว่า ฮีสทามีนเกาะบนพื้นผิว Au^0-NPs_{ALz} โดยผ่านโลหะตัวกลาง Ni (II) การวิเคราะห์ Fluorescence lifetime ของ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes เมื่อมีฮีสทามีนสามารถยืนยันอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.9b4 เมื่อมีฮีสทามีน Fluorescence lifetime ของ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes ลดลงเหลือ 4.0161 ns การมีวงแหวนอิมิดาโซล (Imidazole ring) ในโมเลกุลฮีสทามีน ทำให้เกิดโครงสร้าง Conjugated ซึ่งช่วยให้สามารถถ่ายโอนอิเล็กตรอนภายในโมเลกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพจากสถานะ $\pi \rightarrow \pi^*$ ส่งผลให้สูญเสียพลังงานจากการแผ่รังสี (Radiative energy) น้อยลงและมี Fluorescence lifetime สั้นลง



รูปที่ 4.14 การดูดกลืนแสง (A) และ การเรืองแสง (B) ของ -- ALz, -- Au^0-NPs_{ALz}, -- Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes และ -- Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดฮีสทามีนด้วย Au^0-NPs_{ALz}

4.3.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Au^0-NPs_{ALz}

ได้ทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 0.33, 0.68, 1.01, 1.35, และ 1.69 นาโนโมลต่อลิตร จากผลการวิเคราะห์ในโหมด Fluorometric response (รูปที่ 4.15A) เมื่อความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz} เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ Sensitivity ของการตรวจวัดเพิ่มขึ้นด้วย จนความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz} (1.01 นาโนโมลต่อลิตร) มีค่าที่พอดีต่อการเกิดปฏิกิริยากับปริมาณของ Ni (II) จะให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุด และเมื่อความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz} มากเกินไป จะทำให้ความชัน และ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ในการตรวจวัดลดลง เป็นผลมาจากการบดบังการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes จาก Au^0-NPs_{ALz} ที่มากเกินพอ จึงไม่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงได้ รวมถึงผลการวิเคราะห์ Colorimetric response รูปที่ 4.16A อีกด้วย พบว่าความเข้มของ SPR จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณ Au^0-NPs_{ALz} เพิ่มขึ้น และค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มสูงสุดเมื่อความเข้มข้น 1.01 นาโนโมลต่อลิตรของอนุภาคนาโนทอง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองที่ 1.01 นาโนโมลต่อลิตร สำหรับการศึกษาอื่นต่อไป

4.3.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ นิกเกิล (II) คลอไรด์

ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ Ni (II) ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครโมลต่อลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.15B แสดงกราฟมาตรฐานของฮีสทามีนเมื่อใช้ Ni(II) ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากงานวิจัยของ Yasumasa Fukushima และคณะ [15] ได้แสดง Job’s plot ของสารประกอบเชิงซ้อน ALz-Ni (II) บ่งชี้ว่า Ni (II) เกิดอันตรกิริยาต่อ ALz ในอัตราส่วน Stoichiometric 1:1 และจากการคำนวณอัตราส่วนโดยโมลในงานวิจัยนี้ พบว่า Ni (II) ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครโมลต่อลิตร ไม่เพียงพอที่จะจับกับฮีสทามีน และที่ความเข้มข้น 600 - 800 ไมโครโมลต่อลิตร จะอยู่ในช่วงที่เหมาะสำหรับปฏิกิริยา 1:1 (ALz : Ni) เมื่อพิจารณาจากกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 600 ไมโครโมลต่อลิตร แสดงให้เห็นถึงความชันและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) สูงสุด และการใช้ Ni (II) ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลต่อลิตร นั้นมากเกินพอในการทำปฏิกิริยา ทำให้ฮีสทามีนจับกับ Ni (II) ที่เหลือจากปฏิกิริยา เป็นผลให้ Sensitivity ในการวิเคราะห์ต่ำ เช่นเดียวกันในการตรวจวัดเชิงสี (Colorimetric) ตามที่แสดงในรูปที่ 4.16B กราฟแสดงให้เห็นว่า 600 ไมโครโมลต่อลิตร ให้สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) สูงสุดอีกด้วย ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ Ni (II) ที่ 600 ไมโครโมลต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด

4.3.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด

เพื่อศึกษาอิทธิพลของค่า pH ต่อ Sensitivity ในการตรวจวัดของ Au^0-NPs_{ALz} ในขั้นตอนสุดท้ายสารละลายผสม Au^0-NPs_{ALz} จะทำการปรับค่า pH โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.15C กราฟแสดงอิทธิพลของค่า pH (4.0 ถึง 7.0) จากผลการทดลองค่า pH ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 5.0 จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของ ALz บนพื้นผิวของอนุภาค ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น pH อินดิเคเตอร์ ซึ่งมี pKa = 5.54 ซึ่งสามารถเกิดการจ่ายโปรตอน $[H^+]$ ได้ที่ตำแหน่ง -OH ในโครงสร้างวงแหวนเรโซแนนซ์แอนทราควิโนน [68-69] ส่งผลให้สีของ ALz เปลี่ยนแปลงไปด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นรบกวนการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ พฤติกรรมของการเรืองแสงและการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแสงในช่วง pH ที่ <6< จะแตกต่างกัน Au^0-NPs_{ALz} เนื่องจากเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงของ ALz บนพื้นผิวของอนุภาคแตกต่างกัน คือ เมื่อ pH <6 จะแสดงค่าการดูดกลืนที่ตำแหน่ง 430 นาโนเมตร เมื่อ pH >6 จะแสดงค่าการดูดกลืนแสงซ้อนทับกับแถบ SPR ของ Au^0-NPs_{ALz} ที่ช่วง 520-540 นาโนเมตร ส่งผลให้ไม่สามารถติดตามค่าการเรืองแสงที่เปลี่ยนไปได้ สังเกตได้จากผลของความชันและสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ต่ำ และเมื่อพิจรณาประสิทธิภาพในการตรวจวัดที่ช่วงกรด Au^0-NPs_{ALz} จะเสถียรที่ค่า pH มากกว่า 3.0 เนื่องมาจากหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิเลตของ ALz บนพื้นผิวของอนุภาคมีค่า pKa เท่ากับ 2.40 และเช่นเดียวกันในการตรวจวัดเชิงสีที่ pH มากกว่า 6.0 การดูดกลืนแสงเอกลักษณ์ของ $\pi \rightarrow \pi^*$ อะโรมาติก C = C ของ ALz บนพื้นผิวของอนุภาคและ แถบ SPR ของ Au^0-NPs_{ALz} ทับซ้อนกัน ด้วยเหตุนี้ การเปลี่ยนแปลงของแถบ SPR จึงไม่สามารถติดตามได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.16C การเปลี่ยนแปลงในกราฟมารตฐานที่ pH 6.0 และ 7.0 นั้นมีค่าคงที่ ดังนั้น pH 4.0 จึงถูกเลือกใช้เป็นพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองตรวจวัดฮีสทามีน

4.3.4 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์

ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เป็นปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์หากอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ขึ้นไม่สามรถทนต่อผลของเกลือจากบัฟเฟอร์ได้แต่ในงานวิจัยนี้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ไม่ส่งผลต่อ Au^0-NPs_{ALz} มากนัก โดยผลการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลต่อลิตร ให้ค่า Sensitivity ในการตรวจวัดใกล้เคียงกัน ในงานวิจัยนี้จึงใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ 10 มิลลิโมลต่อลิตร เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ที่สูงที่สุด (รูปที่ 4.15D และ 4.16D)

4.3.5 การศึกษาลำดับในการตรวจวัดฮีสทามีน

การศึกษาลำดับการผสมสารละลายสำหรับตรวจวัดฮีสทามีน โดยลำดับแบบที่ 1 เติมฮีสทามีนหลังจากบัฟเฟอร์ (Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Acetate buffer, Histamine) และ ลำดับแบบที่ 2 ก่อนบัฟเฟอร์ (Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Histamine, Acetate buffer) ในการตรวจวัดฮีสทามีนจะเกิดผ่านสารประกอบเชิงซ้อน Histamine-Ni(II) complex บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะเกิดยากเมื่อมีค่าพีเอชน้อยกว่า 5 เนื่องจากฮีสทามีนจะถูกโปรโตเนต ทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

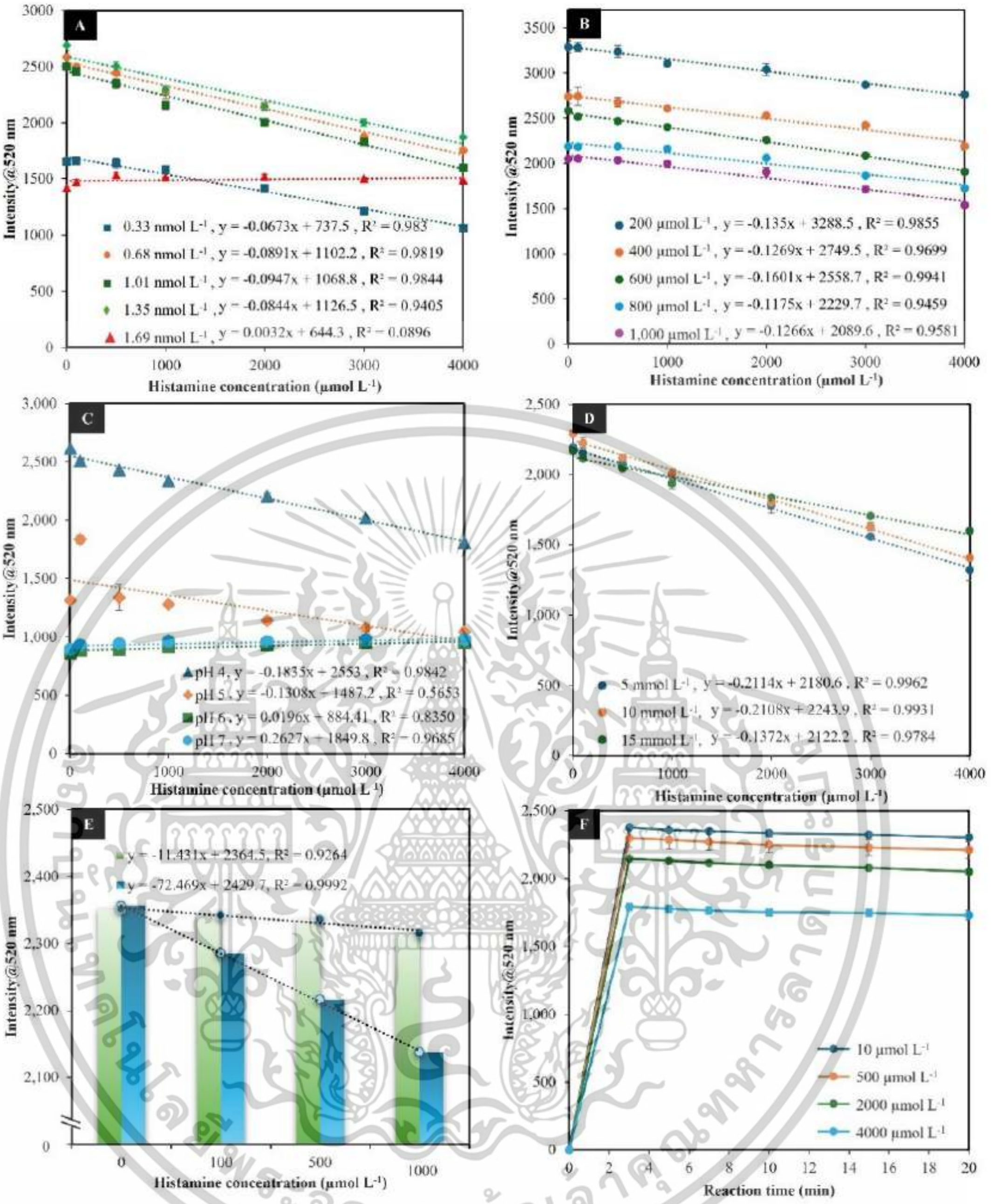
เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ Ni (II) ได้ยากมากขึ้น (จาก $pKa_{1,2}$ ของกลุ่มฟังก์ชันอะมิโนของฮีสทามีนมีค่าเท่ากับ 5.8 และ 9.4 ตามลำดับ) [25] ดังนั้นเพื่อให้เกิด Histamine-Ni(II) complex ก่อน แล้วจึงปรับค่าพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 4 จึงเลือกใช้ลำดับการผสมแบบที่ 1 สำหรับการตรวจวัดฮีสทามีน โดยผลจากรูปที่ 4.15E การตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าความชันของกราฟลำดับแบบที่ 1 สูงกว่า ซึ่งผลเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการตรวจวัดเชิงสีดังแสดงในรูปที่ 4.16E

4.3.6 การศึกษาเวลาในการตรวจวัดฮีสทามีน

ผลของเวลาในการตรวจวัดแสดงดังรูปที่ 4.15F โดยได้ทำการศึกษาฮีสทามีนที่ความเข้มข้น 10, 500, 2000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร โดยติดตามการเกิดปฏิกิริยาตั้งแต่เวลา 3 - 20 นาที พบว่าความเข้มของการเรืองแสงจะสูงสุดภายใน 2 นาทีแรก จากนั้นความเข้มการเรืองแสงจะลดลงอย่างช้าๆ และจากรูปที่ 4.16F แสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงเป็นไปในทำนองเดียวกัน เพื่อใหสะดวกต่อการทำการทดลองในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เวลาในการปฏิกิริยาที่ 5 นาที สำหรับการศึกษาต่อไป

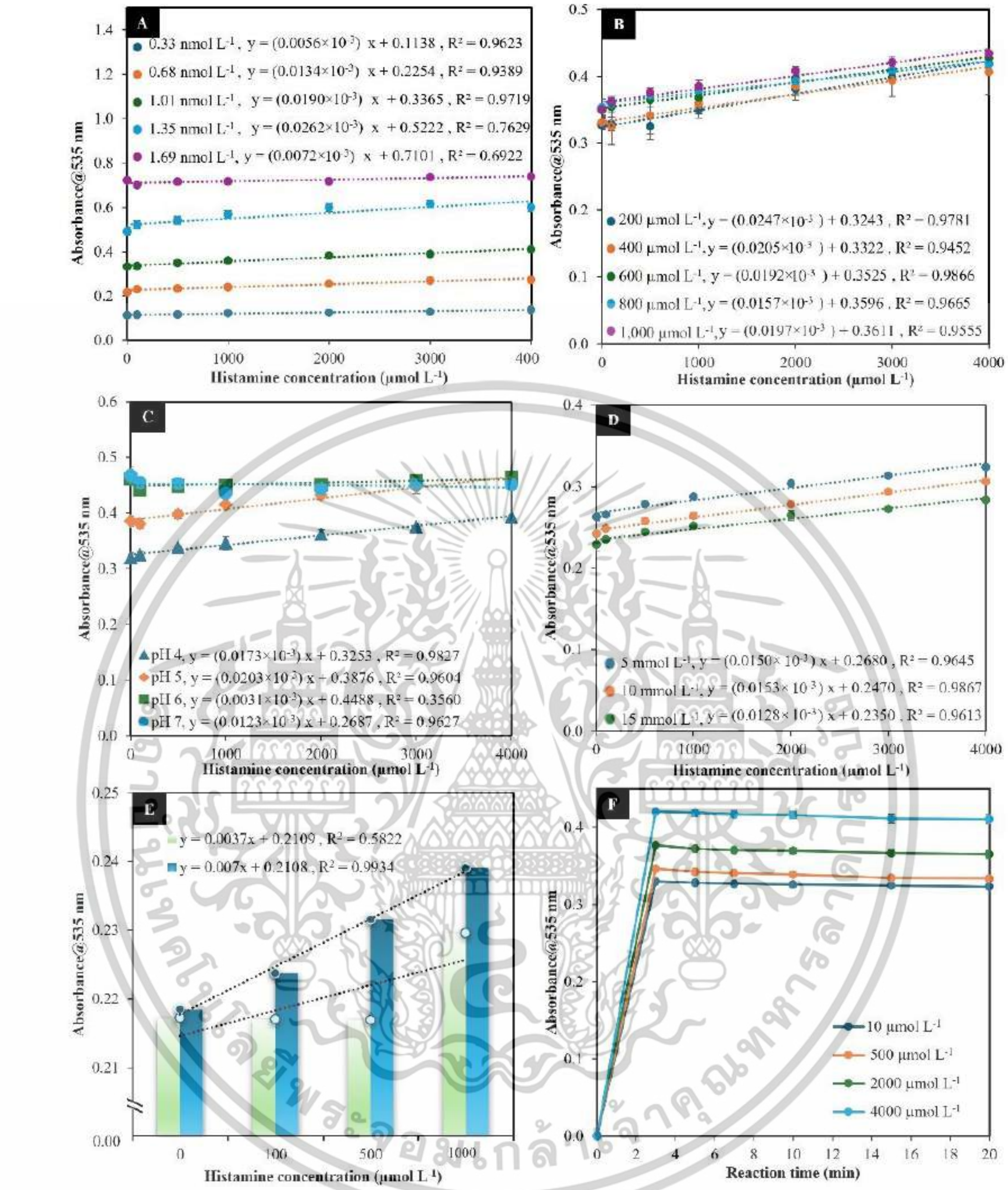
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของ Au^0-NPs_{ALz} สำหรับการตรวจวัดฮีสทามีนในโหมด Fluorometric responses (A) ความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz}; 0.33-1.69 นาโนโมลต่อลิตร, (B) ความเข้มข้นของ Ni (II); 200-1,000 ไมโครโมลต่อลิตร, (C) พีเอชของบัฟเฟอร์; 4-7, (D) ความเข้มข้นของ Acetate buffer; 5, 10, and 15 มิลลิโมลต่อลิตร, (E) ลำดับสำหรับการตรวจวัด; (Condition 1: ■) Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Histamine, Acetate buffer และ (Condition 2: ■) Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Acetate buffer, Histamine และ (F) เวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของ Au^0-NPs_{ALz} สำหรับการตรวจวัดฮีสทามีนในโหมด Colorimetric responses (A) ความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz}; 0.33-1.69 นาโนโมลต่อลิตร, (B) ความเข้มข้นของ Ni (II); 200-1,000 ไมโครโมลต่อลิตร, (C) พีเอชของบัฟเฟอร์; 4-7, (D) ความเข้มข้นของ Acetate buffer; 5, 10, and 15 มิลลิโมลต่อลิตร, (E) ลำดับสำหรับการตรวจวัด; (Condition 1: ◘) Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Histamine, Acetate buffer และ (Condition 2: ◘) Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), Acetate buffer, Histamine และ (F) เวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในตรวจวัดฮีสทามีนโดยการใช้อนุภาคนาโนทองที่รักษาเสถียรภาพด้วยอะลิซารินคอมเพล็กโซน (Au^0-NPs_{ALz}) สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะในการตรวจวัดได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อการตรวจวัดหาปริมาณฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทอง

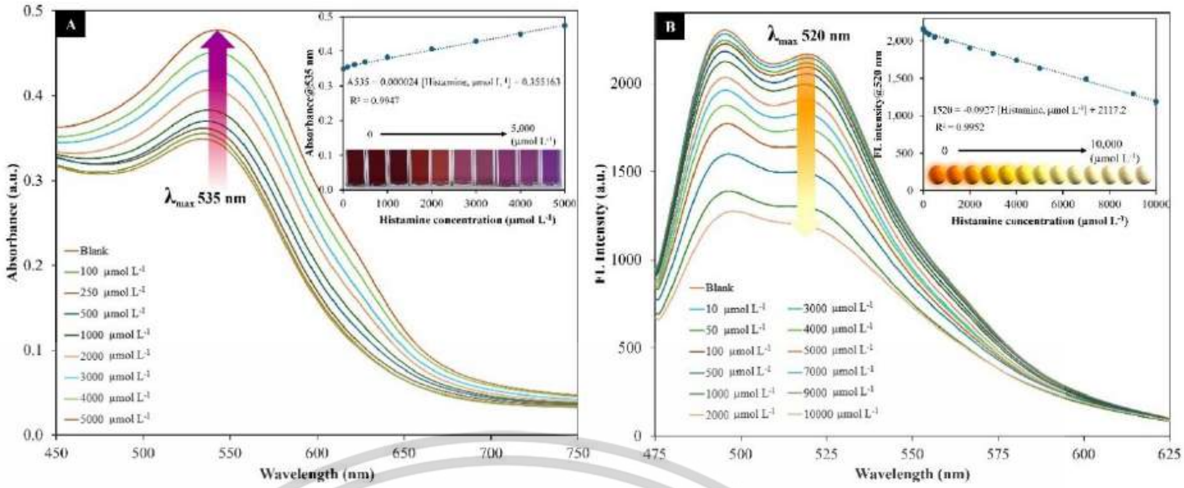
ตัวแปรที่ศึกษา	สภาวะที่เลือก
ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทอง	1.01 nmol L^{-1}
ประสิทธิภาพของสารละลายนิกเกิล (II)	600 μmol L^{-1}
ประสิทธิภาพของ pH ที่เหมาะสม	pH 4
ประสิทธิภาพของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม	10 mmol L^{-1}
ประสิทธิภาพของลำดับที่เหมาะสม	(i) Au^0-NPs_{ALz}, (ii) Ni (II), (iii) ฮีสทามีน, (iv) บัฟเฟอร์
ประสิทธิภาพของเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดฮีสทามีน	5 นาที

4.4 การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์

4.4.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดฮีสทามีนด้วย Au^0-NPs_{ALz} โดยใช้เครื่อง Fluorescence spectrophotometer และ UV-visible spectrophotometer (Linearlity)

จากผลการทดลองเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดพบว่า สเปกตรัมการเรืองแสงของอนุภาคนาโนทอง 520 นาโนเมตร ลดลงเป็นแนวโน้มตามความเข้มข้นของฮีสทามีนที่สูงขึ้น และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} มีค่าเพิ่มขึ้นเป็นแนวโน้มตามความเข้มข้นของฮีสทามีนที่สูงขึ้น และเมื่อนำผลที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรง สำหรับโหมดการวัดค่าการดูดกลืนแสง กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 100–5,000 ไมโครโมลต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9947 (รูปที่ 4.17A) โดยสำหรับโหมดการวัดค่าการเรืองแสง กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนกับค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตร พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10–10,000 ไมโครโมลต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9952 (รูปที่ 4.17B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสง และ กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร ในการตรวจวัดฮีสทามีนที่ช่วงความเข้มข้น 100-5000 ไมโครโมลต่อลิตร (B) สเปกตรัมการเรืองแสง และ กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนและค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตร ในการตรวจวัดฮีสทามีนที่ช่วงความเข้มข้น 10-10000 ไมโครโมลต่อลิตร

4.4.2 ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์

ทำการตรวจวัดฮีสทามีนที่ความเข้มข้น 500, 2000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ครั้ง จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการตรวจวัดสารละลายฮีสทามีน

Methods	Standard added (µmol L^{-1})	Found value (Mean ± SD, µmol L^{-1})	Accuracy (%)	Precision (%RSD)
	500	503.78 ± 7.07	100.76	0.23
Colorimetric sensor	2000	2017.06 ± 3.03	100.85	0.37
	4000	4031.43 ± 1.99	100.79	0.43
	500	506.62 ± 6.73	101.32	0.10
Fluorometric sensor	2000	2026.53 ± 4.48	101.33	0.37
	4000	4051.01 ± 3.59	101.28	0.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 ได้ทำการตรวจวัดสารละลายฮีสทามีนที่ความเข้มข้น 500, 2000 และ 4000 ไมโครโมลต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ครั้ง พบว่า สำหรับโหมดการตรวจวัดการดูดกลืนแสงมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 0.23, 0.37 และ 0.43 ตามลำดับ และโหมดการตรวจวัดการเรืองแสง มีค่าร้อยละ 0.10, 0.37 และ 0.54 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความเที่ยงสูง

4.4.3 ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ในการศึกษาหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOQ) ได้ทำการตรวจวัดสารละลายแบลงก์ซ้ำจำนวน 12 ครั้ง จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยใช้สมการ ดังนี้

$$\text{LOD} = \frac{\text{3 SD of Blank}}{\text{Slope}}$$

และ

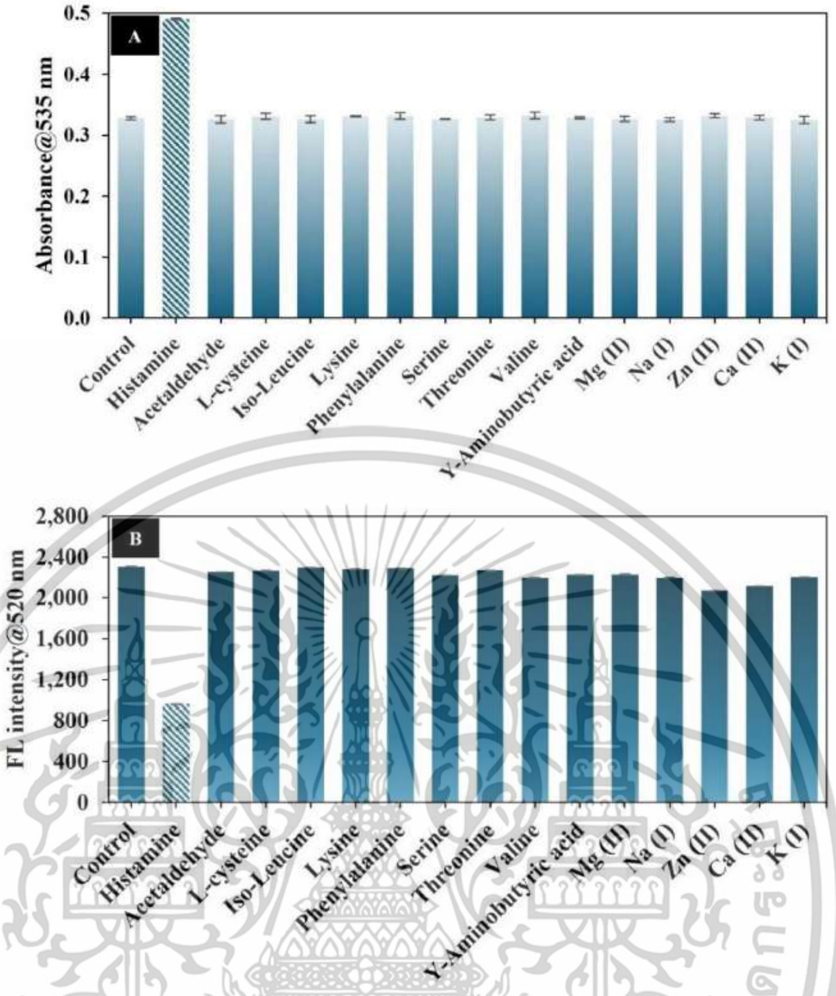
$$\text{LOQ} = \frac{\text{10 SD of blank}}{\text{Slope}}$$

ซึ่งได้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 59.32 และ 197.74 ไมโครโมลต่อลิตรตามลำดับสำหรับการตรวจวัดในโหมดการเรืองแสง และ ได้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 116.20 และ 387.33 ไมโครโมลต่อลิตรตามลำดับสำหรับการตรวจวัดในโหมดการดูดกลืนแสง

4.4.4 การศึกษาความเลือกจำเพาะของวิธี

ในการศึกษาการรบกวนของสารโดยได้ทำการตรวจวัดสารที่อาจรบกวนปฏิกิริยาที่มีอยู่ในอาหารทะเล เช่น กรดอะมิโน และไอออนของโลหะชนิดต่างๆ (Acetaldehyde (C_2H_4O), Cysteine (CH_3CHO), Leucine ($C_6H_{13}NO_2$), Lysine ($C_6H_{14}N_2O_2$), Phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$), Serine ($C_3H_7NO_3$), Threonine ($C_4H_9NO_3$), Valine ($C_5H_{11}NO_2$), Aminobutyric acid ($C_4H_9NO_2$), Mg (II), Zn (II), Ca (II), K (I), และ Na (I)) โดยความเข้มข้นของสารตัวรบกวนสูงกว่าความเข้มข้นของฮีสทามีน 50 เท่า (1,000 ไมโครโมลต่อลิตร) เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการตรวจวัดฮีสทามีน สำหรับโหมดการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 4.18A และสำหรับโหมดการวัดค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 4.18B พบว่ากรดอะมิโน และไอออนของโลหะชนิดต่างๆ ที่ได้ทำการศึกษา ไม่รบกวนการวิเคราะห์แต่อย่างใด จึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ มีความเลือกจำเพาะต่อการตรวจวัดฮีสทามีนสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 การเลือกจำเพาะของ Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor สำหรับการตรวจจับฮีสทามีนในผลิตภัณฑ์อาหารและ (A) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร (B) ค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยความเข้มข้นของสารรบกวนถูกควบคุมให้สูงกว่าความเข้มข้นของฮีสทามีน (1,000 ไมโครโมลต่อลิตร) 50 เท่า

4.4.5 การตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างจริง

เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีนในตัวอย่างจริง จึงได้ใช้ Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ได้แก่ กุ้งขาว กุ้งลายเสือ ปลาหมึกกระดอง และหมึกยักษ์ สำหรับการทดสอบได้เติมสารฮีสทามีนมารตฐานความเข้มข้นที่แน่นอน (100, 400 และ 1,000 ไมโครโมลต่อลิตร) ลงในตัวอย่างเพื่อตรวจวัดและคำนวณร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ข้อมูลที่ได้มาสรุปดังตารางที่ 4.4 สำหรับโหมดการวัดค่าการดูดกลืนแสง ร้อยละการคืนกลับพบอยู่ในช่วง 97.67-106.88% สำหรับโหมดการวัดค่าการเรืองแสง พบอยู่ในช่วง 94.99-100.91% และความสามารถในการทำซ้ำของ Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor ต่ำกว่า 5.44%RSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล

ตัวอย่าง	Added (μmol L^{-1})	Dual signal Au^{0}-NPs$_{ALz}$ sensor				HPLC standard method	
		Colorimetric responses		Fluorometric responses			
		Found (μmol L^{-1})	Recovery (%)	Found (μmol L^{-1})	Recovery (%)	Found (μmol L^{-1})	Recovery (%)
กุ้งขาว	0	438.00	-	447.26	-	443.35	-
	100	541.46	103.46 ± 1.10	547.52	100.26 ± 1.30	544.52	101.17 ± 0.99
	400	830.85	98.21 ± 1.00	840.55	98.32 ± 1.52	837.08	98.43 ± 2.59
	1000	1414.75	97.67 ± 0.27	1418.17	97.09 ± 0.57	1421.47	97.81 ± 1.73
กุ้งลายเสือ	0	848.68	-	845.42	-	846.89	-
	100	949.82	101.14 ± 1.04	943.14	97.72 ± 1.35	947.30	100.41 ± 0.52
	400	1255.60	101.73 ±0.76	1258.59	103.29 ± 1.37	1260.75	103.47 ± 1.70
	1000	1857.22	100.85 ± 0.54	1853.37	100.79 ± 0.51	1856.42	100.95 ± 1.41
หมึก	0	1425.09	-	1433.72	-	1431.80	-
กระดอง	100	1523.36	98.27 ± 1.37	1528.71	94.99 ± 0.17	1534.61	102.82 ± 2.61
	400	1819.81	98.68 ± 1.74	1819.00	96.32 ± 0.18	1817.36	96.39 ± 1.50
	1000	2431.33	100.62 ± 0.21	2442.80	100.91 ± 0.29	2445.52	101.37 ± 1.70
หมึกยักษ์	0	1429.68	-	1435.70	-	1434.60	-
	100	1536.56	106.88 ± 0.76	1534.22	98.52 ± 0.22	1535.20	100.60 ± 0.97
	400	1836.51	101.71 ± 0.68	1820.38	96.17 ± 0.39	1823.47	97.22 ± 2.21
	1000	2462.64	103.30 ± 0.08	2432.10	99.64 ± 0.43	2442.53	100.79 ± 0.11

4.4.6 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณฮีสทามีนด้วยเทคนิค HPLC

นอกจากนี้ ความใช้ได้ของวิธียังถูกเปรียบเทียบระหว่างผลลัพธ์ที่ได้จาก Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor กับผลลัพธ์ที่ได้จากวิธี HPLC มาตรฐาน ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ($F_{stat} = 2.83 \times 10^{-5}$ และ $F_{crit} = 3.20$) (ตาราง 4.5) ข้อมูลข้างต้นบ่งชี้ว่า Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor นั้นเทียบเท่ากับวิธี HPLC มาตรฐาน สามารถใช้งานจริงได้ และมีความแม่นยำสูงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีน

ตารางที่ 4.5 Anova: Single Factor

Summary

Methods	No. of sample	Sum	Average	Variance
Au^0-NPs_{ALz} Colorimetric method	16	22601.4	1412.59	354378.06
Au^0-NPs_{ALz} Fluorometric method	16	22600.7	1412.54	348599.37
HPLC	16	22622.9	1413.93	351462.85

Anova results

Source of variation	SS[1]	Df[2]	MS[3]	F_{stat}	P_{value}	F_{crit}
Between methods	19.9356792	2	9.96784	2.83596E-05	0.99997	3.20432
Within methods	15816604.1	45	351480			
Total	15816624	47				

SS[1] = Sum of squares due to the source

Df[2] = Degrees of freedom in the source

MS[3] = Mean sum of squares due to the source

นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor กับงานวิจัยอื่นๆ ที่เคยรายงานก่อนหน้า สรุปดังตารางที่ 4.6 ซึ่งพบว่า Au^0-NPs_{ALz} ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการีดักชันทางเคมีร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิกได้ถูกใช้สำหรับการตรวจวัดฮีสทามีนแบบ Dual mode (Colorimetric/Fluorometric) ที่ความเข้มข้นในระดับไมโครโมลต่อลิตร (μmol L^{-1}) มีช่วงการตรวจวิเคราะห์เชิงเส้นที่กว้างกว่า และเวลาในการตรวจวัดที่เร็วกว่าวิธีอื่นที่มีรายงานก่อนหน้า แม้ว่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ของงานนี้จะสูงกว่างานวิจัยบางงาน แต่ก็มีความไวการวิเคราะห์เพียงพอที่จะตรวจวัดฮีสทามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลจริงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นเทียบกับงานวิจัยต่างๆ

Materials	Method	Analysis time (min)	Linear range (μmol L^{-1})	LOD (μmol L^{-1})	%RSD	Ref
DNAzyme with peroxidase-mimic activity	Colorimetric	20	1170–2700	342	4.69–8.97	[45]
Polyvinyl ALzohol (PVA) sol-gel entrapped 2,3 naphthalene-dicarboxaldehyde sol-gel	Colorimetric	20	54–675	2.79	1.50–3.60	[70]
Alizarin complexone and Ni (II) complexes	Colorimetric	-	5–150	7.68	-	[15]
Graphite phase carbon nitride (g-C_3N_4)	Fluorometric	15	5–800	2.34	10	[71]
Tryptophan ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) capped Au-Ag bimetallic nanoclusters	Fluorometric	6	0.85–4	0.09	3.50–4.20	[72]
La (III) doped upconversion nanoparticles	Fluorometric Colorimetric	20 20	90–1800 224–1800	66 225	1.13–4.32 0.44–9.30	[73]
Dual signal Au^0-NPs_{ALz} colorimetric and fluorometric sensor	Fluorometric Colorimetric	5 5	10–10000 100–5000	59.32 116.20	0.32–0.80 0.81–1.07	This work

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่ดัดแปลงด้วย Alizarin complexone (Au^0-NPs_{ALz}) สำหรับประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดฮีสทามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} ได้ใช้วิธีการรีดักชันทางเคมีด้วย $NaBH_4$ ร่วมกับคลื่นความถี่อัลตราโซนิก อนุภาคที่ได้มีรูปร่างทรงกลม ขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ที่ 17.84±1.37 นาโนเมตร โดยมีแถบเซอร์เฟสพลาสมอนสูงสุด (SPR) ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร โดยสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์เป็นดังนี้

(i) อัตราส่วนที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au (III) : ALz : $NaBH_4$ คือ 1.0 : 0.6 : 10 mmol L^{-1}

(ii) Sonic amplification power คือ 35% Amp

(iii) เวลาการให้คลื่นความถี่รังสีอัลตราโซนิกที่ใช้ในการสังเคราะห์ Au^0-NPs_{ALz} คือ 40 นาที

อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ขึ้นได้ถูกนำมาพัฒนาสำหรับการตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีน โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพื้นผิวอนุภาคนาโนทองกับโลหะตัวกลาง Ni (II) และฮีสทามีน โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ คือ (1) ความเข้มข้นของ Au^0-NPs_{ALz} คือ 1.01 nmol L^{-1} (2) ความเข้มข้นของ Ni (II) คือ 600 μmol L^{-1}; (3) ความเข้มข้นของ acetate buffer pH 4.0 คือ 10 mmol L^{-1} (4) ลำดับการตรวจวัดคือ Au^0-NPs_{ALz}, Ni (II), histamine และ acetate buffer (5) เวลาในการตรวจวัดคือ 5 นาที ภายใตสภาวะที่เหมาะสม ประสิทธิภาพในการตรวจวัดเป็นดังนี้ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบ Colorimetric response และ Fluorometric response ช่วงความเส้นตรงอยู่ในช่วง 100 - 5000 μmol L^{-1} และ 10-10000 μmol L^{-1} ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) มีค่าเท่ากับ 116.20 และ 59.32 μmol L^{-1} ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 97.67-106.88% และ 94.99-100.91% ตามลำดับ และความสามารถในการทำซ้ำของ Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor ต่ำกว่า 5.44 %RSD จากผลการทดลองข้างต้นแสดงถึงความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีนได้อย่างดีเยี่ยม มีช่วงการตรวจวิเคราะหีที่กว้าง และสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างจริงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Anna, M., et al., Histamine content in selected production stages of fishproducts. J Vet Res, 2022. 66(4): 599–604.
2. Oktariani, A.F., et al., *Role of marine bacterial contaminants in histamine formation in seafood products: a review.* Microorganisms, 2022. 10(6): p. 1197.
3. Idzko, M., et al., *Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells.* J Allergy Clin Immunol, 2002. 109(5): p. 839-846.
4. Thangam, E.B., et al., *The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: the hunt for new therapeutic targets.* Front. immunol., 2018. 9: p. 1873.
5. Šimat, V., et al., *Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood.* LWT - Food Sci. Technol., 2011. 44(2): p. 399-406.
6. Nadeem, M., et al., *Determination of histamine in fish without derivatization by indirect reverse phase-HPLC method.* Microchem. J., 2019. 144: p. 209-214.
7. Köse, S., et al., *Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method.* Food Chem., 2011. 125(4): p. 1490-1497.
8. Yoshida, T., et al., *Determination of histamine in seafood by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry.* Anal. Sci., 2012. 28(2): p. 179-182.
9. Dang, A., et al., *The use of aqueous normal phase chromatography as an analytical tool for food analysis: Determination of histamine as a model system.* Food Chem., 2013. 141(4): p. 4226-4230.
10. Hu, X., et al., *Stand out from matrix: Ultra-sensitive LC– MS/MS method for determination of histamine in complex biological samples using derivatization and solid phase extraction.* Talanta, 2021. 225: p. 122056.
11. Marcobal, A., et al., *Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines.* Int. Food Res., 2005. 38(4): p. 387-394.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. Liu, X., et al., *Rapid and sensitive detection of quizalofop-p-ethyl by gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay in agriproducts and environmental samples.* Sci. Total Environ., 2023. 857: p. 159427.

13. Rastogi, S., et al., *RGB colorimetric method based detection of oxytocin in food samples using cysteamine functionalized gold nanoparticles.* Anal. Biochem., 2022. 656: p. 114886.

14. Zhang, Y., et al., *Recent advances in gold nanostructures based biosensing and bioimaging.* Coord. Chem. Rev., 2018. 370: p. 1-21.

15. Fukushima, Y., et al., *Colorimetric sensing of histamine in aqueous solution by a system composed of alizarin complexone and Ni^{2+} complex via indicator displacement approach*, Tetrahedron Lett., 2021. 72: p.153088.

16. Nelson, H.S., et al., *Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract.* J Allergy Clin Immunol., 1997. 99(6 Pt 1): p. 744-51.

17. Chen, C., et al., *A surface-imprinted surface-enhanced Raman scattering sensor for histamine detection based on dual semiconductors and Ag nanoparticles.* Food Chem., 2022. 369: p. 130971.

18. Borrego, J.T., et al., *Cross reactivity between fish and shellfish.* Allergol. Immunopathol., 2003. 31(3): p. 146-151.

19. Steensma, D.P., et al., *The kiss of death: a severe allergic reaction to a shellfish induced by a good-night kiss.* Mayo Clin Proc., 2003. 78(2): p. 221.

20. Duflos, G., et al., *Validation of standard method EN ISO 19343 for the detection and quantification of histamine in fish and fishery products using high-performance liquid chromatography.* Int. J. Food. Microbiol., 2019. 2(288): p. 97-101.

21. Sevim, K., et. al., *Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method.* Food Chem., 2011. 125(4): p. 1490-1497.

22. Kim, J.H., et al., *Improved HPLC Method Using 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde as Fluorescent Labeling Agent for Quantification of Histamine in Human Immunoglobulin Preparations.* Osong public health res. perspect., 2011. 2(2): p. 127.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23. Li, H., et al., *Colorimetric detection of food freshness based on amine-responsive dopamine polymerization on gold nanoparticles*. Talanta., 2021. 234: p. 122706.

24. Lapenna, A., et al., *"Naked" gold nanoparticles as colorimetric reporters for biogenic amine detection.* Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp., 2020. 600: p. 124903.

25. Hasanova, N., et al., *Dithioerythritol functionalized gold nanoparticles based fluorometric sensing of biogenic amines in food samples.* J. Food Compos. Anal., 2022. 114: p. 104837.

26. Mingos, D.M.P., *Structural and bonding issues in clusters and nano-clusters.* Gold Clusters, Colloids and Nanoparticles II., 2014: p. 1-65.

27. Garcia-Betancourt, M.L., et al., *Low dimensional nanostructures: measurement and remediation technologies applied to trace heavy metals in water*, in *Trace Metals in the Environment-New Approaches and Recent Advances*. IntechOpen., 2020.

28. Indhu, A., et al., *Plasmonic nanotechnology for photothermal applications–an evaluation.* Beilstein J. Nanotechnol., 2023. 14(1): p. 380-419.

29. Slepička, P., et al., *Methods of gold and silver nanoparticles preparation.* Materials (Basel)., 2019. 13(1): p. 1.

30. Caër, S., et al., *Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H2 Production under Ionizing Radiation.* Water., 2011. 3: p. 235-253 Materials (Basel)., 2019. 13(1): p. 1.

31. Fuentes-Garcíaa, J.A., et al., *Effect of ultrasonic irradiation power on sonochemical synthesis of gold nanoparticles*, Ultrason. Sonochem., 2021. 70: p. 105.

32. Hu, X., et al., *The role of ligands on synthesis, functional control, and biomedical applications of near-infrared light-responsive metal-based nanoparticles*, Coord. Chem. Rev., 2024. 502: p. 215632.

33. Alex, S., et al., *Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications—a review.* J. Nanosci. Nanotechnol., 2015. 15(3): p. 1869-1894.

34. Sabela, M., et al., *A review of gold and silver nanoparticle‐based colorimetric sensing assays.* Adv. Eng. Mater., 2017. 19(12): p. 1700270.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35. Porter Jr, L.A., et al., *Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides.* Langmuir, 1998. 14(26): p. 7378-7386.

36. Chatterjee, S., et al., *Surface-functionalized gold and silver nanoparticles for colorimetric and fluorescent sensing of metal ions and biomolecules.* Coord. Chem. Rev., 2022. 459: p. 214461.

37. Macdonald, T.J., et al., *Thiol-Capped Gold Nanoparticles Swell-Encapsulated into Polyurethane as Powerful Antibacterial Surfaces Under Dark and Light Conditions.* Sci Rep., 2016. 6: p. 39272.

38. Maguraa, J., et al., *Thiol-modified gold nanoparticles deposited on silica support using dip coating.* Appl. Surf. Sci., 2014. 315: p. 392-399.

39. Piella, J., et al., *Size-controlled Synthesis of sub-10 nm Citrate-stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties.* Chem. Mater., 2016. 28(4): p. 1066-1075.

40. Fain, V.Y., et al., *Metal complexes with alizarin complexone AC: electronic absorption spectra and ligand structure.* Russ. J. Coord. Chem., 2004. 30: p. 671-677.

41. Kunkely, H., et al., *Fluorescence of alizarin complexone and its metal complexes.* Inorg. Chem. Commun., 2007. 10(3): p. 355-357.

42. Burgess, C., et al., *The basis for good spectrophotometric UV–visible measurements*, in *UV-Visible Spectrophotometry of Waters and Soils*. 2022, Elsevier. p. 25-58.

43. Sikorska, E et al., *Fluorescence spectroscopy and imaging instruments for food quality evaluation*, in *Evaluation technologies for food quality*. 2019, Elsevier. p. 491-533.

44. Zhou, J., et al., A dual-mode fluorometric and colorimetric sensor based on N-doped carbon dots for selective and sensitive detection of nitrite in food samples, Sens. Actuators B: Chem., 2024. 416: p. 136045.

45. Li, Y., et al., Histamine detection in fish samples based on indirect competitive ELISA method using iron-cobalt co-doped carbon dots labeled histamine antibody, Food Chem., 2021. 345: p. 128812.

46. Dwidar, M., et al., Development of a histamine aptasensor for food safety monitoring, Sci Rep., 2019. 9: p. 16659.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47. Pál, P., et al., *Identification of histidine-Ni (II) metal complex by Raman spectroscopy*, J. Raman Spectrosc., 2022. 54(3): p. 278-287.

48. Y¨uksel, A., et al., *Stability of Copper(II), Nickel(II) and Zinc(II) Binary and Ternary Complexes of Histidine, Histamine and Glycine in Aqueous Solution*, J. Solut. Chem., 2005, 34: p. 213-231.

49. Li, M., et al., *Plasmon-enhanced optical sensors: a review,* Analyst, 2015. 140(2): p. 386-406.

50. Coolidge, A.S., et al., *A study of the Franck‐Condon principle,* J. Chem. Phys. 1936. 4(3): p. 193-211.

51. Okitsu, K., et al., *Sonochemical reduction method for controlled synthesis of metal nanoparticles in aqueous solutionsIn,* Proceedings of 20th international congress on acoustics, ICA 2010. p. 23-27.

52. Okitsu, K., et al., *One-pot synthesis of gold nanorods via autocatalytic growth of sonochemically formed gold seeds: The effect of irradiation time on the formation of seeds and nanorods,* 2014. 21(6): p. 1928-1932.

53. Wong, C., et al., *Enhancement of sonochemical production of hydroxyl radicals from pulsed cylindrically converging ultrasound waves,* Ultrason. Sonochem., 2023. 99: p. 106559.

54. Zheng, S., et al., *Application of Metal-Enhanced Fluorescence Technology in Evanescent Wave Fluorescent,* IEEE Instrumentation & Measurement Technology Conference Proceedings, IEEE 2010. p. 574-578.

55. Choi, J., et al., *Metal-Enhanced Fluorescence by Bifunctional Au Nanoparticles for Highly Sensitive and Simple Detection of Proteolytic Enzyme,* Nano Lett., 2020. 20(10): p. 7100–7107.

56. Seto, D., et al., *Selective fluorescence detection of histamine based on ligand exchange mechanism and its application to biomonitoring*, Anal. Biochem., 2010. 404(2): p. 135-139.

57. Altieri, I., et al., *European official control of food: Determination of histamine in fish products by a HPLC–UV-DAD method*, Food Chem., 2016. 211(15): p. 694-699.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

58. Dheyab, M., et al., *Distinct advantages of using sonochemical over laser ablation methods for a rapid-high quality gold nanoparticles production*, Mater. Res. Express., 2021. 8(1): p. 15009.

59. Gharibshahi, M., et al., Effect of ultrasonic irradiation time on the physical and optoelectronic properties of SnSe nanorods, Surf. Interfaces., 2021. 27: p. 101433.

60. Say-Liang-Fat, S., et al., *Al (III) complexation by alizarin studied by electronic spectroscopy and quantum chemical calculations,* Polyhedron, 2011. 30: p. 2326-2332.

61. Bastús, N., et al., Quantifying the sensitivity of multipolar (dipolar, quadrupolar, and octapolar) surface plasmon resonances in silver nanoparticles: the effect of size, composition and surface coating, Langmuir, 2016. 32: p. 290–300.

62. Baran, A., et al., Analysis of alizarin by surface-enhanced and FT-Raman spectroscopy, J. Raman Spectrosc., 2009. 40: p. 436-441.

63. Alharbi, N., et al., Gum-mediated fabrication of eco-friendly gold nanoparticles promoting cell division and pollen germination in plant cells, J. Clust. Sci., 2017. 28: p. 507-517.

64. Seto, D., et al., An amphiphilic fluorescent probe for the visualization of histamine in living cells, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010. 20: p. 6708–6711.

65. Ali, M., et al., Label-free histamine detection with nanofluidic diodes through metal ion displacement mechanism, Colloids Surf. B: Biointerfaces, 2017. 150: p. 201–208.

66. Altun, Y., et al., Stability of copper(II), nickel(II) and zinc(II) binary and ternary complexes of histidine, histamine and glycine in aqueous solution, J. Solution Chem., 2005. 34: p. 213-231.

67. Pal, P., Identification of histidine-Ni (II) metal complex by raman spectroscopy, J. Raman Spectrosc., 2023. 54: p. 278-287.

68. Ingman, F., et al., *The acid stability constants of Alizarin Fluorine Blue*, Talanta, 1973. 20(1): p. 135-138.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

69. Martínez-Vargas, S., et al., *Alizarin complexone–lanthanide (III)–fluoride system: Revised speciation and the origin of the analytical signal.* Inorganica Chim. Acta, 2011. 373(1): p. 226-232.

70. Khumngern, S., et al., *A simple colorimetric histamine sensor based on smartphone digital image processing for fish quality assessment*, J. Food Compos. Anal., 2024. 126: p. 105934.

71. Lin, X., et al., Rapid detection of histamine in fish based on the fluorescence characteristics of carbon nitride, J. Food Compos. Anal., 2022. 112: p. 104659.

72. Swathy, S., et al., *Tryptophan capped gold–silver bimetallic nanoclusters-based turn-off fluorescence sensor for the determination of histamine*, Talanta, 2023. 256: p. 124321.

73. Cao, Y., et al., Ratiometric fluorescent nanosystem based on upconversion nanoparticles for histamine determination in seafood, Food Chem., 2022. 390: p. 133194.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษากลไกปฏิกิริยา

สารละลายทุกชนิดเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade) และเตรียมโดยใช้น้ำปราศจากไอออนที่ได้จากเครื่อง ZENEER UP 900 (ยี่ห้อ human corporation, ประเทศเกาหลี)

1. การเตรียมสารละลายโกลด์ (III) คลอไรด์ไตรไฮเดรต เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลายโกลด์ (III) คลอไรด์ไตรไฮเดรต 0.1970 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อย แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

2. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1999 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อย แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

3. การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์

ปิเปตสารละลายกรดไฮโดรคลอริกอิ่มตัว 8.3 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

4. การเตรียมสารละลายอะลิซารินเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลายคอะลิซาริน 0.0958 กรัมในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 7 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน หลังจากนั้น ปรับ pH ของสารละลายเป็น pH 4.0-4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์

5. การเตรียมสารละลายโซเดียมโบโรไฮดรายด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ละลายโซเดียมโบโรไฮดรายด์ 0.0478 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อย แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

6. การเตรียมสารละลายนิกเกิลคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลายนิกเกิลคลอไรด์ 0.1189 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อย แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การเตรียมสารละลายนิกเกิลคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, และ 2.0 มิลลิโมลาร์

สารละลายนิกเกิล (II) คลอไรด์ 0.4 มิลลิโมลาร์ถูกเตรียมโดยการปิเปตสารละลายนิกเกิล (II) คลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน เตรียมความเข้มข้น 0.6, 0.8, 1.0 และ 2.0 มิลลิโมลาร์โดยการปิเปต 1.5, 2.0, 2.5 และ 5.0 มิลลิลิตรของสารละลายนิกเกิล (II) คลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

8. การเตรียมสารละลายฮีสทามีนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลายฮีสทามีน 0.0556 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อย แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

9. การเตรียมสารละลายฮีสทามีนที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000 และ 9000 ไมโครโมลต่อลิตร

ปิเปตสารละลาย ฮีสทามีนเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์มา 0.01, 0.05, 0.25, 1.25, , 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 17.5, และ 22.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร อย่างละขวด ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลาย `ฮีสทามีนเข้มข้น 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000 และ 9000 ไมโครโมลต่อลิตรตามลำดับ

10. การเตรียมสารละลาย Sodium acetate buffer เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 4, 5, 6 และ 7

เตรียมโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 100 มิลลิลิตร โดยการชั่งสาร 0.0820 กรัมและปรับปริมาตรให้ครบ 100 โดยน้ำปราศจากไอออน

เตรียมกรดอะซิติกเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 100 มิลลิลิตร โดยปิเปตสาร 57 ไมโครลิตรและปรับปริมาตรให้ครบ 100 โดยน้ำปราศจากไอออน

เตรียมสารละลาย โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 4, 5, 6 และ 7 โดยใช้ปรับอัตราส่วนปริมาตรเกลือต่อกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ตารางผลการทดลองในการศึกษากลไกปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

1.1 ศึกษาความเข้มข้นของตัวรักษาสเถียรภาพ

ตาราง ข.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ ALz

ความเข้มข้นของตัวรักษาเสถียรภาพ (μM)	A535
200	0.0812
400	0.2294
600	0.5110
800	0.3344
1000	0.1765

1.2 ศึกษา %Sonic amplification ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ตาราง ข.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองที่ %Sonic amplification ที่ศึกษาต่างๆ

%Sonic amplification	A535
20	0.1608
25	0.21528
30	0.2842
35	0.4088
40	0.4433

1.3 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ตาราง ข.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ด้วยเวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	λmax shift	Abs (a.u.)
10	542	0.36923
20	539	0.40244
30	539	0.42456
40	538	0.46558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา (นาที)	λmax shift	Abs (a.u.)
50	538	0.51559
60	538	0.60397

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วยอนุภาคนาโนทอง ผ่านตัวกลางโลหะนิกเกิล (II) ที่ฮีสทามีนความเข้มข้นต่าง ๆ

2.1 การศึกษาหาปริมาตรที่เหมาะสมของอนุภาคนาโนทอง

ตาราง ข.4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	ปริมาตตรของอนุภาคนาโนทอง				
	250 μL	500 μL	750 μL	1000 μL	1250 μL
0	0.1128	0.2163	0.3323	0.4907	0.7213
100	0.1146	0.2302	0.3337	0.5208	0.6996
500	0.1161	0.2339	0.3491	0.5405	0.7157
1000	0.1217	0.2405	0.3596	0.5687	0.7177
2000	0.1255	0.2557	0.3821	0.5991	0.7173
3000	0.1277	0.2697	0.3891	0.6147	0.7365
4000	0.1374	0.2731	0.4104	0.5988	0.7389

ตาราง ข.4.2 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	ปริมาตตรของอนุภาคนาโนทอง				
	250 μL	500 μL	750 μL	1000 μL	1250 μL
0	1654.27	2588.28	2501.53	2692.31	1420.05
100	1661.14	2497.09	2459.31	-	1470.76
500	1641.15	2444.67	2350.69	2503.04	1534.90
1000	1582.29	2269.48	2154.91	2294.78	1515.70
2000	1418.57	2145.82	2005.36	2140.09	1519.39
3000	1213.28	1874.13	1827.87	2002.06	1501.25
4000	1063.26	1753.83	1599.19	1874.62	1490.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การศึกษาประเภทไอออนของโลหะทรานซิชันที่เหมาะสม

ตาราง ข.5.1 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ประเภทโลหะทรานซิสชัน	I520
With out adding any metal	1668.72
Ag (II)	1650.08
Ca (II)	1744.07
Cd (II)	1579.20
Mg (II)	1801.30
Ni (II)	847.30
Zn (II)	1960.86

2.3 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ นิกเกิล (II) คลอไรด์

ตาราง ข.6.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	ความเข้มข้นของนิกเกิล (II) คลอไรด์				
	200 μM	400 μM	600 μM	800 μM	1000 μM
0	0.3267	0.3311	0.3494	0.3534	0.3504
100	0.3291	0.3250	0.3547	0.3581	0.3618
500	0.3256	0.3411	0.3648	0.3722	0.3762
1000	0.3506	0.3600	0.3685	0.3798	0.3856
2000	0.3806	0.3854	0.3971	0.3929	0.4079
3000	0.3988	0.3942	0.4095	0.4095	0.4207
4000	0.4199	0.4067	0.4271	0.4179	0.4340

ตาราง ข.6.2 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	ความเข้มข้นของนิกเกิล (II) คลอไรด์				
	200 μM	400 μM	600 μM	800 μM	1000 μM
0	3291.08	2737.93	2580.64	2186.04	2049.62
100	3286.92	2741.65	2514.74	2183.60	2050.16
500	3240.26	2671.93	2466.03	2184.74	2034.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	ความเข้มข้นของนิกเกิล (II) คลอไรด์				
	200 μM	400 μM	600 μM	800 μM	1000 μM
1000	3104.10	2607.62	2403.94	2159.68	1995.11
2000	3039.20	2530.76	2260.78	2059.76	1903.55
3000	2866.98	2420.82	2083.46	1864.49	1713.64
4000	2760.38	2191.06	1904.31	1723.78	1538.31

2.4 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด

ตาราง ข.7.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	pH ของสารละลายบัฟเฟอร์			
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
0	0.3197	0.3859	0.4614	0.4675
100	0.3255	0.3808	0.4417	0.4549
500	0.3382	0.3981	0.4490	0.4531
1000	0.3462	0.4159	0.4491	0.4359
2000	0.3621	0.4329	0.4509	0.4439
3000	0.3757	0.4470	0.4585	0.4515
4000	0.3929	0.4603	0.4642	0.4512

ตาราง ข.7.2 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	pH ของสารละลายบัฟเฟอร์			
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
0	2616.56	1314.85	861.95	894.17
100	2508.89	1835.01	888.49	930.82
500	2430.14	1337.72	896.76	941.67
1000	2334.92	1278.58	919.32	960.37
2000	2206.99	1139.48	934.31	960.35
3000	2019.36	1076.87	949.07	972.97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	pH ของสารละลายบัฟเฟอร์			
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
4000	1808.78	1041.71	949.21	975.96

2.5 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์

ตาราง ข.8.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ (mM)		
	5	10	15
0	0.2629	0.2420	0.2287
100	0.2657	0.2487	0.2350
500	0.2786	0.2578	0.2446
1000	0.2875	0.2641	0.2517
2000	0.3038	0.2784	0.2648
3000	0.3135	0.2938	0.2725
4000	0.3241	0.3060	0.2833

ตาราง ข.8.2 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (μM)	ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ (mM)		
	5	10	15
0	2192.57	2291.05	2171.02
100	2152.97	2223.60	2113.82
500	2078.09	2115.66	2044.25
1000	1935.95	2002.53	1933.72
2000	1784.57	1803.81	1835.96
3000	1559.13	1628.58	1704.76
4000	1320.01	1407.73	1597.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การศึกษาลำดับในการตรวจวัดฮีสทามีน

ตาราง ข.9.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ลำดับในการตรวจวัด	ความเข้มข้นของฮีสทามีน			
	0 µM	100 µM	500 µM	1000 µM
AuNPs-Ni(II)-Buffer-His	0.2172	0.2170	0.2169	0.2296
AuNPs-Ni(II)-His-Buffer	0.2184	0.2237	0.2315	0.2390

ตาราง ข.9.2 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ลำดับในการตรวจวัด	ความเข้มข้นของฮีสทามีน			
	0 µM	100 µM	500 µM	1000 µM
AuNPs-Ni(II)-Buffer-His	2351.23	2341.42	2336.01	2314.93
AuNPs-Ni(II)-His-Buffer	2355.83	2285.16	2215.79	2137.39

2.7 การศึกษาเวลาในการตรวจวัดฮีสทามีน

ตาราง ข.10.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

เวลาในการตรวจวัด (นาที)	ความเข้มข้นของฮีสทามีน			
	10 µM	500 µM	2000 µM	4000 µM
3	0.3301	0.3463	0.3767	0.4206
5	0.3283	0.3424	0.3723	0.4189
7	0.3271	0.3406	0.3704	0.4169
10	0.3259	0.3389	0.3698	0.4160
15	0.3246	0.3346	0.3667	0.4115
20	0.3235	0.3338	0.3650	0.4108

ตาราง ข.10.2 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

เวลาในการตรวจวัด (นาที)	ความเข้มข้นของฮีสทามีน			
	10 µM	500 µM	2000 µM	4000 µM
3	2377.51	2297.83	2145.74	1790.41
5	2357.58	2285.16	2130.52	1775.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลาในการตรวจวัด (นาที)	ความเข้มข้นของฮีสทามีน			
	10 µM	500 µM	2000 µM	4000 µM
7	2349.84	2270.04	2114.18	1762.23
10	2334.19	2246.82	2098.42	1749.87
15	2322.06	2228.39	2078.20	1746.36
20	2302.65	2209.12	2050.05	1728.29

3. การศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์

3.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทอง

ตาราง ข.11.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (µM)	A535
0	0.3489
100	0.3555
250	0.3621
500	0.3700
1000	0.3828
2000	0.4062
3000	0.4292
4000	0.4491
5000	0.4741

ตาราง ข.11.2 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (µM)	I520
0	2163.55
10	2144.66
100	2116.01
250	2091.05
500	2052.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (µM)	I520
1000	1992.57
2000	1906.12
3000	1826.67
4000	1741.92
5000	1634.68
7000	1490.48
9000	1295.97
10000	1188.17

3.2 การศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ในการตรวจวัดฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทอง

ตาราง ข.12.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (µM)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)
500	0.3007	0.0032	1.07
2000	0.3146	0.0025	0.81
4000	0.3341	0.0030	0.89

ตาราง ข.12.2 แสดงค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทอง

ความเข้มข้นของฮีสทามีน (µM)	ค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตร	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)
500	2386.4175	7.5267	0.32
2000	2327.8763	18.7266	0.80
4000	2035.6629	13.1719	0.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาผลของสารละลายที่อาจรบกวนในการตรวจวัดฮีสทามีนด้วยอนุภาคนาโนทอง

ตาราง ข.13 กราฟแสดงผลของสารละลายที่อาจรบกวนการตรวจวัด

สารตัวรบกวน	A535	I520
Blank	0.3278	2306.52
Histamine	0.3906	964.15
Acetaldehyde	0.3262	2251.50
L-cysteine	0.3310	2264.78
Iso-Leusine	0.3266	2296.20
Lysine	0.3310	2279.52
Methanol	0.3328	2271.52
Phenylalanine	0.3317	2287.02
Serine	0.3265	2222.82
Threonine	0.3292	2267.00
Valine	0.3325	2200.27
Y-Aminobutyric acid	0.3288	2226.35
Mg (II)	0.3267	2229.06
Na (I)	0.3255	2199.52
Zn (II)	0.3318	2069.78
Ca (II)	0.3292	2114.96
K (I)	0.3252	2203.71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

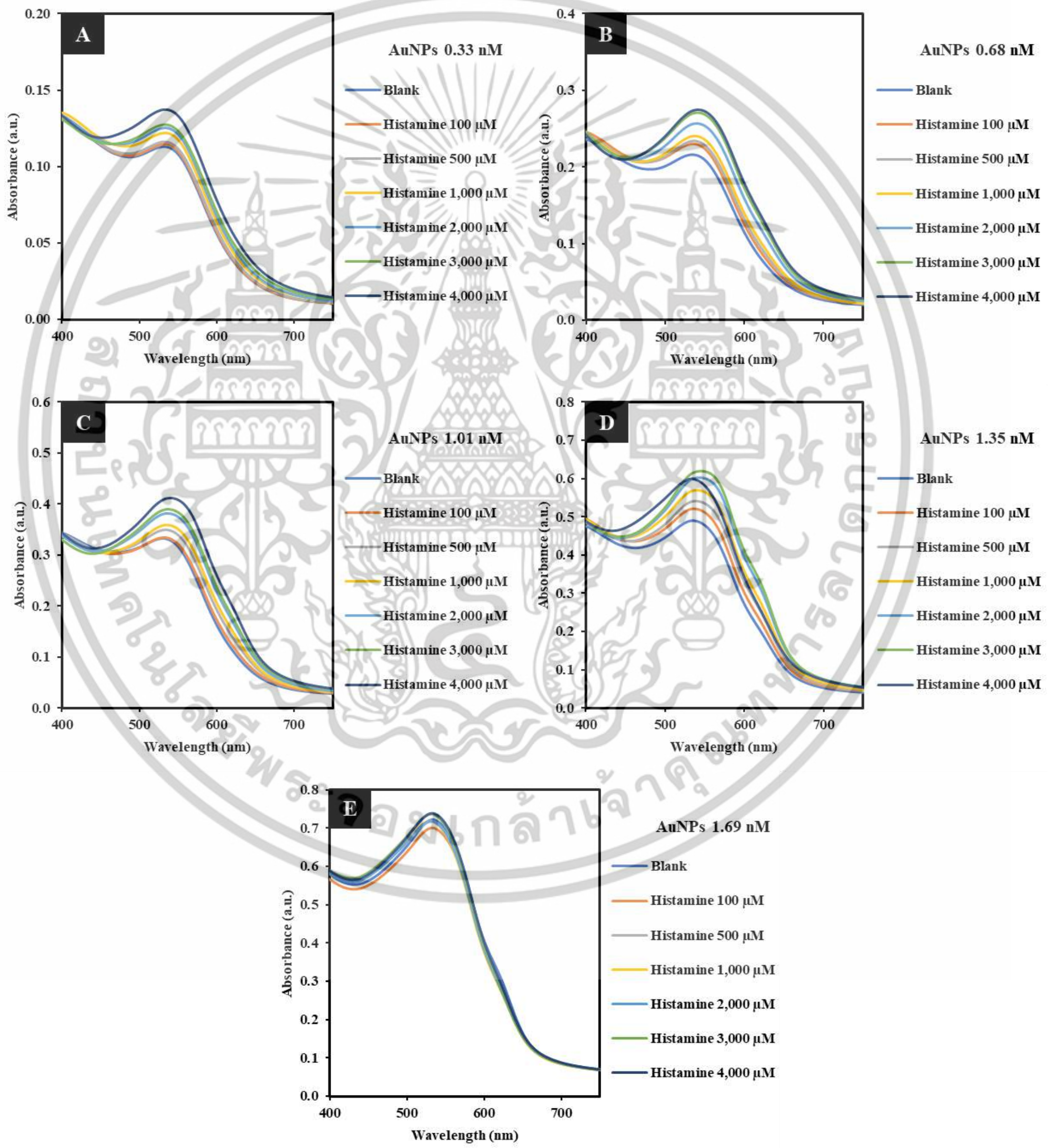
ภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
สเปกตรัมผลการทดลองในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีน

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดฮีสทามีนด้วย Au^0-NPs_{ALz}

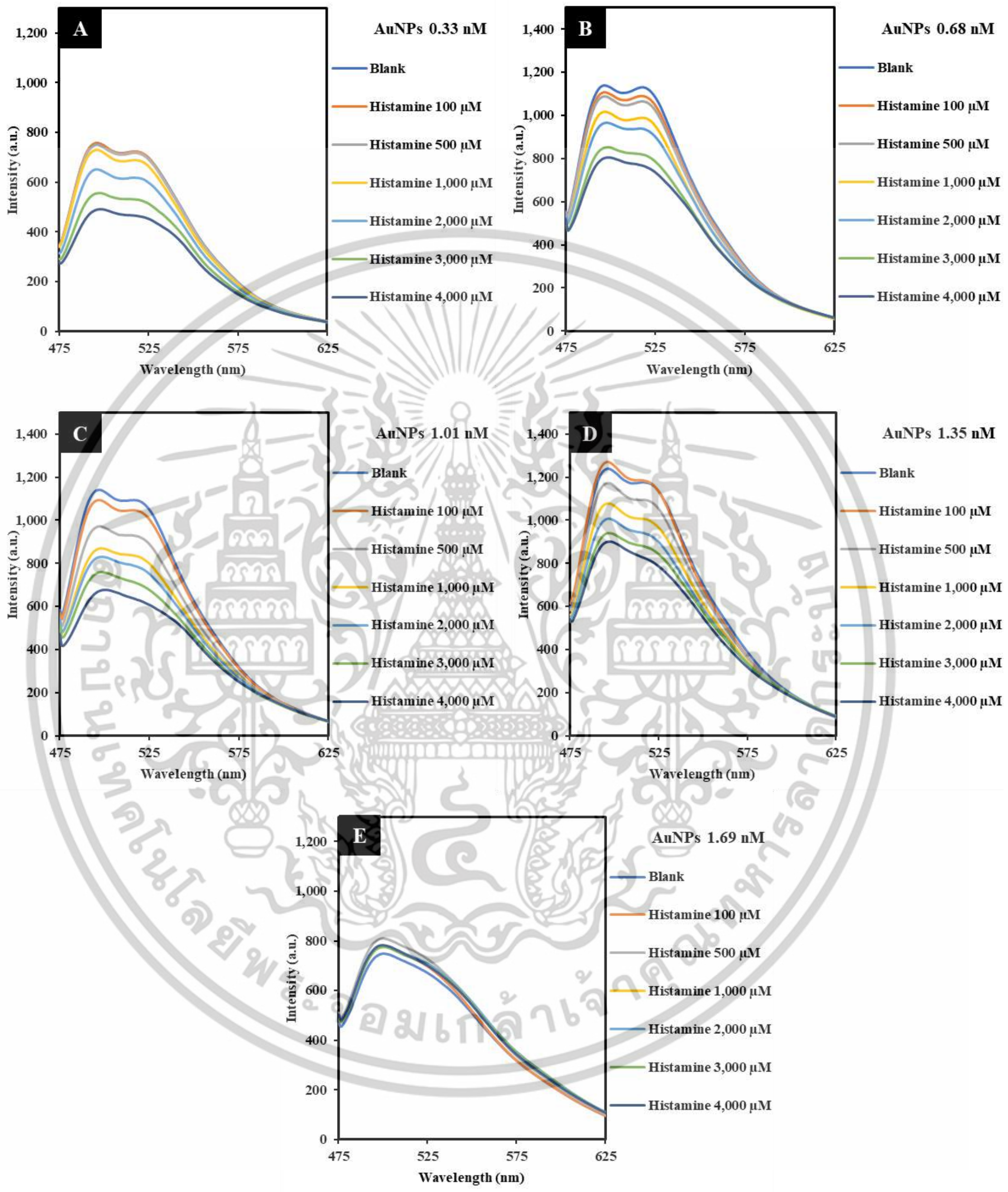
1.1.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ในการศึกษาความเข้มข้นของอนุภาคที่ใช้ในการตรวจวัด



รูปที่ ค.1 A. 0.33 nM B. 0.68 nM C. 1.01 nM D. 1.35 nM และ E. 1.69 nM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

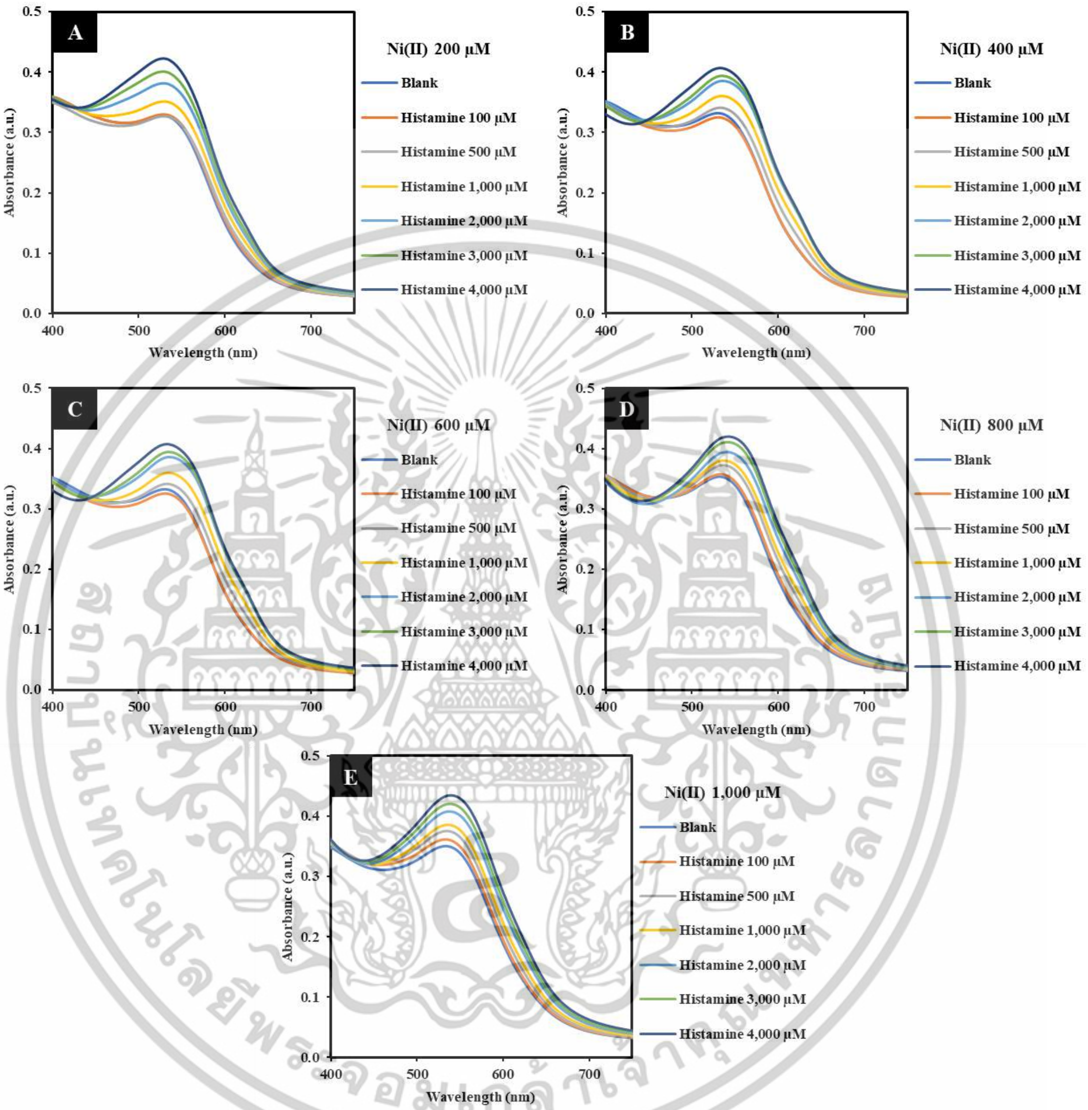
1.1.2 สเปกตรัมการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ในการศึกษาความเข้มข้นของอนุภาคที่ใช้ในการตรวจวัด



รูปที่ ค.2 A. 0.33 nM B. 0.68 nM C. 1.01 nM D. 1.35 nM และ E. 1.69 nM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

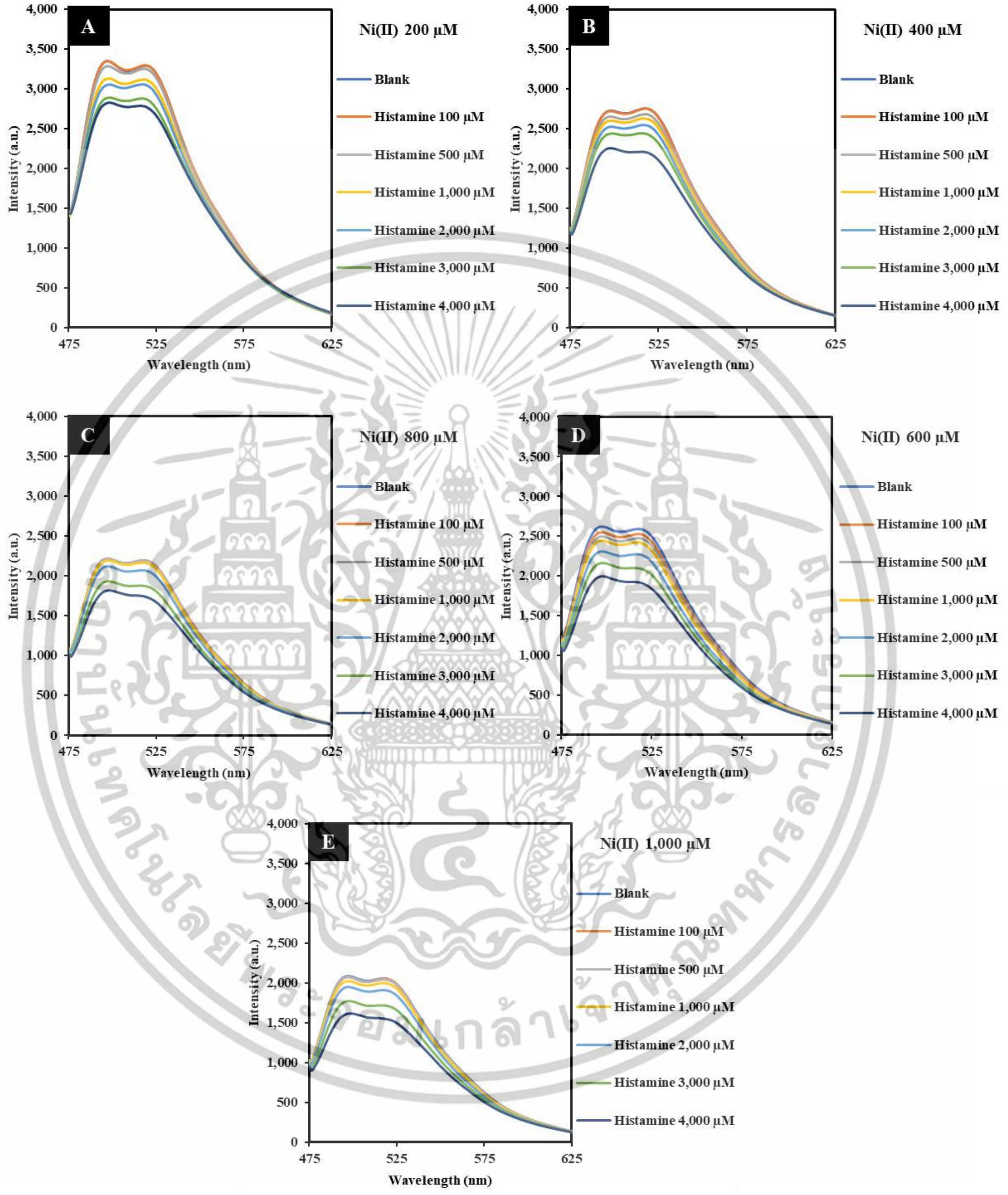
1.2.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ในการศึกษาความเข้มข้นของ นิกเกิล (II) คลอไรด์ที่ใช้ในการตรวจวัด



รูปที่ ค.3 A. 200 μmol L^{-1} B. 400 μmol L^{-1} C. 600 μmol L^{-1} D. 800 μmol L^{-1} และ E. 1000 μmol L^{-1}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

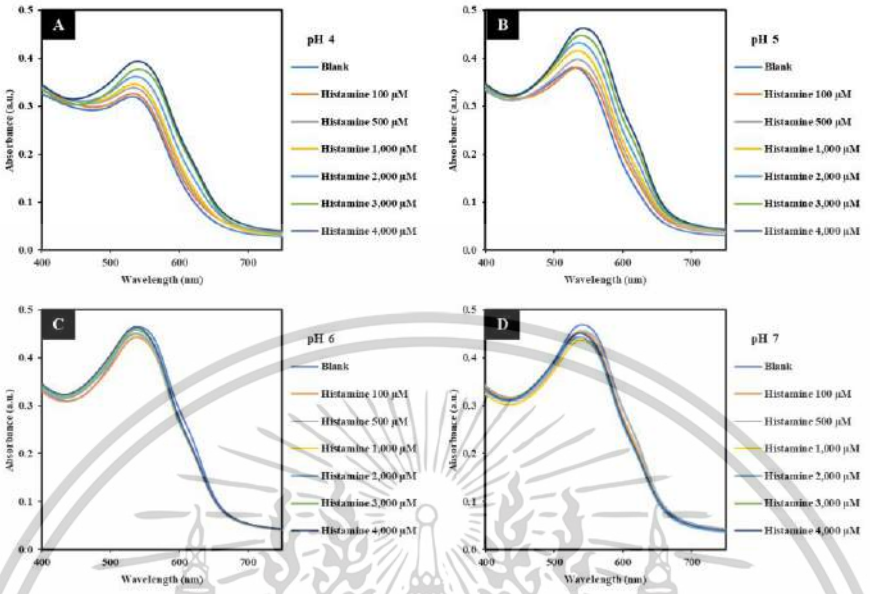
1.2.2 สเปกตรัมการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ในการศึกษาความเข้มข้นของ นิกเกิล (II) คลอไรด์ที่ใช้ในการตรวจวัด



รูปที่ ค.4 A. 200 µmol L^{-1} B. 400 µmol L^{-1} C. 600 µmol L^{-1} D. 800 µmol L^{-1} และ E. 1000 µmol L^{-1}

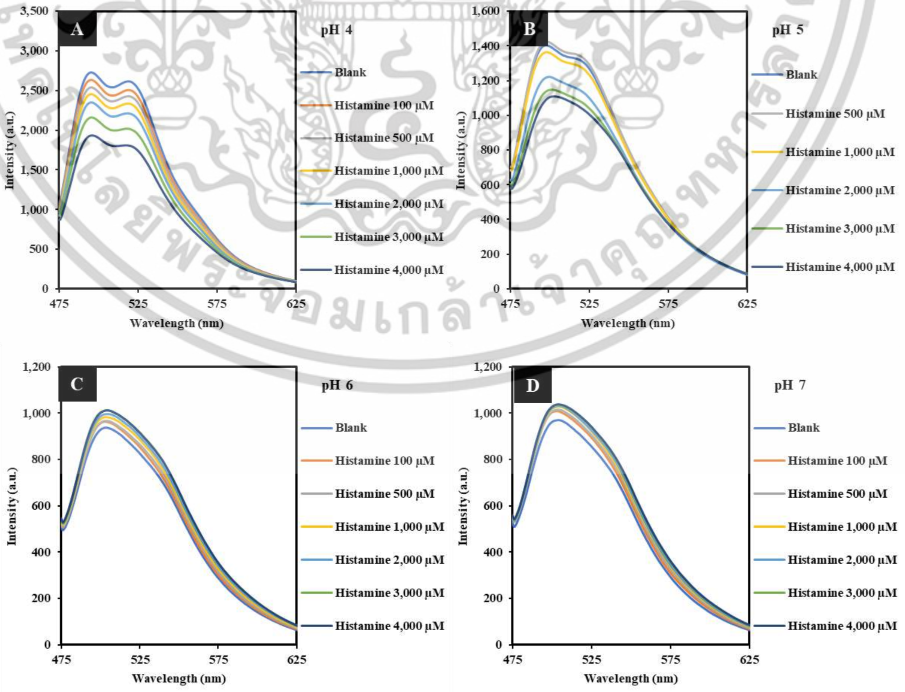
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^{0}-NPs_{ALz} ในการศึกษาพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจวัด



รูปที่ ค.5 A. pH 4 B. pH 5 C. pH 6 และ E. pH 7

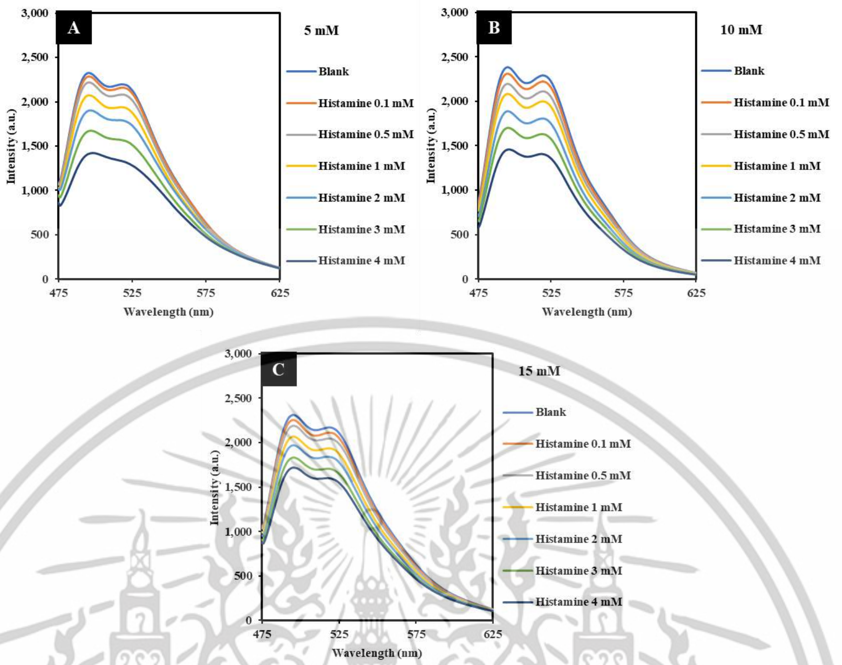
1.3.2 สเปกตรัมการเรืองแสงของ Au^{0}-NPs_{ALz} ในการศึกษาพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจวัด



รูปที่ ค.6 A. pH 4 B. pH 5 C. pH 6 และ E. pH 7

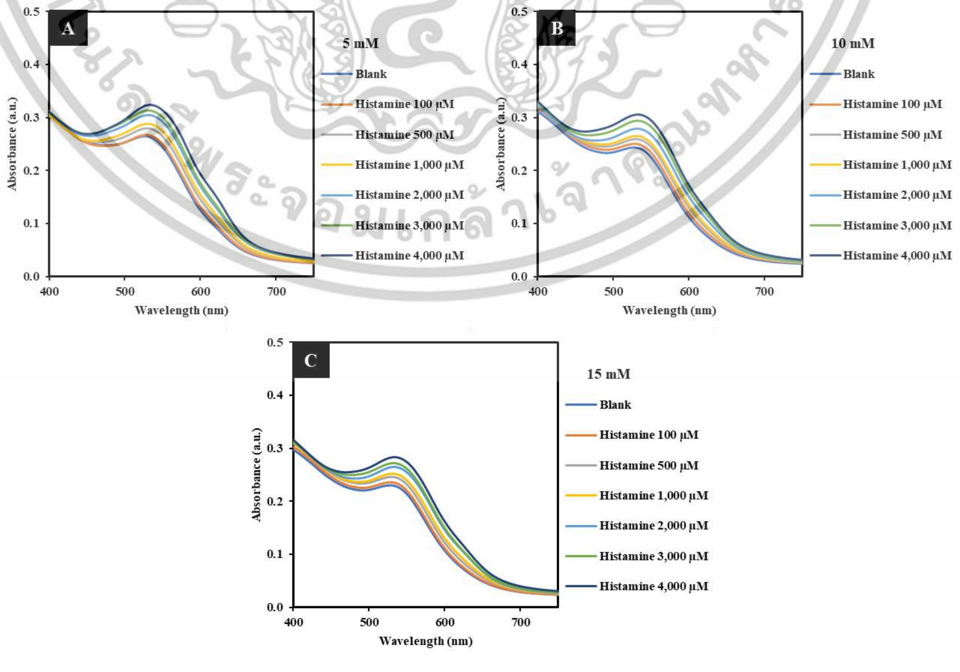
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ในการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจวัด



รูปที่ ค.7 A. 5 mmol L^{-1} B. 10 mmol L^{-1} และ C. 15 mmol L^{-1}

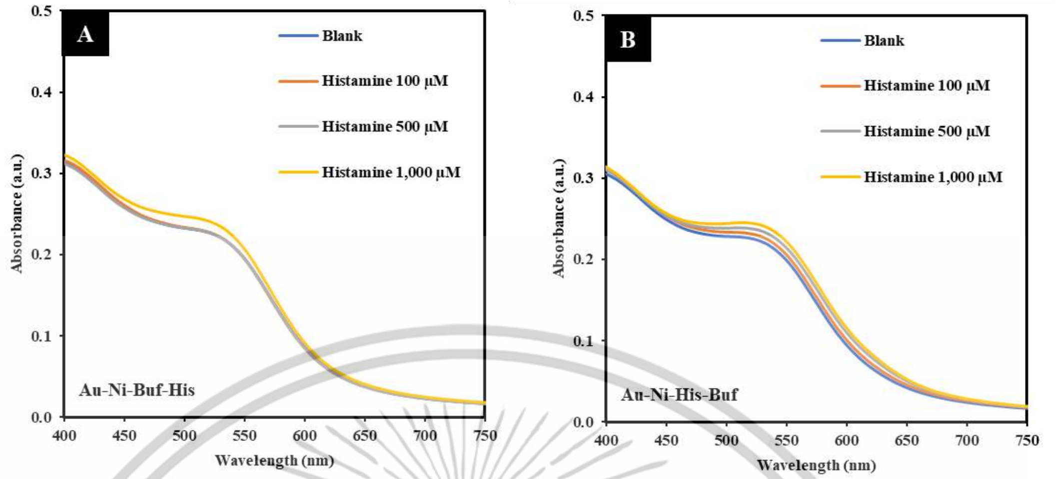
1.4.2 สเปกตรัมการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ในการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจวัด



รูปที่ ค.8 A. 5 mmol L^{-1} B. 10 mmol L^{-1} และ C. 15 mmol L^{-1}

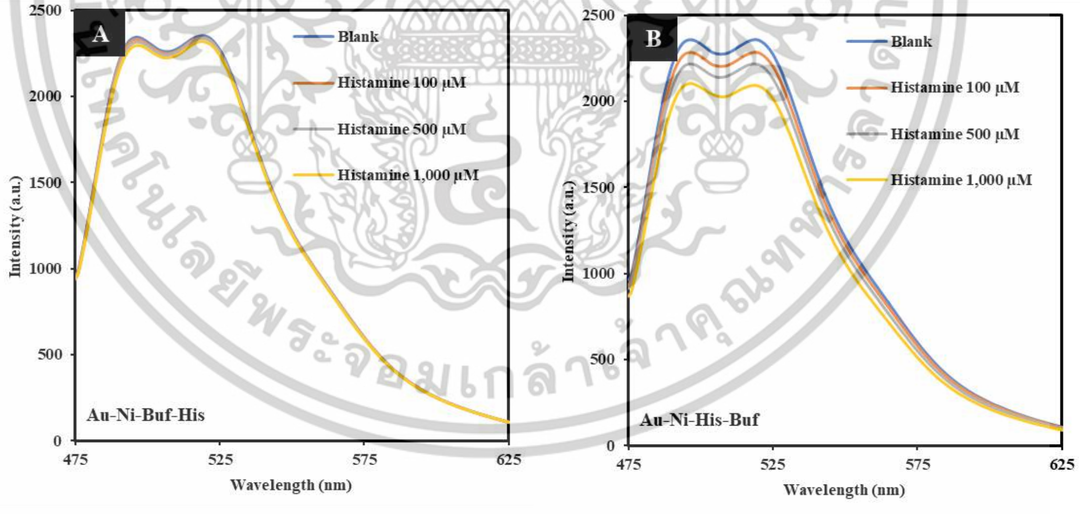
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^{0}-NPs$_{ALz}$ ในการศึกษาลำดับในการตรวจวัดฮีสทามีน



รูปที่ ค.9 A. (i) Au^{0}-NPs$_{ALz}$, (ii) Ni (II), (iii) บัฟเฟอร์, (iv) ฮีสทามีน และ B. (i) Au^{0}-NPs$_{ALz}$, (ii) Ni (II), (iii) ฮีสทามีน, (iv) บัฟเฟอร์

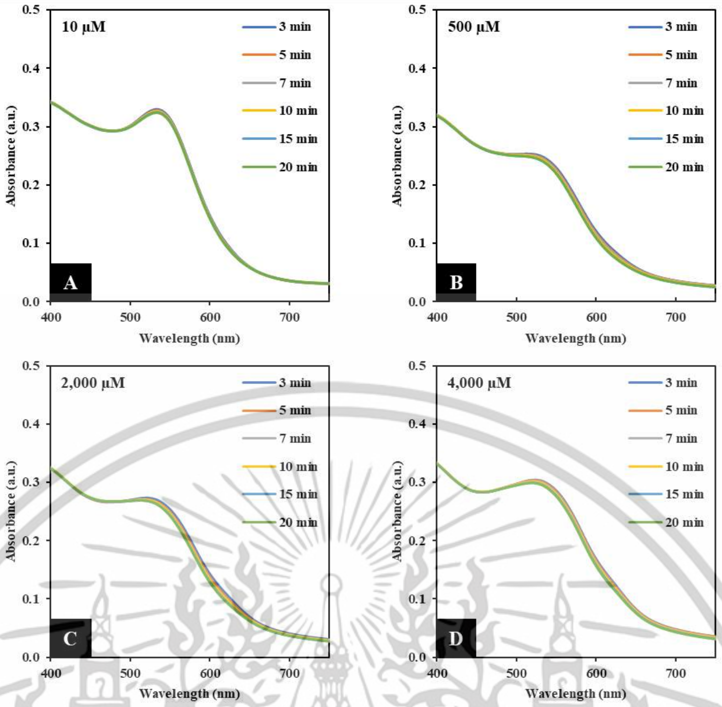
1.5.2 สเปกตรัมการเรืองแสงของ Au^{0}-NPs$_{ALz}$ ในการศึกษาลำดับในการตรวจวัดฮีสทามีน



รูปที่ ค.10 A. (i) Au^{0}-NPs$_{ALz}$, (ii) Ni (II), (iii) บัฟเฟอร์, (iv) ฮีสทามีน และ B. (i) Au^{0}-NPs$_{ALz}$, (ii) Ni (II), (iii) ฮีสทามีน, (iv) บัฟเฟอร์

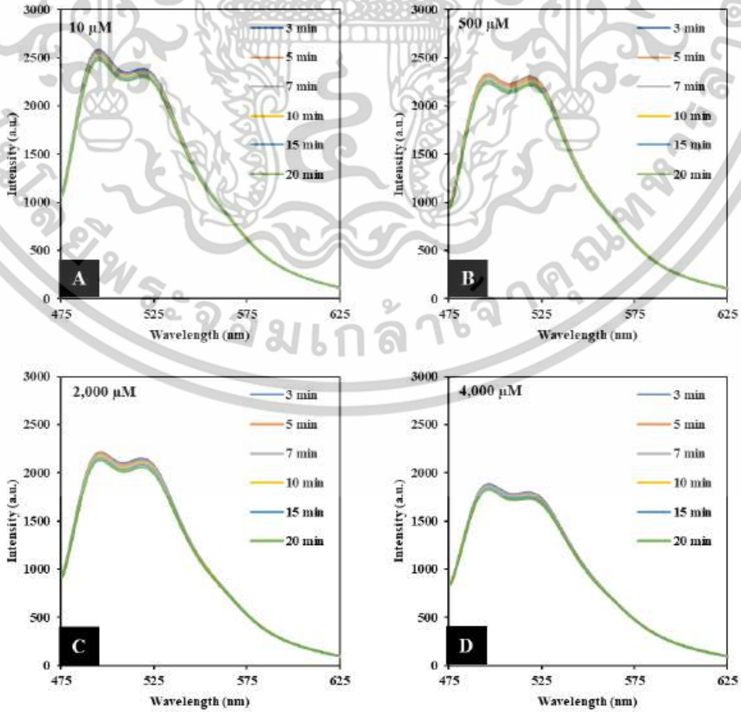
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ในการศึกษาเวลาในการตรวจวัดฮีสทามีน



รูปที่ ค.11 A. 10 µmol L^{-1} B. 500 µmol L^{-1} C. 2000 µmol L^{-1} และ D. 4000 µmol L^{-1}

1.6.2 สเปกตรัมการเรืองแสงของ Au^0-NPs_{ALz} ในการศึกษาเวลาในการตรวจวัดฮีสทามีน

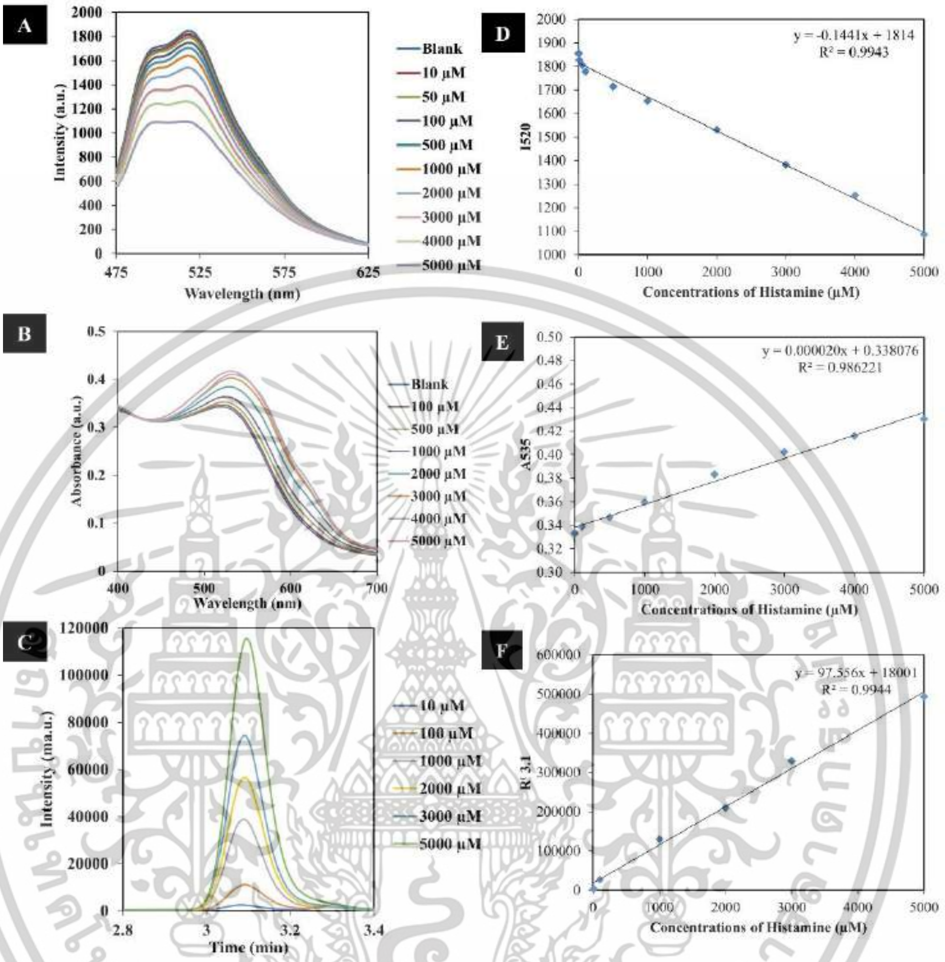


รูปที่ ค.12 A. 10 µmol L^{-1} B. 500 µmol L^{-1} C. 2000 µmol L^{-1} และ D. 4000 µmol L^{-1}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล

2.1 สร้างกราฟมาตรฐานด้วยเซนเซอร์ที่ได้พัฒนาขึ้นเทียบวิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีนด้วย HPLC



รูปที่ ค.13 A. สเปกตรัมการเรืองแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทอง ในการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานฮีสทามีน

B. สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทอง ในการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานฮีสทามีน

C. โครมาโตแกรมในการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานฮีสทามีน

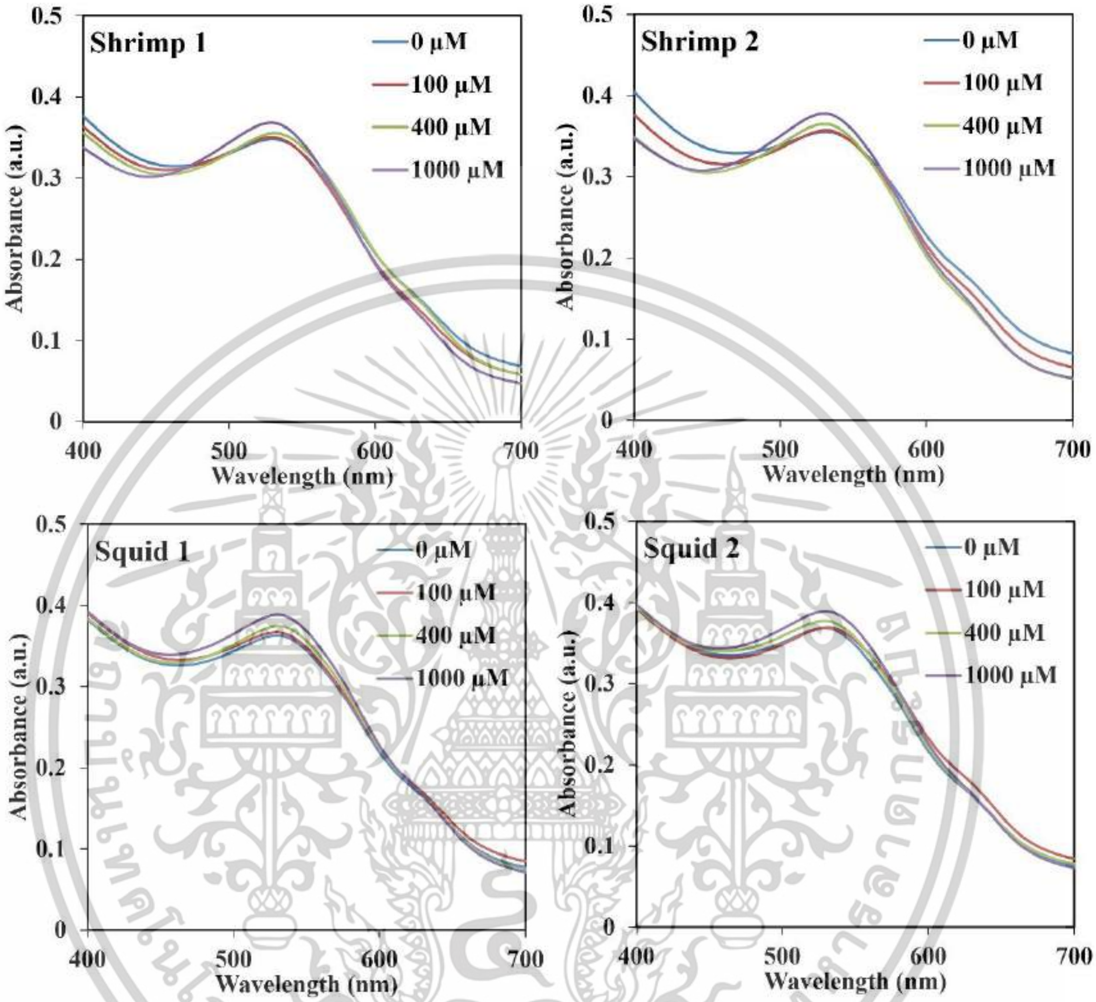
D. กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนและค่าการเรืองแสงที่ 520 นาโนเมตร

E. กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร

F. กราฟเส้นตรงพลอตระหว่างความเข้มข้นของฮีสทามีนและค่าการดูดแสงของสารละลายนาทีที่ 3.1 นาที

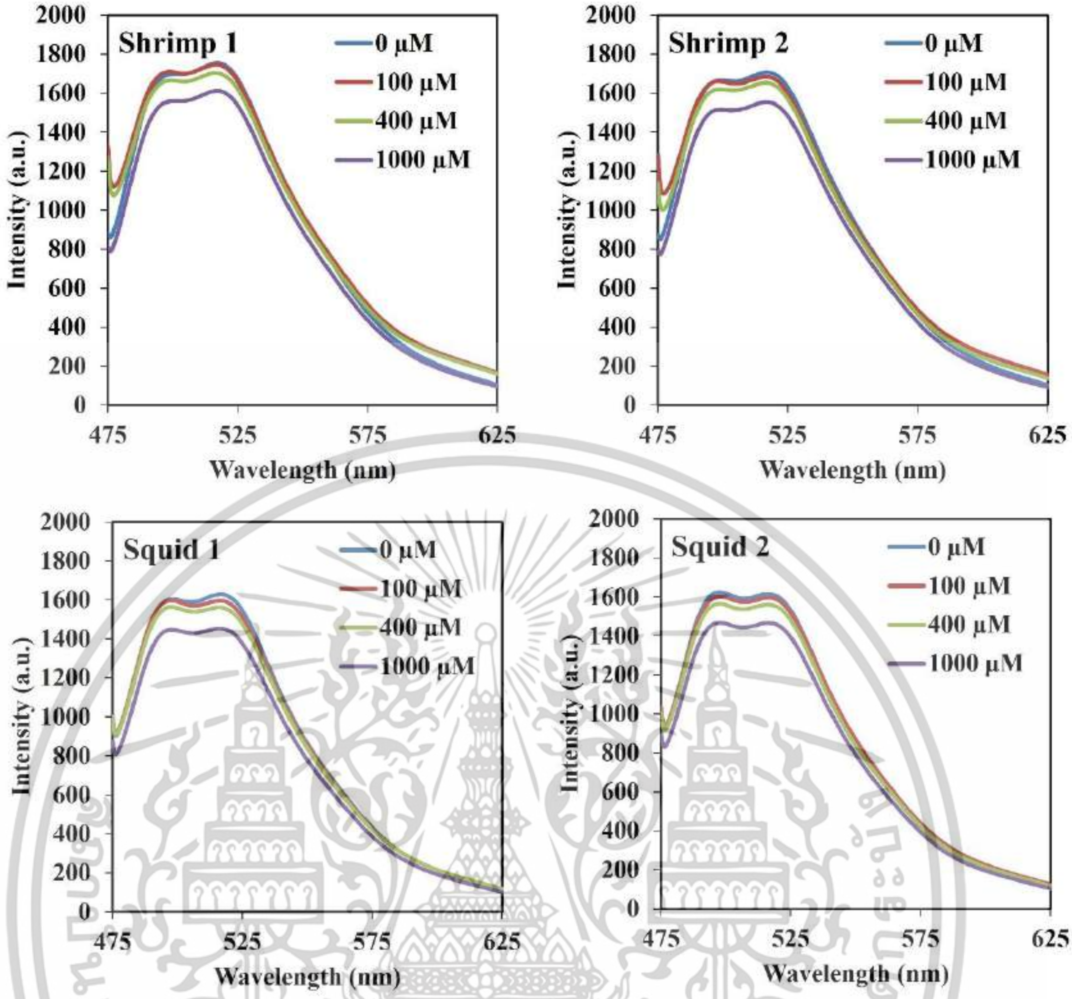
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สเปกตรัมการตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเลด้วยเซนเซอร์ที่ได้พัฒนาขึ้นเทียบวิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ฮีสทามีนด้วย HPLC



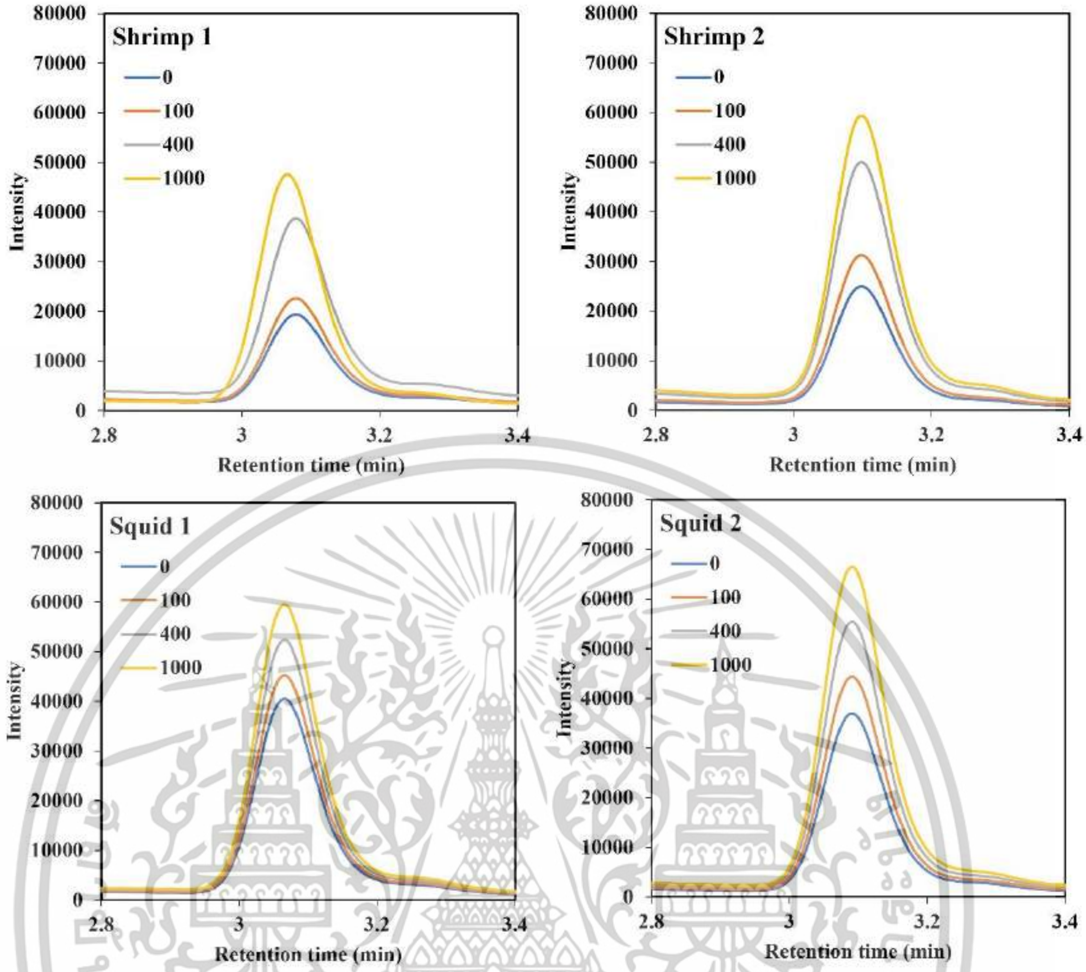
รูปที่ ค.14 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทอง ในการตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล (กุ้ง และ หมึก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.15 สเปกตรัมการเรืองแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทอง ในการตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล (กุ้ง และ หมึก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.16 โครมาโตแกรมในการตรวจวัดฮีสทามีนในตัวอย่างอาหารทะเล (กุ้ง และ หมึก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Talanta 280 (2024) 126703

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Ultrasonic-driven chemical reduction synthesis of alizarin complexone-modified gold nanoparticles for dual-signal colorimetric and fluorometric sensing of histamine in seafood products

Ampika Phoungsiri [a], Natee Lerdpiriyaskulkij [a], Arjnarong Mathaweesansurn [a,b], Ekarat Detsri [a,c,*]

[a] Department of Chemistry, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand
[b] Applied Analytical Chemistry Research Unit, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand
[c] Integrated Applied Chemistry Research Unit, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Ultrasonic irradiation
Gold nanoparticles
Alizarin complexone
Colorimetric and fluorometric approaches
Histamine
Seafood products

ABSTRACT

Alizarin complexone-modified gold nanoparticles (Au^0-NPs_{ALz}) were synthesized using a proposed ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction method. Ultrasonic irradiation powers, reaction time and alizarin complexone concentration had been proven to be the main parameters for controlling the nucleation and growth of Au^0-NPs_{ALz}. In the synthesized ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction conditions, Au^0-NPs_{ALz} had a spherical oriented morphology with a uniform size of 17.84 ± 1.37 nm and are shiny red with a surface plasmon resonance (SPR) of 535 nm. A rapid colorimetric and fluorometric dual-mode detection strategy for selective detection of histamine in seafood was developed based on the self-assembly of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes. Ni (II) can capture the histamine molecules close to Au^0-NPs_{ALz} surfaces, making changes in the colorimetric and fluorometric responses of the solution. The quantitative analysis of histamine was realized through the variation of dual-signal colorimetric and fluorometric responses. Such Au^0-NPs_{ALz} sensor offered good detection sensitivity for histamine with a detection limit (LOD) of 59.32 μmol L^{-1} and 116.20 μmol L^{-1} and wide linear response within the range of 10–10000 μmol L^{-1} (R^2 = 0.9952) and 100–5000 μmol L^{-1} (R^2 = 0.9947) for colorimetric and fluorometric measurement, respectively. Recoveries ranging from 94.99 to 103.29 % and 97.67–106.88 % for colorimetric and fluorometric assay were obtained, showing low levels of matrix effects. Particularly, the results of the dual-mode sensor were also validated by comparing with the HPLC method for improving the assay accuracy and dependability. Ultimately, the developed Au^0-NPs_{ALz} colorimetric and fluorometric probe performs excellently in practical applications, with promising results for detecting histamine in seafood products.

1. Introduction

Histamine ($C_5H_9N_3$) is a naturally toxic metabolite biogenic amine compound that is widely used to estimate spoilage indicator criteria of seafood products. Histamine is produced in the tissue of saltwater fish, shrimp, and shellfish through the decarboxylation of free histidine ($C_6H_9N_3O_2$) by exogenous decarboxylases released by microorganisms. The country-by-country regulations for maximum tolerable levels of histamine in seafood products are 50 mg kg^{-1} [1] and with histamine levels over 200 mg kg^{-1} are usually causing toxicity to health [1,2]. Continuous consumption of seafood products containing histamine results in intoxication, food poisoning, and illnesses that include rashes, nausea, vomiting, diarrhea, and allergic reactions [3]. Consequently, evaluating histamine concentration with high sensitivity and selectivity in seafood products is sorely required for both clinical diagnosis and food quality control. Several alternative methodologies have been proposed for measuring the content of histamine including high-performance liquid chromatography (HPLC) [4–6], gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) [7,8], and capillary electrophoresis (CE) [9]. Even though some of these instruments can

* Corresponding author. Department of Chemistry and Integrated Applied Chemistry Research Unit, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand.

E-mail addresses: 65056098@kmitl.ac.th (A. Phoungsiri), 64605054@kmitl.ac.th (N. Lerdpiriyaskulkij), Arjnarong.ma@kmitl.ac.th (A. Mathaweesansurn), Ekarat.de@kmitl.ac.th (E. Detsri).

https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126703
Received 20 June 2024; Received in revised form 3 August 2024; Accepted 11 August 2024
Available online 12 August 2024
0039-9140/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

detect histamine with high sensitivity and accuracy. However, these instrumental methods generally require laborious, complicated sample pretreatment, and are expensive. Therefore, developing a simple, short analysis time, inexpensive, appreciable sensitivity and selectivity, and good reproducibility sensor for histamine detection is still desirable.

In the last few years, a variety of plasmonic sensing-based colorimetric and fluorometric systems have been developed for evaluating the spoilage of seafood products [10–13]. Gold nanoparticles (AuNPs) have been known to exhibit unique plasmonic responses to various external stimuli. The localized surface plasmon resonance (LSPR) property of AuNPs is widely exploited for chemical and biological sensing. The position and intensity of the LSPR wavelength peak are dependent on various factors such as environmental conditions (dielectric surrounding of the medium), the shape and size of AuNPs. This feature has been used in the development of various plasmonic sensing [14–16]. To maximize the potential of AuNPs, researchers have investigated various strategies for controlling/fine-tuning their plasmonic-responsive properties. An approach involving ligand surface modification of AuNP moieties has been widely employed. The ligand-functionalized AuNPs can be chemically modified to provide specific interactions with desired analytes, resulting in high selectivity and sensitivity of plasmonic sensors. For instance, histamine level can be determined by AuNPs functionalized with polyethylene glycol ligand [17]. The detection probe was established from the as-prepared AuNPs and dopamine ($C_8H_{11}NO_2$). The histamine molecules interacted strongly with dopamine through a polymerization reaction resulting in a formation of the polydopamine layer on the surface of AuNPs. The color of AuNPs were changed from red wine to black among the histamine concentration of 1–100 μg mL^{-1} with the limit of detection (LOD) 2.8 μg mL^{-1}. Furthermore, 1, 4-dithioerytritol was used to modify the surfaces of AuNPs [18]. A fluorometric detection for estimating histamine content in food samples was prepared with the incorporation of *o*-phthalaldehyde (OPA) on AuNPs surfaces. The observed fluorescence arises from 1-alkylthio-2-alkyl-isoindole formation on 1,4-dithioerytritol functionalized AuNPs with OPA and histamine. The LOD was found to be 4.20 nmol L^{-1}. Other reported ligand-functionalized AuNPs have been extensively researched and utilized for their potent plasmonic sensing [19–23]. As mentioned above, the cross-linking between ligand moieties and AuNPs results in enhanced colorimetric and fluorometric responses to histamine. However, these approaches merely utilized single fluorescence or absorbance as the detection signal, which are easily influenced by anthropogenic factors or the surrounding environment, resulting in inaccurate detection results. To boost the accuracy of the detection, dual-signal sensors that combine colorimetric and fluorometric methods can largely eliminate anthropic errors, making the sensors have high anti-interference ability, extending the detection linear range, enhanced accuracy and reliability, excellent visualization, and increasing application flexibility. To our knowledge, based on a comprehensive review of the literature, there are no applications of AuNPs in direct dual-signal mode of colorimetric and fluorometric for histamine assay.

This study reported a novel dual-signal responsive sensor for histamine detection in seafood products using alizarin complexone-modified AuNPs (Au^0-NPs_{ALz}) as dual-signal materials. Au^0-NPs_{ALz} was synthesized by ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction method. Combined chemical reduction and ultrasonic irradiation had been shown to be very attractive in accelerating chemical reduction reactions in AuNPs synthesis. Specifically, Ni (II) ions were covalently coordinated with alizarin complexone, resulting in the final Au^0-NPs_{ALz} -Ni (II) complexes sensor being selective to histamine. The prepared Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes sensor not only exhibited excellent color change by histamine, the fluorescence signal of the Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes sensor was also preferentially quenched. The correspondence between the variations in dual-signal colorimetric and fluorometric sensors of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes sensor can realize convenient quantitative detection of histamine. Both detection modes provided high sensitivity, accuracy, precision, wide detection range, and high degree of visualization. Furthermore, the developed dual-mode assay was successfully applied to the determination of histamine in various seafood samples.

2. Experimental

2.1. Reagents and instruments

Analytical reagent grade (AR grade) of alizarin complexone ($C_{19}H_{15}NO_8$), gold (III) chloride trihydrate ($HAuCl_4{\cdot}3H_2O$), histamine ($C_5H_9N_3$), nickel (II) chloride ($NiCl_2$), acetaldehyde (CH_3CHO), cysteine ($C_3H_7NO_2S$), leucine ($C_6H_{13}NO_2$), lysine ($C_6H_{14}N_2O_2$), phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$), serine ($C_3H_7NO_3$), threonine ($C_4H_9NO_3$), valine ($C_5H_{11}NO_2$), aminobutyric acid ($C_4H_9NO_2$), and sodium borohydride ($NaBH_4$) were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA, www.sigmaaldrich.com). Acetate buffer (10.0 mmol L^{-1}) at pH 4, 5, 6, and 7 were prepared from acetic acid (CH_3COOH, Carlo Erba, Italy, www.carloerbareagents.com) and sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$, St. Louis, USA, www.sigmaaldrich.com). Ultrapure deionized-distilled water (DI water, Milli–Q® EQ 7000 ultrapure water system) with a resistivity of 18.2 MΩ cm and total organic carbon (TOC) ≤ 5 μg L^{-1} at 25 °C was used throughout the experiments. All glassware utilized in the experiments underwent an overnight immersion in 10 % v/v nitric acid (HNO_3) and were thoroughly rinsed with DI water.

The surface morphologies of Au^0-NPs_{ALz} were studied using a Transmission electron microscope (TEM, JEM–2010 model, JEOL Co., Ltd, Japan). Raman spectroscopy (Spectrum one, Perkin Elemer Co., Ltd, US) was used to characterize the chemical structure of Au^0-NPs_{ALz}. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, AXIS Ultra DLD, Kratos Analytical Co., Ltd., England) was used to confirm the elemental compositions and chemical state of Au^0-NPs_{ALz}. The crystal structure of Au^0-NPs_{ALz} was characterized using X–ray diffractometer (XRD, Rikagu smart lab, Japan) with CuKα radiation source ($\lambda = 0.15406$ nm) in the 2θ range of 30°–90°. UV–visible spectrophotometer (UV–1800, Shimadzu Co., Ltd, Japan, Kyoto, Japan) with deuterium–discharge (D_2) and tungsten (W_2) lamp was used to acquire absorbance spectrum of Au^0-NPs_{ALz} in the wavelength range between 200 and 800 nm. Fluorescent properties of Au^0-NPs_{ALz} were performed using a Spectro fluorophotometer (RF-6000, Shimadzu Co., Ltd, Japan, Kyoto, Japan). The change in fluorescence over time of Au^0-NPs_{ALz} was investigated using lifetime fluorescence spectroscopy (Horiba DeltaFlex™, Horiba scientific Co., Ltd, UK). Surface charges of Au^0-NPs_{ALz} were examined by a Zeta potential analyzer (Zetasizer nano ZS, Malvern Co., Ltd, UK).

2.2. Ultrasonic-assisted chemical reduction synthesis of alizarin complexone-modified gold nanoparticles

Au^0-NPs_{ALz} was prepared by ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction method. Briefly, 600 μmol $L^{-1}$of alizarin complexone (ALz) was mixed with 1 mmol L^{-1} of gold (III) chloride trihydrate in 10 mL of DI water. The mixture solution was further sonicated with a high-power ultrasonicator (VCX 130, Vibra-Cell™, USA) at room temperature for 5 min. Then, 2 mL of 50 mmol L^{-1} $NaBH_4$ was rapidly added to the mixture solution under continuous ultrasonic irradiation for 40 min. After the above reactions, the obtained brighter-red of colloidal Au^0-NPs_{ALz} was stirred for an extra 10 min, then cooled down to room temperature and stored in the dark amber glass bottle at 4 °C for further use. In order to control the synthesis and assembly of uniformly sized and shaped Au^0-NPs_{ALz}, a number of synthesized parameters including ultrasonic irradiation powers ranging from 20 to 40 % amplification, reaction time of 10–60 min, and alizarin complexone concentrations of 200, 400, 600, and 1000 μmol L^{-1}, were investigated. The optical characteristics, size and surface morphology, and stability were evaluated by UV–vis spectrophotometer, fluorescence spectrophotometer, TEM, and zeta potential, respectively.

The concentration of colloidal Au^0-NPs_{ALz} was calculated according

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

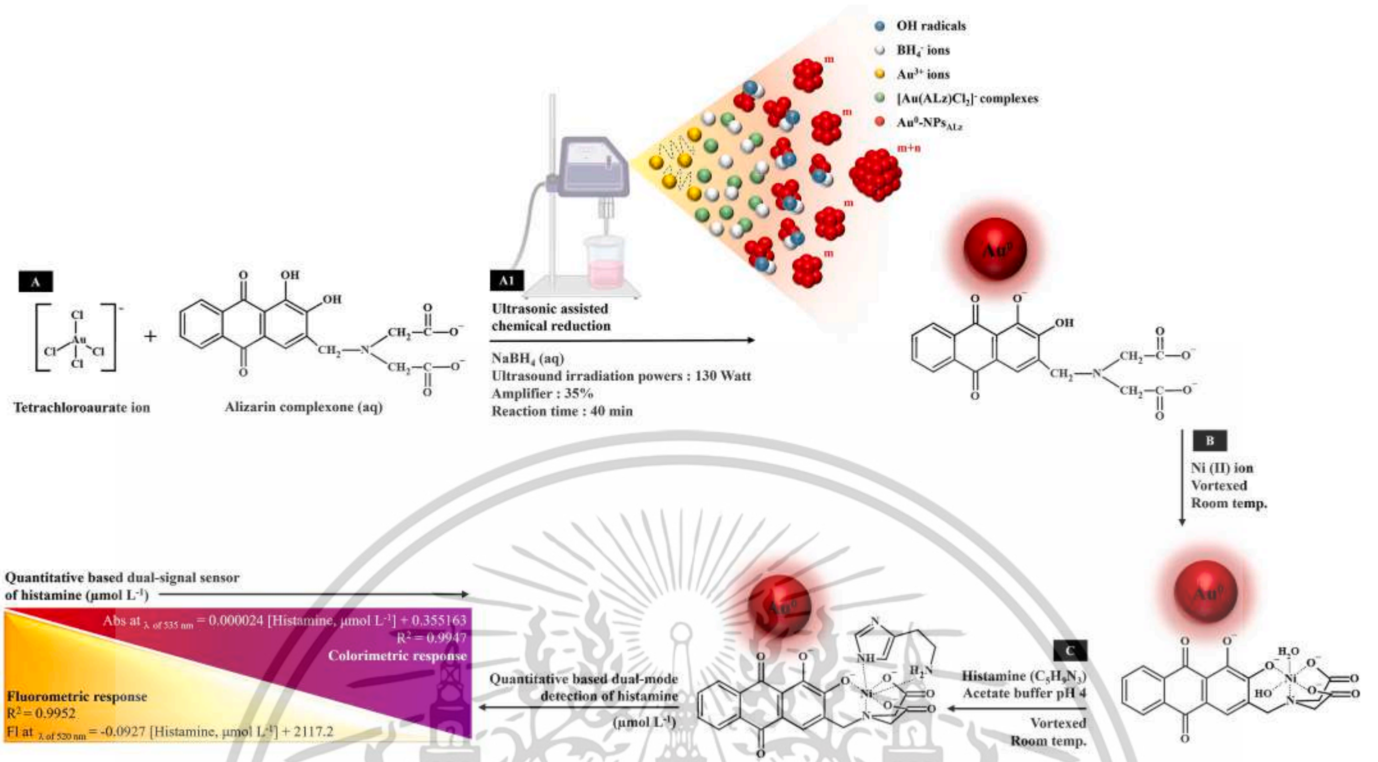


Fig. 1. (A) Schematic illustration of Au^0-NPs_{ALz} formation, (B) coordination complexes of Au^0-NPs_{ALz} with Ni (II), and (C) sensing mechanism for detecting histamine.

to the method described by Wolfgang Haiss et al. [24], By utilizing Beer-Lambert's law ($A = \varepsilon bc$); where A is the absorbance measured by UV–vis spectrophotometer, ε is the molar extinction coefficient (M^{-1} cm^{-1}), b is the path length (cm), and c is the concentration of Au^0-NPs_{ALz} (mol L^{-1}). The concentration of Au^0-NPs_{ALz} was calculated to be 4.7212 ± 0.06 nmol L^{-1}.

2.3. Assay procedure of dual-signal

Au^0-NPs_{ALz} with the dual-signal colorimetric and fluorometric responses, were developed for the determination of histamine by self-assembly of Au^0-NPs_{ALz} with Ni (II). The specific coordination of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes can capture the histamine molecules close to Au^0-NPs_{ALz} surfaces, making changes in the colorimetric and fluorometric response of the solution. The process of Ni (II) assembling onto Au^0-NPs_{ALz} surfaces and dual-signal testing were as follows: 500 μL of 600 μmol L^{-1} of nickel (II) chloride was mixed with 750 μL of 4.7212 nmol L^{-1} of Au^0-NPs_{ALz}. The mixture solution was vortexed for 5 s then incubated at 30 °C for 5 min. After incubation of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes, 1.0 mL of different standard histamine concentrations ranging from 10 to 4000 μmol L^{-1} were added to Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes, followed by adjustment of the pH of the sensing solution to 4.0 by 2.25 mL of 10.0 mmol L^{-1} acetate buffer. All detection experiments were fixed at a constant volume of 3.5 mL. After 3.0 min of incubation, quantitative analysis of histamine can be achieved by colorimetric and fluorometric assay. The colorimetric signal was evaluated by monitoring the change of absorbance at 535 nm. Meanwhile, a fluorescence emission spectrum (excitation/emission wavelength: 430/520 nm) was employed for the fluorescent signal.

2.4. Preparation of real samples

Four seafood products including white shrimp, giant tiger prawn, cuttlefish, and splendid squid were purchased from a premium supermarket in Krung Thep Mahanakhon (Bangkok), Thailand. At first, each sample was homogenized using a blender (MB520138, Tefal Co., Ltd, France). The accurate weight of 5.0 g of homogenized seafood sample was mixed with 10 mL of DI water and stirred for 10 min in an ice bath. Then, different standard histamine concentrations of 100–1000 μmol L^{-1} were rapidly spiked in the sample solution under stirring for another 1 min. The mixture was centrifuged at 2500 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant solution was filtered through a Whatman No. 42-filter paper (CHM™, Barcelona, Spain) and 0.22 μm pore size nylon membrane syringe filter (CNW Technologies, China), respectively. Finally, the samples were kept in an amber glass bottle at 4 °C until analyses.

2.5. Validation method

To ensure reliable and accurate results from Au^0-NPs_{ALz} dual-signal colorimetric and fluorometric assay for histamine detection, the results obtained from the developed method were compared to the standard High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). For the analytical procedure, histamine was derivatized by the methods of I. Altieri et al. [25] with some modifications, the derivative mechanism was shown in Fig. S1. Briefly, accurately weigh approximately 5.0 g of homogenized seafood samples were mixed with 10 mL of 0.4 mol L^{-1} perchloric acid ($HClO_4$) under continuously stirred in an ice bath. After 10 min, the mixture solution was centrifuged at 2500 rpm for 10 min at 4 °C. Remove the supernatant carefully, the pellet was re-extracted with 10 mL of 0.4 mol L^{-1} perchloric acid, left on an ice bath for 10 min, and then centrifuged at 2500 rpm. At last, the two-times supernatant was combined and filtered through a Whatman No. 42-filter paper (CHM™, Barcelona, Spain). For the derivatization step, a 1.0 mL of pretreatment seafood sample was spiked with different standard histamine concentrations of 100, 400, and 1000 μmol L^{-1}. Afterward, 1.0 mL of spiked sample was mixed with 200 μL of 2.0 mol L^{-1} NaOH and 300 μL of 20 mol L^{-1} $NaHCO_3$ solution. Afterward, 2.0 mL of 10 mg mL^{-1} dansyl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

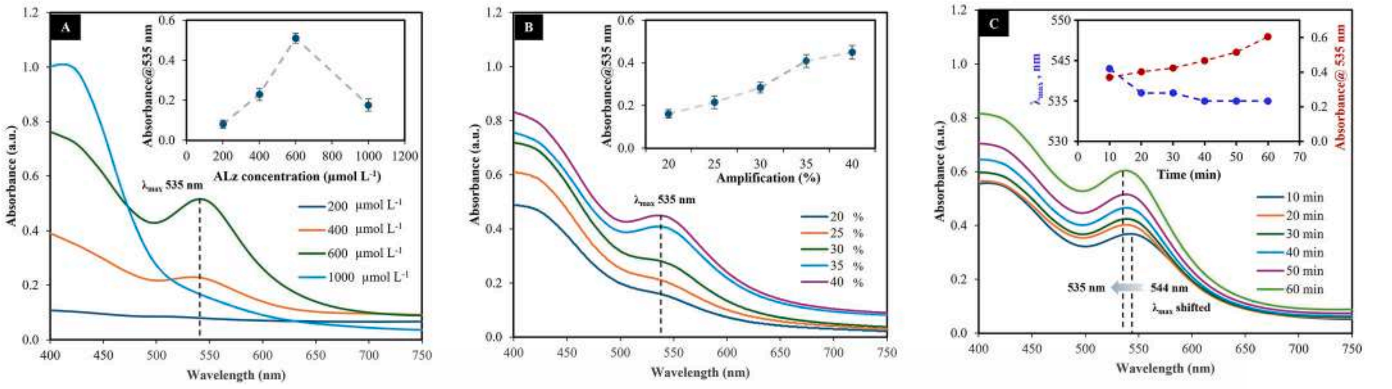


Fig. 2. UV–vis absorption spectra of Au^0-NPs_{ALz} in the synthesized conditions (A) effect of ALz concentration (200–1000 μmol L^{-1}), (B) amplification (20–40 %), and (C) irradiation time (10–60 min).

chloride solution was added into the mixture solution and incubated in water bath at 40 °C for 45 min. After the reaction, the excess of dansyl chloride was removed by 100 μL of 25 % v/v NH_4OH solution with continuous shaking in the dark for 1 h. Then, the mixture solution was adjusted to 10.00 mL with acetonitrile. Finally, the derivative solution was filtered with a 0.22 μm pore-size nylon membrane syringe filter (CNW Technologies, China) prior to analysis with HPLC. HPLC (RF–20A Prominance LC-20 series, Shimadzu Co., Ltd, Kyoto, Japan) equipped with a C18 capillary column (4.6 mm × 150 mm × 5 μm particle size, GL Sciences, Japan), and photodiode array detector (PDA, SPD-M20A) monitoring at a wavelength of 254 nm was used for histamine detection. The column was equilibrated at room temperature (25 °C) with a flow rate of 1.0 mL min^{-1}. The 20 μL aliquots of samples were injected into the HPLC system and eluted using 0.1 mol L^{-1} of 50 % ammonium acetate, and 50 % acetonitrile mobile phase. Subsequently, acetonitrile proportion was elevated to 90 % over a duration of 19 min and maintained for a 5-min interval. Chromatograms were acquired and processed by LabSolutions software version 5.92.

3. Results and discussion

3.1. Preparation and characterizations of alizarin complexone-modified gold nanoparticles

Alizarin complexone-modified gold nanoparticles (Au^0-NPs_{ALz}) was prepared by the ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction method with alizarin complexone (ALz) and $NaBH_4$ as stabilizing and reducing reagents, respectively. Ultrasonic irradiation was used to boost or alter the chemical properties of Au^0-NPs_{ALz} upon the synthesis process. As shown in Fig. 1A, alizarin complexone is a dihydroxyanthraquinone compound containing nitrogen–oxygen rich coordination environment. The tetrachloroaurate ion $[AuCl_4]^-$ are easily attracted and adsorbed onto two oxygen atoms in the carbonyl (−C═O) and hydroxyl (−OH) groups of ALz via coordination bonds in a bidentate-bridging mode, resulting in $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes. The mechanism pathway in Fig. S2A demonstrated the formation of $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes, ultrasonic irradiation causes strongly complete $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes formation, whereas in the absence of ultrasonic conditions, $[AuCl_4]^-$ and ALz compounds become either much weaker or completely absent in $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes formation. High-power ultrasonic irradiation causes strong acoustic cavitation in a reaction system, leading to the ALz compound present in the surrounding liquid phase of the collapsing bubbles to be subject to direct attack by $[AuCl_4]^-$, thus probably accelerating coordinated covalent $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complex formation. The absorbance characteristic of $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes revealed an absorbance of their λ_{max} to 594 nm, which had a brighter green color (Fig. S3A). Under un-ultrasonic irradiation conditions, the dark brown hue solution was obtained (Fig. S3B). After performing the reduction of gold (III) ions in $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes solution using ultrasonic-assisted $NaBH_4$ chemical reduction, $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes solutions were rapidly reduced to Au^0-NPs_{ALz}. The relatively strong reductant $NaBH_4$ reacted first with $[Au(ALz)Cl_2]^-$ complexes, rather than ultrasonic irradiation, to form spherical Au^0-NPs_{ALz}. After the formation of Au^0-NPs_{ALz}, high temperature (5000 K) and pressure (1000 atm) conditions in ultrasonic irradiation [26] will partially split the water molecules (H_2O) into both hydrogen radicals ($H^•$) and hydroxyl radicals ($HO^•$). The $HO^•$ may diffuse into the bulk BH_4^- liquid phase and initiate the growth of Au^0NPs_{ALz}. The $(Au^0)_n$-NPs_{ALz}, can be strongly adsorbed onto the surface of $(Au^0)_m$-NPs_{ALz} to give $(Au^0)_{m+1}NPs_{ALz}$ or $(Au^0)_{m+n}$-NPs_{ALz}; where m is nuclei of nanoparticles, and m + n is cluster growth. The nanoparticles spontaneously assemble by adsorbed $(Au^0)_n$-NPs_{ALz} on the $(Au^0)_m$-NPs_{ALz}, which also occurs to grow the particles. Therefore, the size of the $(Au^0)_{m+1}NPs_{ALz}$ or $(Au^0)_{m+n}$-NPs_{ALz} generally increases via the ultrasonic irradiation-assisted $NaBH_4$ chemical reduction method. The mechanistic nucleation and growth formation scheme for Au^0-NPs_{ALz} was summarized in Fig. S2B. The surface plasmon resonance (SPR), which involves the collective oscillation of electrons on the surface of Au^0-NPs_{ALz} was found to be 535 nm and the color of the solution was brighter-red (Fig. S3C). In contrast, Au^0-NPs_{ALz} produced by the individually $NaBH_4$ chemical reduction method reveals a brownish color. The characteristic SPR peak at 535 nm was decreased with a shoulder at 550–600 nm (Fig. S3D). The performance of the ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction method in the synthesis of Au^0-NPs_{ALz} resulted in an SPR peak that was significantly more noticeable compared to the individually chemical reduction method. As proposed in a previous study [27], an early synthesis of plate structure was noticed by SPR bands located at approximately 520–540 nm, which were ascribed to the transverse surface plasmon band (SP_T) of the AuNPs. This was similar to those previously reported for AuNP synthesis [28,29]. The combination of ultrasonic irradiation and $NaBH_4$ chemical reduction had considerable advantages over the $NaBH_4$ chemical reduction method.

3.1.1. Synthesis conditions for alizarin complexone-modified gold nanoparticles

The synthesis process for optimizing Au^0-NPs_{ALz} was carried out by keeping $[AuCl_4]^-$ concentration of 1000 μmol L^{-1} and $NaBH_4$ of 10 mmol L^{-1} as constant and changing the process variables including ALz concentration varied from 200 to 1000 μmol L^{-1}, sonic amplification of 20–40 %, and irradiation time of 10–60 min. The illustration of Fig. 2 represented the UV–vis absorption spectra of Au^0-NPs_{ALz} under the synthesized conditions. Fig. 2A showed the UV–vis absorption spectra of the synthesized Au^0-NPs_{ALz} by the ultrasonic-assisted chemical reduction reaction with varying concentrations of ALz (200–1000 μmol L^{-1}). The Au^0-NPs_{ALz} was prepared by 600 μmol L^{-1} of ALz stabilizing solution, which possessed a greater advantage in NPs formation. A strong

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

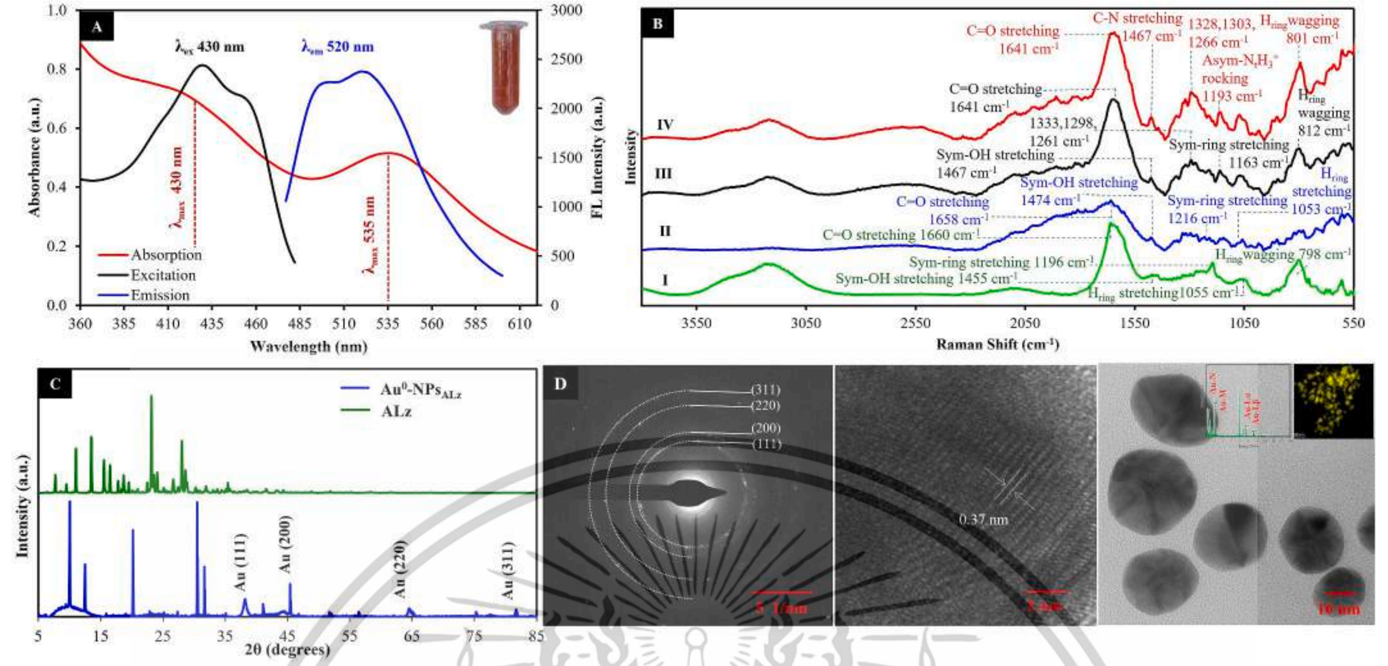


Fig. 3. Au^0-NPs_{ALz} characteristics (A) UV–vis absorption spectra and fluorescence excitation and emission, (B) Raman spectrum of (I) ALz, (II) Au^0-NPs_{ALz}, (III) Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes (IV) Au^0-NPs_{ALz}-Ni/Histamine, (C) XRD pattern of ALz and Au^0-NPs_{ALz}, and (D) HRTEM micrographs, SAED image, and TEM image inset the elemental mapping image, and EDX spectrum of Au^0-NPs_{ALz}.

absorption peak at 535 nm showed an SPR characteristic, suggesting the formation of Au^0-NPs_{ALz}. Fig. S4A1-3 showed TEM images of freshly prepared Au^0-NPs_{ALz} in the presence of 400, 600, and 1000 μmol L^{-1} of ALz stabilizing agent, Au^0-NPs_{ALz} were found spherical in shape with a particle size of 23.23 ± 4.26 nm, 20.02 ± 4.36 nm, and 17.63 ± 4.07 nm, respectively. As the concentration of ALz increases, the size of Au^0-NPs_{ALz} were decreased due to the adsorption and stabilizing effect of ALz. In contrast, there was no observable presence of absorbance peak (λ_{max}) at 535 nm for the ALz synthetic reaction of 200 μmol L^{-1}, indicating that it was difficult for NPs formation. Interestingly, the ALz compound can serve as a stabilizing property, which restricts the aggregation of nanoparticles.

The influence of ultrasonic power on the size and morphology of Au^0-NPs_{ALz} was investigated by controlling sono-amplification power of 20–40 %. After performing the ultrasonic radiation, UV–vis hypsochromic shifting was observed in the spectra (Fig. 2B). The spectra revealed a broadband localization at 535 nm after 35 % of irradiation power, associated with colloidal Au^0-NPs_{ALz} formation. From the TEM images and histograms in Fig. S4B, it was evident that the freshly synthesized Au^0-NPs_{ALz} using 10, 20, and 35 % irradiation power had particle sizes of 26.96 ± 6.11 nm, 25.69 ± 4.50 nm, and 23.15 ± 3.56 nm, respectively. When the irradiation power was 10 %, the nucleation speed of Au^0-NPs_{ALz} was slow, and the growth formation was dominant, which made the particle size distribution of Au^0-NPs_{ALz} wider (19.66 nm–38.18 nm). With high irradiation power (35 %), the reduction rate was accelerated, resulting in a narrow particle size distribution of Au^0-NPs_{ALz} of 18.54 nm–28.41 nm. In the absence of ultrasonic irradiation, the Au^0-NPs_{ALz} prepared using the $NaBH_4$ chemical reduction method exhibited obvious either agglomeration or precipitation occurred (Fig. S5A), further confirming the effect of ultrasonic irradiation-assisted chemical reduction on the formation of Au^0-NPs_{ALz} and the improvement of dispersion. According to the above analysis, an ultrasonic power with an amplification of 35 % is suitable for the synthesis of Au^0-NPs_{ALz}. As shown in Fig. 2C, with the prolongation of ultrasonic time (10–60 min), the absorbance peak intensities of Au^0-NPs_{ALz} gradually became higher, while the λ_{max} was slightly blue-shifted from 542 nm to 535 nm and reached equilibrium at 40 min. Accordingly, the optimal ultrasonic synthesis time of Au^0-NPs_{ALz} was determined to be 40 min. Fig. S4C shows the TEM images and histograms of Au^0-NPsALz. Upon ultrasonic synthesis times of 10, 30, and 40 min, the particle size of Au^0-NPs_{ALz} was found to decrease from 25.02 ± 2.70 nm to 19.19 ± 1.68 nm, and 17.84 ± 1.37 nm, respectively. The size of the Au^0-NPs_{ALz} decreased slightly, and the uniformity of the dispersion increased upon the increase of ultrasonic time. These were due to high-intensity ultrasound generating reactive radicals (e^-_{aq}, $H^•$, H_2, $HO^•$, H_3O^+, and H_2O_2) [30], allowing for controlled reduction of $[AuCl_4]^-$ precursors and improved nucleation and growth of Au^0-NPs_{ALz}. Moreover, the impact of increased sonication time enhanced the dispersion, uniformity, and crystallinity of Au^0-NPs_{ALz} [31].

The as-synthesized Au^0-NPs_{ALz} had been found to have excellent colloidal stability under a period of 60 days (Fig. S5B). Zeta potential measurements reveal the Au^0-NPs_{ALz} was found to be −38.17 ± 3.01 mV (Fig. S5C), which indicated high dispersion colloidal stability.

3.1.2. *Characterization of alizarin complexone-modified gold nanoparticles*

UV–vis absorption spectra, and excitation and emission spectra of the as-synthesized Au^0-NPs_{ALz} was shown in Fig. 3A. The absorption spectra of the prepared Au^0-NPs_{ALz} exhibited two absorption bands at 430 nm and 535 nm, which attributed to π→π* transition of aromatic C=C of ALz stabilizing domain [32], and dipolar Localized surface plasmon resonance (LSPR) mode absorption of the Au^0-NPs_{ALz} [33], respectively. The maximum emission wavelength of the colloidal Au^0-NPs_{ALz} is around 520 nm with an excitation of 430 nm. The fluorescence of the surface-attached ALz was expected to be enhanced by Au^0-NPs_{ALz} due to the negligibly small overlap between the LSPR absorption (535 nm) and the emission (520 nm) spectra. The higher-energy excited states of the π→π* transition of aromatic C=C in the ALz stabilizing domain were transferred to surface-bound Au^0-NPs_{ALz} centers, which enhanced the electromagnetic resonance coupling of NPs. Such an emission enhanced the electromagnetic resonance coupling, and the fluorescence of Au^0-NPs_{ALz} was perfectly increased. The fluorescence enhancement was further confirmed using the fluorescence lifetime and 3D fluorescence spectra measurement. As shown in Figs. S6A–B, the fluorescence lifetime of Au^0-NPs_{ALz} (τ = 4.3765 ns) was longer than that of ALz compound (τ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

= 4.3360 ns), demonstrating that the enhancement process of Au^0-NPs$_{ALz}$ could be attributed to dynamic enhancement. Moreover, according to their 3D fluorescence spectra (Fig. S7A1-A2), confirm the presence of ALz in the structure of Au^0-NPs$_{ALz}$ mediated fluorescence enhancement.

The successful assemblies of ALz molecularly linked in the structure of Au^0-NPs$_{ALz}$ were further confirmed using Raman spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray diffraction (XRD), and TEM analysis. In Fig. 3B, the Raman spectra of Au^0-NPs$_{ALz}$ showed the characteristic band in 1660, 1455, 1196 1055, and 798 cm^{-1}, which correspond to the vibrational of C=O stretching, Sym-OH stretching, Sym-ring stretching, and H_{ring} wagging of the aromatic ring, respectively [34]. In addition, the strong absorption peak at 1658 cm^{-1} was caused by the stretching vibration C=O group of the anthraquinone ring of ALz, which confirmed the coordination of C=O on the surface of Au^0-NPs$_{ALz}$. The XPS spectra were used to confirm the elemental compositions and chemical state of Au^0-NPs$_{ALz}$. Full survey spectra of Au^0-NPs$_{ALz}$ were recorded, and the signals for Au 4f, O 1s, and C 1s were shown in Fig. S8. Fig. S8A shows the wide scan XPS spectra of Au^0-NPs$_{ALz}$, which demonstrates the presence of Au 4f along with O 1s, N 1s, and C 1s. The high-resolution XPS (HR-XPS) Au4f spectrum shows the two well-defined binding energy (BE) peaks (Fig. S8B) at 87.9 eV, and 83.9 eV, corresponding to the Au4f$_{5/2}$ and Au4f$_{7/2}$, respectively. The broadening spectra in the Au4f region and its curve fitting show three spin-orbit splitting species (oxidation states) for Au^0, Au^+, and Au^{3+}. The well-defined peaks at BE values of 87.9 and 83.9 eV were attributed to the metallic Au (Au^0) for Au4f$_{5/2}$ and Au4f$_{7/2}$ core levels,

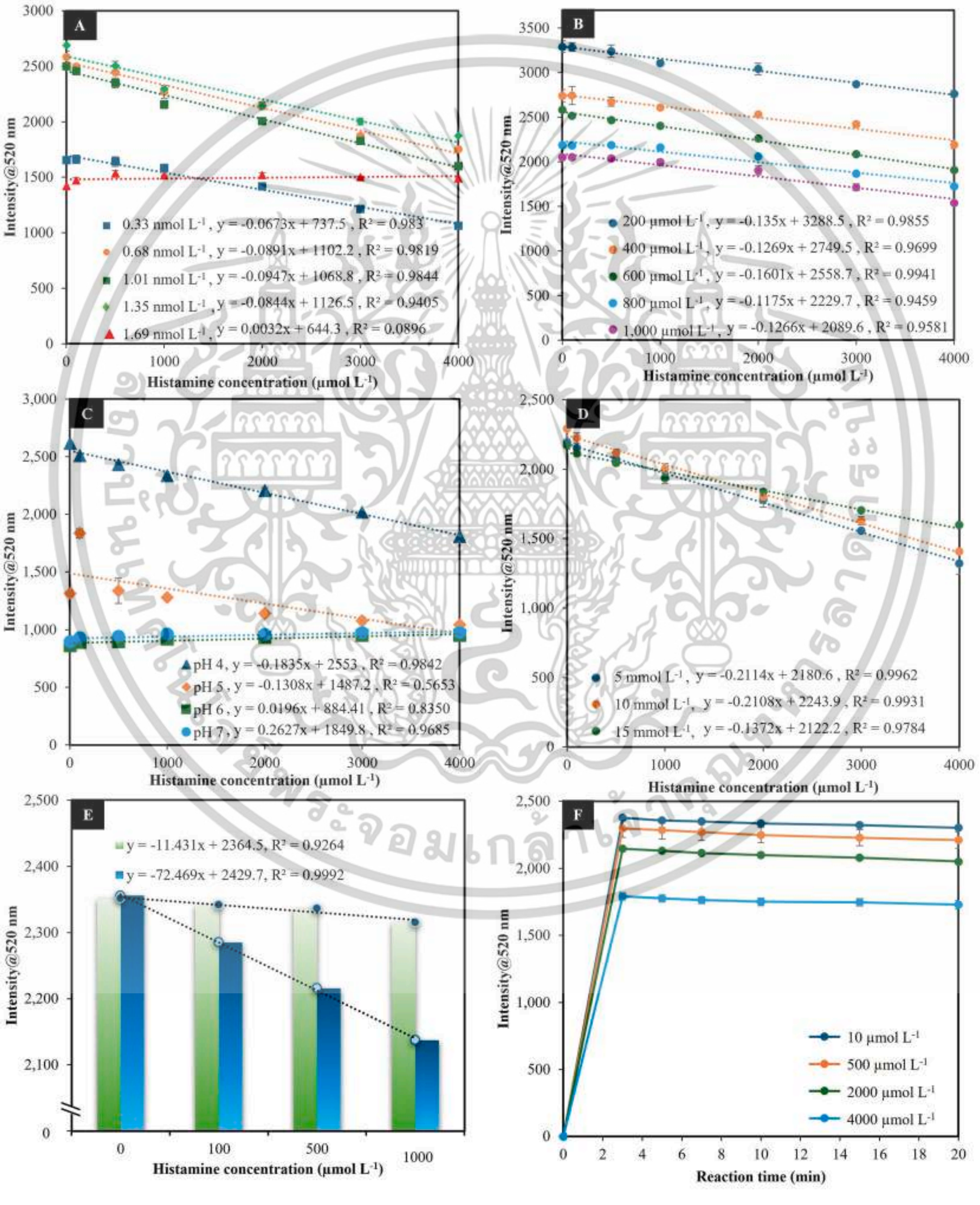


Fig. 4. Optimization of the fluorometric responses of Au^0-NPs$_{ALz}$ on the detection of histamine (A) Effect of Au^0-NPs$_{ALz}$ concentration of 0.33–1.69 nmol L^{-1}, (B) Effect of Ni (II) concentration of 200–1000 μmol L^{-1}, (C) Effect of pH varied from 4 to 7, (D) Effect of acetate buffer concentration of 5, 10, and 15 mmol L^{-1}, (E) Effect of sensing reaction order (Condition 1: ◙) (i) Au^0-NPs$_{ALz}$, (ii) Ni (II), (iii) histamine, and (iv) acetate buffer, and (Condition 2: ◙) (i) Au^0-NPs$_{ALz}$, (ii) Ni (II), (iii) acetate buffer, and (iv) histamine, and (F) Effect of incubation time with different histamine concentration of 10 μmol L^{-1}, 500 μmol L^{-1}, 2000 μmol L^{-1} and 4000 μmol L^{-1}.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

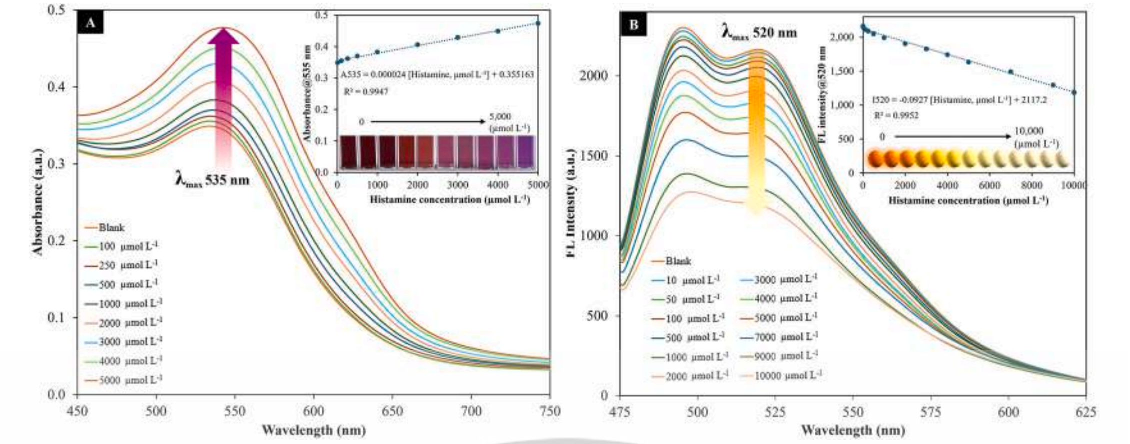


Fig. 5. (A) Absorbance spectra and linear relationship between the colorimetric responses of Au^0-NPs_{ALz} with different histamine concentrations from 100 to 5000 μmol L^{-1}, and (B) Fluorescence spectra and linear relationship between fluorometric responses of Au^0-NPs_{ALz} with different histamine concentrations of 10–10000 μmol L^{-1}. Error bars represent the standard deviation (n = 10).

respectively. The peak at BE values of 90.1 eV, 89.3 eV, 87.3 eV, and 85.9 eV were attributed to $Au4f^{+3}_{5/2}$, $Au4f^{+1}_{5/2}$, $Au4f^{+3}_{7/2}$, and $Au4f^{+1}_{7/2}$, respectively. These results confirm the presence of any oxidized species of gold in Au^0-NPs_{ALz}. Moreover, peaks corresponding O 1s, and C 1s, were also seen with Au signals which were due to ALz functionalized on the surface of AuNPs (Figs. S8C–D). The main connection mode, binding energies of C 1s, and O 1s, and the parameter Δ (eV) for Au^0-NPs_{ALz} were shown in Table S1. The successful Au^0-NPs_{ALz} synthesis could be affirmed by the specific binding of C 1s and O 1s, which is mainly attributed to the ALz compound on the NPs surface.

The XRD spectra were used to analyze the crystal structures of Au^0-NPs_{ALz} (Fig. 3C). The Au^0-NPs_{ALz} represented by four diffraction peaks at 2θ of 38.1, 44.3, 64.5, and 77.5, which corresponded to standard Bragg reflections of (111), (200), (220), and (311) planes of face-centered cubic (fcc) lattice (JCPDS 04–0784), respectively [35]. The morphology and structure of Au^0-NPs_{ALz} were characterized by TEM. As shown in Fig. 3D, Au^0-NPs_{ALz} had a spherical morphology and exhibited uniformly dispersed with a size distribution of 16.30–20.04 nm and an average diameter of 17.84 ± 1.37 nm. As measured from the HRTEM image, the lattice spacing of Au^0-NPs_{ALz} was 0.37 nm. The patterns of SAED were indexed according to (111), (200), (220), and (311) reflections of fcc gold on the basis of their diffraction rings d-spacing values of 0.27 nm, 0.22 nm, 0.17 nm, and 0.14 nm, respectively. EDS spectra showed the obvious peaks for the gold, near to 0.27 keV, 2.12 keV, 9.62 keV, and 11.44 keV, confirming the successful synthesis of Au^0-NPs_{ALz}.

3.2. *The feasibility of dual-signal colorimetric and fluorometric sensing of histamine*

With the well-proven colorimetric and fluorometric detection feasibility of Au^0-NPs_{ALz} for histamine, we then utilized the probe for dual-signal response in detecting histamine. Firstly, Au^0-NPs_{ALz} were then complexed with Ni (II). Coordination of Au^0-NPs_{ALz} with Ni (II) has been found to strengthen the sensitivity and selectivity for histamine (Fig. S9) [36–38]. Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes showed Ni (II) in pseudo-octahedron geometry, with four coordination sites occupied by the nitrogen and oxygen atoms of the ALz modified NP and two other coordination sites occupied by hydroxide ions (–OH) and H_2O [39]. After confirming that the probe Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes were successfully constructed, we investigated their colorimetric and fluorometric detection feasibility for histamine. The colorimetric property of the synthesized probe was preliminary investigated (Fig. S10A), and it showed that Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes displayed a strong absorption peak at 535 nm with the solution turning vivid red. Furthermore, with the introduction of histamine, the wavelength of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes showed a significant bathochromic shift with observed at 545 nm with the color changed to purple as observed by the naked eye. The feasibility of the fluorescence detection mode was shown in Fig. S10B. Au^0-NPs_{ALz} had strong fluorescence at the emission wavelength of 520 nm under an excitation wavelength of 430 nm, and the fluorescence was significantly quenched after complexed with Ni (II). The impact of Ni (II) on the Au^0-NPs_{ALz} surfaces is an important factor affecting the fluorescence intensity due to a transfer of energy from the lowest excited singlet state of Au^0-NPs_{ALz} to octahedral d^8 Ni (II) electronic state, resulting in fluorescence decreased (Fig. S7A3). The overlap of electron clouds between Au^0-NPs_{ALz} and Ni (II) leads to weak exciton coupling, thereby decreasing the fluorescence lifetime to 4.3575 ns (Fig. S6C). When histamine was presented in Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes system, the fluorescence emission was obviously decreased (Fig. S7A4). The histamine molecule consists of an imidazole ring and an aliphatic amino group, which serve as reaction sites. Intramolecular nucleophilic attack by imidazole and aliphatic amino group on Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes Fig. 1B-C, thereby ligand complexation (Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II)/histamine). To further elucidate the intermolecular interaction by which histamine coordinated with Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes, Raman spectroscopy and fluorescence lifetime were examined. As revealed in Fig. 3B-III, Raman spectra was used to investigate the chemical interaction on the Au^0-NPs_{ALz} surfaces. The Raman spectrum of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes showed the bands at 1641 cm^{-1}, 1467 cm^{-1}, and 1163 cm^{-1} assigned to C=O stretching vibration of carboxylate group of ALz, symmetric OH stretching, and symmetric stretching of hydroxyantraquinone ring of ALz, respectively. The triple peaks at 1261, 1298, and 1333 cm^{-1} were assigned to scissoring N–Ni–O/N [40], as confirmed by the successful complexation of Ni (II) with Au^0-NPs_{ALz}. The Raman spectrum of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes in the presence of histamine was also shown in Fig. 3B-IV. The new band at 1193 cm^{-1} of asymmetric $N_tH_3^+$ rocking appeared, indicating the histamine molecules closely interact with the Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes. Undergoing significant shifts in the triple peaks at 1266, 1303, and 1328 cm^{-1} corresponding to N–Ni–O/N, confirming histamine bonded onto Au^0-NPs_{ALz} surfaces. Analysis of the fluorescence lifetime of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes in the presence of histamine seemed to support this evidence (Fig. S6D). Already after the introduction of histamine, the fluorescence lifetime of Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes was down to 4.0161 ns. The presence of an imidazole ring in histamine molecules allowed the formation of a conjugated structure, which enables the molecules to adopt a stable π→π* excited state upon excitation. This conjugated structure enabled efficient electron transfer within the molecule, resulting in lower radiative energy loss and shorter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1
Summary of the recovery study of histamine in real samples.

Samples	Added (μmol L^{-1})	Dual signal Au^0-NPs_{ALz} sensor				HPLC standard method	
		Colorimetric responses		Fluorometric responses			
		Found (μmol L^{-1})	Recovery (%)	Found (μmol L^{-1})	Recovery (%)	Found (μmol L^{-1})	Recovery (%)
White shrimp	0	438.00	–	447.26	–	443.35	–
	100	541.46	103.46 ±1.10	547.52	100.26 ±1.30	544.52	101.17 ±0.99
	400	830.85	98.21 ±1.00	840.55	98.32 ±1.52	837.08	98.43 ±2.59
	1000	1414.75	97.67 ±0.27	1418.17	97.09 ±0.57	1421.47	97.81 ±1.73
Giant tiger prawn	0	848.68	–	845.42	–	846.89	–
	100	949.82	101.14 ±1.04	943.14	97.72 ±1.35	947.30	100.41 ±0.52
	400	1255.60	101.73 ±0.76	1258.59	103.29 ±1.37	1260.75	103.47 ±1.70
	1000	1857.22	100.85 ±0.54	1853.37	100.79 ±0.51	1856.42	100.95 ±1.41
Cuttlefish	0	1425.09	–	1433.72	–	1431.80	–
	100	1523.36	98.27 ±1.37	1528.71	94.99 ±0.17	1534.61	102.82 ±2.61
	400	1819.81	98.68 ±1.74	1819.00	96.32 ±0.18	1817.36	96.39 ±1.50
	1000	2431.33	100.62 ±0.21	2442.80	100.91 ±0.29	2445.52	101.37 ±1.70
Splendid squid	0	1429.68	–	1435.70	–	1434.60	–
	100	1536.56	106.88 ±0.76	1534.22	98.52 ±0.22	1535.20	100.60 ±0.97
	400	1836.51	101.71 ±0.68	1820.38	96.17 ±0.39	1823.47	97.22 ±2.21
	1000	2462.64	103.30 ±0.08	2432.10	99.64 ±0.43	2442.53	100.79 ±0.11

fluorescence lifetimes.

3.3. Analytical performance of dual sensor

To achieve better detection performance of dual-signal colorimetric and fluorometric sensing of Au^0-NPs_{ALz} for analysis of histamine, we optimized some effective factors including Au^0-NPs_{ALz} concentration varied from 0.33 to 1.69 nmol L^{-1}, Ni (II) concentration of 200–1000 μmol L^{-1}, pH varied from 4 to 7, acetate buffer concentration of 5, 10, and 15 mmol L^{-1}, order of sensing reaction, and incubation time of 1–20 min. The best results of fluorometric (Fig. 4) and colorimetric assay (Fig. S11) can be successful under the following experimental conditions: (1) The optimal Au^0-NPs_{ALz} concentration of 1.01 nmol L^{-1}; (2) Ni (II) concentration of 600 μmol L^{-1}; (3) The acetate buffer pH 4.0 with the concentration of 10 mmol L^{-1}; (4) The order of sensing reaction was (i) Au^0-NPs_{ALz}, (ii) Ni (II), (iii) histamine, and (iv) acetate buffer, respectively; and (5) the optimal reaction time of 5 min. Under these conditions, the sensitivity of dual-signal sensors was evaluated by varying histamine content (Fig. 5). The colorimetric responses of Au^0-NPs_{ALz} at the maximum wavelength of 535 nm were gradually increased with enhancement of histamine content, and a linear relationship was observed from 100 to 5000 μmol L^{-1}. A regression equation was done as found to be; Absorbance $_{535\ nm}$ = 0.000024 [Histamine, μmol L^{-1}] + 0.355163, with a correlation coefficient (R^2) of 0.9947. The Limit of detection (LOD; 3σ/slope of calibration curve; where σ is the standard deviation of blank measurements calculated to be 0.00093 μmol L^{-1}) and the Limit of quantitation (LOQ; 10σ/slope of calibration curve) were 116.20 and 387.33 μmol L^{-1}, respectively. In the fluorescence response, the fluorescence intensity of Au^0-NPs_{ALz} at the emission wavelength of 520 nm decreased progressively with increasing histamine concentrations under the fixed excitation wavelength of 430 nm, and there was a strong linear relationship between 10 and 10000 μmol L^{-1}. The LOD (σ = 1.83308 μmol L^{-1}) and LOQ were calculated as 59.32 and 197.74 μmol L^{-1}, respectively. The linear regression equation was Fluorescence $_{520\ nm}$ = −0.0927 [Histamine, μmol L^{-1}] + 2117.2, with R^2 of 0.9952. Furthermore, under the optimized conditions, the accuracy and precision of the dual-signal Au^0-NPs_{ALz} for colorimetric and fluorometric responses of different histamine concentrations were evaluated (Table S2). The accuracy was evaluated using the recovery percentage. The ten repetitive measurements of 500, 2000, and 4000 μmol L^{-1} histamine concentration were found in the range of 100.76–100.85 % for colorimetric responses, and 101.28–101.33 % for fluorometric responses. Additionally, the precision (relative standard deviation, %RSD) of colorimetric and fluorometric responses was calculated to be in the range of 0.23–0.43 % and 0.10–0.54 %, respectively. Overall, it was revealed that the Au^0-NPs_{ALz} sensor had good detection for histamine. The data presented above demonstrated a great linear relationship between colorimetric and fluorescent dual-signal sensing for histamine. Au^0-NPs_{ALz} dual-sensing probe can be mutually checked, guaranteeing the dependability for histamine detection.

3.4. Selectivity of method

The selective Au^0-NPs_{ALz} based dual-signal colorimetric and fluorometric sensor for detecting of histamine was examined in the presence of various substances and metal ions that can be found in the real seafood product samples. As expressed in Fig. S12, it was observed that the absorbance values at 535 nm of Au^0-NPs_{ALz} significantly increased only in the presence of histamine, while the fluorescence emission at a wavelength of 520 nm was quenched, indicating that Au^0-NPs_{ALz} exhibited high specificity towards histamine assay. This could be attributed to the specific bonding ability of histamine to Au^0-NPs_{ALz} complexed with Ni (II). The structures of histamine were compared with other organic substances including acetaldehyde (C_2H_4O), cysteine (CH_3CHO), leucine ($C_6H_{13}NO_2$), lysine ($C_6H_{14}N_2O_2$), phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$), serine ($C_3H_7NO_3$), threonine ($C_4H_9NO_3$), valine ($C_5H_{11}NO_2$), aminobutyric acid ($C_4H_9NO_2$). It is worth noting that only histamine contains an imidazole ring, and an aliphatic amino group could coordinate with Ni (II) in Au^0-NPs_{ALz} complexes. In addition, other metal ions such as Mg (II), Zn (II), Ca (II), K (I), and Na (I) could not inhibit the sensing properties of Au^0-NPs_{ALz}. Therefore, the above phenomena illustrated that the developed Au^0-NPs_{ALz} dual-signal sensor has an outstanding selectivity for sensing histamine in seafood products.

3.5. Actual sample detection and method validation

To investigate the feasibility of this assay in practical applications, the Au^0-NPs_{ALz} dual-signal sensor was used to quantify histamine in seafood products including white shrimp, giant tiger prawn, cuttlefish, and splendid squid. A certain concentration of target histamine (100, 400, and 1000 μmol L^{-1}) was added to the pre-processed sample for detection and recovery calculation. The achieved data were summarized in Table 1. The obtained recoveries of the colorimetric mode and fluorescence mode in seafood products were in ranges of 94.99–106.88 %. The reproducibility of Au^0-NPs_{ALz} dual-signal sensor was lower than 5.44 %RSD. Furthermore, a comparison between the results obtained through the Au^0-NPs_{ALz} dual-signal sensor and those acquired using the validating standard HPLC method demonstrated no significant differences based on the ANOVA test ($F_{stat} = 2.83 \times 10^{-5}$ and $F_{crit} = 3.20$) (Table S3). The above data indicated that the Au^0-NPs_{ALz} dual-signal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2
Comparison of detection performances of recently developed chemical sensors for histamine detection.

Materials	Method	Analysis time (min)	Linear range (μmol L^{-1})	LOD (μmol L^{-1})	%RSD	Ref
DNAzyme with peroxidase-mimic activity	Colorimetric	20	1170–2700	342	4.69–8.97	[12]
Polyvinyl alcohol (PVA) entrapped 2,3 naphthalene-dicarboxaldehyde sol-gel	Colorimetric	20	54–675	2.79	1.50–3.60	[41]
Alizarin complexone and Ni (II) complexes	Colorimetric	–	5–150	7.68	–	[42]
Graphite phase carbon nitride (g-C_3N_4)	Fluorometric	15	5–800	2.34	10	[43]
Tryptophan ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) capped Au–Ag bimetallic nanoclusters	Fluorometric	6	0.85–4	0.09	3.50–4.20	[11]
La (III) doped upconversion nanoparticles	Fluorometric	20	90–1800	66	1.13–4.32	[44]
	Colorimetric	20	224–1800	225	0.44–9.30	
Dual signal Au^0-NPs_{ALz} colorimetric and fluorometric sensor	Fluorometric	5	10–10000	59.32	0.32–0.80	This work
	Colorimetric	5	100–5000	116.20	0.81–1.07	

sensor was equivalent to the HPLC method, and this method had good practical applicability and high accuracy for histamine detection.

Furthermore, the proposed dual-signal Au^0-NPs_{ALz} sensor was compared with several previous reports on histamine detection, as shown in Table 2. An easily ultrasonic-assisted chemical reduction synthesized Au^0-NPs_{ALz} has been utilized for the dual-mode detection of histamine at micromolar (μmol L^{-1}) concentrations. The linear detection range and response time were wider and faster than those of previously reported colorimetric and fluorometric probes. Although the detection limit (LOD) of this work was higher than some work, it was sufficiently sensitive to detect histamine in real aquatic products.

4. Conclusion

A simple and efficient ultrasonic-assisted chemical reduction approach was designed to synthesize Au^0-NPs_{ALz} for quantitative measurement of histamine in seafood products. The synthesized Au^0-NPs_{ALz} possessed a spherical morphology with a size of 17.84 ± 1.37 nm with a surface plasmon resonance (SPR) peak at 535 nm. Based on the detection mechanism, a certain concentration of Ni (II) was complexed with Au^0-NPs_{ALz} to form Au^0-NPs_{ALz}-Ni (II) complexes, which exhibited the characteristic absorption peak at 535 nm, and fluorescence peak at 520 nm. In the presence of histamine, Ni (II) selectively captured histamine molecules near the Au^0-NPs_{ALz} surfaces, causing measurable changes in both colorimetric and fluorometric responses of the solution. Under suitable conditions, this approach enabled sensitive and selective detection of histamine, with low LOD and a wide linear response range for both colorimetric and fluorometric assays. The developed method also provided high accuracy and precision with rapid analysis. Therefore, the Au^0-NPs_{ALz} can be applied as a dual-mode sensor for the determination of histamine content in real seafood samples.

CRediT authorship contribution statement

Ampika Phoungsiri: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Data curation. **Natee Lerdpiriyaskulkij:** Data curation. **Arjnarong Mathaweesansurn:** Writing – review & editing, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Ekarat Detsri:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Methodology, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

This research project is supported by the National Science, Research and Innovation Fund (NSRF), Grant number RE-KRIS/FF67/044. The authors would like to thank the Scientific Instruments Center, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for supporting the instruments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126703.

References

[1] B. Bartholomew, P. Berry, J. Rodhouse, R. Gilbert, Scombrotoxic fish poisoning in Britain: features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986, Epidemiol. Infect. 163 (1987) 775–782, https://doi.org/10.1017/S0950268800066632.
[2] Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenetic Amines from Fish and Fishery Products: Meeting Report, first ed., FAO/WHO, Italy, 2013.
[3] E. Thangam, E. Jemima, H. Singh, M. Baig, M. Khan, C. Mathias, M. Church, R. Saluja, The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: the hunt for new therapeutic targets, Front. Immunol. 9 (2018) 1873, https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01873.
[4] M. Muscarella, S. Magro, M. Campaniello, A. Armentano, P. Stacchini, Survey of histamine levels in fresh fish and fish products collected in Puglia (Italy) by ELISA and HPLC with fluorimetric detection, Food Control 31 (2013) 211–217, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.013.
[5] J. Kim, I. Shin, Y. Lee, H. Oh, S. Ban, Improved HPLC method using 2, 3-naphthalenedicarboxaldehyde as fluorescent labeling agent for quantification of histamine in human immunoglobulin preparations, Osong Public Health Res Perspect 2 (2011) 127–134, https://doi.org/10.1016/j.phrp.2011.07.003.
[6] J. Mantoanelli, L. Gonçalves, E. Pereira, Dansyl chloride as a derivatizing agent for the analysis of biogenic amines by CZE-UV, Chromatographia 83 (2020) 767–778, https://doi.org/10.1007/s10337-020-03896-x.
[7] M. Matos, S. Genualdi, Development and evaluation of a gas chromatography-mass spectrometry method for biogenic amines to assess decomposition in seafood, J. Food Compos. Anal. 127 (2024) 105935, https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105935.
[8] M. Papageorgiou, D. Lambropoulou, C. Morrison, J. Namieśnik, J. Wasylka, Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography–Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine, Talanta 183 (2018) 276–282, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.006.
[9] D. Daniel, V. Santosb, D. Vidalb, C. Lagob, Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry, Chromatographia 1416 (2015) 121–128, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.065.
[10] Y. Qin, P. Huang, F. Wu, Histamine-responsive dye-incorporated carbon dots for visual monitoring of food spoilage, Sens. Actuators B: Chem. 365 (2022) 131911, https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131911.
[11] S. Swathy, G. Pallam, K. Kumar, Tryptophan capped gold–silver bimetallic nanoclusters-based turn-off fluorescence sensor for the determination of histamine, Talanta 256 (2023) 124321, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124321.
[12] Y. Li, Z. Lin, C. Hong, Z. Huang, Histamine detection in fish samples based on indirect competitive ELISA method using iron-cobalt co-doped carbon dots labeled histamine antibody, Food Chem. 345 (2021) 128812, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128812.
[13] C. Chow, Biogenic amines-and sulfides-responsive gold nanoparticles for real-time visual detection of raw meat, fish, crustaceans, and preserved meat, Food Chem. 311 (2020) 125908, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125908.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[14] E. Detsri, P. Seeharaj, Colorimetric detection of glutathione based on phthalic acid assisted synthesis of silver nanoparticles, Colloids Surf., A: Physicochem. 533 (2017) 125–132, https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.08.037.

[15] E. Detsri, P. Seeharaj, C. Sriwonga, A sensitive and selective colorimetric sensor for reduced glutathione detection based on silver triangular nanoplates conjugated with gallic acid, Colloids Surf., A: Physicochem. 541 (2018) 36–42, https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.01.016.

[16] A. Mathaweesansurn, E. Detsri, A new colorimetric method for determination of formaldehyde in seafood based on anti-aggregation of gold nanoparticles, J. Food Compos. Anal. 114 (2022) 104802, https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104802.

[17] H. Li, J. Gan a, Q. Yang, L. Fu, Y. Wang, Colorimetric detection of food freshness based on amine-responsive dopamine polymerization on gold nanoparticles, Talanta 234 (2021) 122706, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122706.

[18] N. Hasanova, S. Çelik, R. Apak, Dithioerythritol functionalized gold nanoparticles–based fluorometric sensing of biogenic amines in food samples, J. Food Compos. Anal. 114 (2022) 104837, https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104837.

[19] L. Du, Y. Lao, Y. Sasaki, X. Lyu, P. Gao, S. Wu, T. Minami, Y. Liu, Freshness monitoring of raw fish by detecting biogenic amines using a gold nanoparticle-based colorimetric sensor array, RSC Adv. 12 (2022) 6803–6810, https://doi.org/10.1039/d2ra00160h.

[20] A. Lapennaa, M. Dell'Agliob, G. Palazzo, A. Mallardid, "Naked" gold nanoparticles as colorimetric reporters for biogenic amine detection, Colloids Surf., A: Physicochem. 600 (2020) 124903, https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124903.

[21] Y. Yang, X. Zeng, C. Fu, L. Tan, N. Yang, Y. Liu, Q. Shen, J. Wei, C. Yu, C. Lu, Paper-based microfluidics and tailored gold nanoparticles for visual colorimetric detection of multiplex allergens, Anal. Chim. Acta 1272 (2023) 341497, https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341497.

[22] F. Gasiorek, E. Pouokam, M. Diener, S. Schlechta, M.S. Wickleder, Effects of multivalent histamine supported on gold nanoparticles: activation of histamine receptors by derivatized histamine at subnanomolar concentrations, Org. Biomol. Chem. 13 (2015) 9984–9992, https://doi.org/10.1039/c5ob01354b.

[23] K. El-Nour, E. Salam, H. Soliman, A. Orabi, Gold nanoparticles as a direct and rapid sensor for sensitive analytical detection of biogenic amines, Nanoscale Res. Lett. 12 (2017) 1–11, https://doi.org/10.1186/s11671-017-2014-z.

[24] W. Haiss, N. Thanh, J. Aveyard, D. Fernig, Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV– Vis spectra, Anal. Chem. 79 (2007) 4215–4221, https://doi.org/10.1021/ac0702084.

[25] I. Altieri, A. Semeraro, F. Scalise, I. Calderari, P. Stacchini, European official control of food: determination of histamine in fish products by a HPLC–UV-DAD method, Food Chem. 211 (2016) 694–699, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.111.

[26] M. Dheyab, A. Aziz, P. Khaniabadi, M. Jameel, N. Ahmed, A. Ali, Distinct advantages of using sonochemical over laser ablation methods for a rapid-high quality gold nanoparticles production, Mater. Res. Express 8 (2021) 015009, https://doi.org/10.1088/2053-1591/abd5a4.

[27] Y. Attia, D. Buceta, F. Requejo, L. Giovanetti, M. López-Quintela, Photostability of gold nanoparticles with different shapes: the role of Ag clusters, Nanoscale 7 (2015) 11273–11279, https://doi.org/10.1039/C5NR01887K.

[28] A. Schwartzberg, S. Chen, J. Zhang, Optical trapping and light-induced agglomeration of gold nanoparticle aggregates, Phys. Rev. B Condens. Matter 73 (2006) 165405, https://doi.org/10.1103/PhysRevB.73.165405.

[29] D. Alba-Molina, J. Giner-Casares, M. Cano, Bioconjugated plasmonic nanoparticles for enhanced skin penetration, in: A. Puente-Santiago, D. Rodríguez-Padrón (Eds.), Surface-modified Nanobiomaterials for Electrochemical and Biomedicine Applications, Topics in Current Chemistry Collections., Cham, 2020, pp. 219–235, https://doi.org/10.1007/978-3-030-55502-3_7.

[30] J.A. Fuentes-Garcíaa, J. Santoyo-Salzarc, E. Rangel-Cortesd, G.F. Goyaa, V. Cardozo-Matad, J.A. Pescador-Rojas, Effect of ultrasonic irradiation power on sonochemical synthesis of gold nanoparticles, Ultrason. Sonochem. 70 (2021) 105, https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105274.

[31] M. Gharibshahi, F. Jamali-Sheini, R. Yousefi, Effect of ultrasonic irradiation time on the physical and optoelectronic properties of SnSe nanorods, Surf. Interfaces. 27 (2021) 101433, https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101433.

[32] S. Say-Liang-Fat, J. Cornard, Al (III) complexation by alizarin studied by electronic spectroscopy and quantum chemical calculations, Polyhedron 30 (2011) 2326–2332, https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.06.014.

[33] N. Bastús, J. Piella, V. Puntes, Quantifying the sensitivity of multipolar (dipolar, quadrupolar, and octapolar) surface plasmon resonances in silver nanoparticles: the effect of size, composition and surface coating, Langmuir 32 (2016) 290–300, https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03859.

[34] A. Baran, B. Wrzosek, J. Bukowska, L. Proniewicza, M. Baranskaa, Analysis of alizarin by surface-enhanced and FT-Raman spectroscopy, J. Raman Spectrosc. 40 (2009) 436–441, https://doi.org/10.1002/jrs.2147.

[35] N. Alharbi, K. Bhakyaraj, K. Gopinath, M. Govindarajan, S. Kumuraguru, S. Mohan, P. Kaleeswarran, S. Kadaikunnan, J. Khaled, G. Benelli, Gum-mediated fabrication of eco-friendly gold nanoparticles promoting cell division and pollen germination in plant cells, J. Clust. Sci. 28 (2017) 507–517, https://doi.org/10.1007/s10876-016-1130-8.

[36] D. Seto, N. Soh, K. Nakano, T. Imato, An amphiphilic fluorescent probe for the visualization of histamine in living cells, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 6708–6711, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.003.

[37] M. Ali, P. Ramirez, I. Duznovic, S. Nasir, S. Mafe, W. Ensinger, Label-free histamine detection with nanofluidic diodes through metal ion displacement mechanism, Colloids Surf. B Biointerfaces 150 (2017) 201–208, https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.038.

[38] Y. Altun, F. Köseoğlu, Stability of copper(II), nickel(II) and zinc(II) binary and ternary complexes of histidine, histamine and glycine in aqueous solution, J. Solution Chem. 34 (2005) 213–231, https://doi.org/10.1007/s10953-005-2763-7.

[39] T. Yokoyama, K. Tashiro, T. Murao, A. Yanase, J. Nishimoto, Determination of complex formation constants for Cu (II)–Alizarin complexone with amines by capillary zone electrophoresis, Anal. Chim. Acta 398 (1999) 75–82, https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00416-X.

[40] P. Pal, M. Veres, R. Holomb, M. Szaloki, A. Szöllosi, I. Csarnovics, Identification of histidine-Ni (II) metal complex by Raman spectroscopy, J. Raman Spectrosc. 54 (2023) 278–287, https://doi.org/10.1002/jrs.6490.

[41] S. Khumngern, N. Nontipichet, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, A. Numnuam, A simple colorimetric histamine sensor based on smartphone digital image processing for fish quality assessment, J. Food Compos. Anal. 126 (2024) 105934, https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105934.

[42] Y. Fukushima, S. Aikawa, Colorimetric sensing of histamine in aqueous solution by a system composed of alizarin complexone and Ni^{2+} complex via indicator displacement approach, Tetrahedron Lett. 72 (2021) 153088, https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2021.153088.

[43] X. Lin, C. Hong, Z. Lin, Z. Huang, Rapid detection of histamine in fish based on the fluorescence characteristics of carbon nitride, J. Food Compos. Anal. 112 (2022) 104659, https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104659.

[44] Y. Cao, X. Wang, T. Feng, Z. Li, C. Xue, J. Xu, Ratiometric fluorescent nanosystem based on upconversion nanoparticles for histamine determination in seafood, Food Chem. 390 (2022) 133194, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133194.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล อัมพิกา พ่วงศิริ

วัน เดือน ปีเกิด 7 กันยายน พ.ศ. 2542

ที่อยู่ 228 บ้านพ่วงศิริ ถนน กรุงเทพกรีฑา แขวงหัวหมาก เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร 10240

ประวัติการศึกษา (2564) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมีอุตสาหกรรม ภาควิชาเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

(2567) วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเคมีประยุกต์ ภาควิชาเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผลงานการตีพิมพ์

(1) Phoungsiri, A., Lerdpiriyaskulkij, N., Mathaweesansurn, A., Detsri, E., *Ultrasonic-driven chemical reduction synthesis of alizarin complexone-modified gold nanoparticles for dual-signal colorimetric and fluorometric sensing of histamine in seafood products.* Talanta., 2024. 280: p. 126703. doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126703

(2) Phoungsiri, A., Lerdpiriyaskulkij, N., Monvisade, P., Mathaweesansurn, A., Detsri, E., *A Ratiometric Fluorescence Amplification Using Copper Nanoclusters with o-Phenylenediamine Sensor for Determination of Mercury (II) in Natural Water.* Sensors., 2023. 23(12): p. 5429. doi.org/10.3390/s23125429

รางวัลทางวิชาการ

(1) Gold Oral Presentation Awards, Phoungsiri, A., Lerdpiriyaskulkij, N., Mathaweesansurn, A., Detsri, E.,“Naked” alizarin complexone modified gold nanoparticles as colorimetric sensor for histamine detection in aquatic products, International Conference on Integrated Science Bioscience and Bioinnovation for Sustainability and Forensic Science 2024 (BBFS2024), 6 June, Khon Kaen University, 2024.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้