



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับพาราไธร์โมนในเลือด

Blood parathormone test kit



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

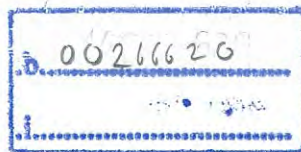


รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับพาราไธร์โมนในเลือด

Blood parathormone test kit

นายณัฐวุฒิ เชิงชั้น



เลขหมู่.....

เลขทะเบียน...147260

รับเดือนปี...13 ก.ค. 2560

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับพาราไธรอนในเลือด  
แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้  
ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 250,000 บาท  
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ต.ค. 2558 - 30 กันยายน 2559  
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. ณัฐวุฒิ เจริญชัย  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

โครงการนี้ นำเสนอการพัฒนาวิธีสำหรับตรวจวัดระดับพาราไธรอนในเลือด โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างฮอร์โมนพาราไธรอยด์กับสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่ติดฉลากด้วย anti - PTH โดยเมื่อมีฮอร์โมนพาราไธรอยด์ สารละลายอนุภาคทองคำนาโนจะเกิดสารเปลี่ยนสีจากสีแดงไวน์ไปเป็นสีน้ำเงินม่วง เนื่องจากกลไกการรวมตัวของอนุภาค (Aggregation) จากการศึกษาพบว่า อนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ขึ้นมีลักษณะเป็นทรงกลมและอนุภาคส่วนใหญ่มีขนาด 19 – 28 นาโนเมตร สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า สามารถตรวจวัดระดับฮอร์โมนพาราไธรอยด์ได้ในช่วงความเข้มข้น 10 – 1,000 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งวิธีการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวัดระดับพาราไธรอนในเลือด เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังความผิดปกติของระดับฮอร์โมนซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้

คำสำคัญ : ฮอร์โมนพาราไธรอยด์, อนุภาคทองคำนาโน, กลไกการรวมตัว (aggregation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Research Title:** Blood parathormone test kit

**Grant:** Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

**Fiscal year:** 2016 (250,000 THB)

**Period:** 1-year (1 October 2015 – 30 September 2016)

**Researcher:** Asst. Prof. Dr. Nathawut Choengchan

**Faculty:** Science                      **Department:** Chemistry

## ABSTRACT

This work presents method development for blood parathormone (PTH) determination. Detection principle is based – on reaction between parathyroid hormone and conjugated gold nanoparticles (AuNPs). After reaction, color of AuNPs was changed from red – wine color to purple due to aggregation of particles. It was observed that synthesized AuNPs was spherical with 19 – 28 nm. sizes. Maximum absorbance of the particles was located at 521 nm. Under optimized conditions, it was found that the developed method can be detected PTH in the range of 10 – 1,000 pg / mL with good linearity. This method was suitable and applicable for blood parathormone determination since the abnormal level of this hormone is dangerous for health and life.

**Keywords:** Parathyroid hormone (PTH), gold nanoparticles (AuNPs), aggregation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานวิจัยตามโครงการนี้ สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ได้เป็นอย่างดี เนื่องด้วยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์สำหรับสถานที่ในการทำงานวิจัยและอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ นางสาวอรฉัตร เลิศอิทธิพร นักศึกษาปริญญาเอก หลักสูตรวิชาเคมีประยุกต์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มีส่วนช่วยในการพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของชุดเครื่องมือต้นแบบนี้ โดยทุ่มเททำงานวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ



ผศ.ดร. ณีรัฐฉิม เริงชั้น  
(หัวหน้าโครงการวิจัย)

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญรูปภาพ.....	VI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1.1 ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (parathyroid hormone).....	3
2.1.2 หลักการของวิธีการทางวิทยามีคัมกัน (immunoassay).....	5
2.1.3 Lateral flow.....	8
2.1.4 คุณสมบัติของอนุภาคทองคำนาโน.....	10
2.1.5 หลักการตรวจวัดที่เสนอในงานวิจัยนี้.....	11
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
2.2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ฮอร์โมนพาราไทรอยด์.....	11
2.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิค lateral flow.....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
3.1 สารเคมี.....	14
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์.....	14
3.3 การเตรียมสารละลาย.....	15
3.4 วิธีดำเนินการทดลอง.....	17
3.4.1 การศึกษาสมบัติของอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs).....	17
3.4.2 การศึกษาเกี่ยวกับการติด anti – PTH ลงบนอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs).....	17
3.4.3 การศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti – PTH labeled AuNPs กับ antigen.....	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	20
4.1 การศึกษาสมบัติของอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) ที่สังเคราะห์ขึ้น.....	20
4.1.1 การศึกษา surface plasmon band ของ AuNPs.....	20
4.1.2 การศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำนาโนด้วยเครื่อง TEM.....	21

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การศึกษาเกี่ยวกับการติด anti – PTH ลงบนอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs).....	21
4.2.1 การศึกษาอิทธิพลของ pH.....	21
4.2.2 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณของ anti – PTH.....	22
4.2.3 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์.....	22
4.3 การศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti – PTH labeled AuNPs กับ antigen.....	25
4.3.1 การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการทำปฏิกิริยา.....	25
4.3.2 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการทำ.....	27
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b> .....	<b>29</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	29
5.1 ข้อเสนอแนะ.....	29
<b>บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย</b> .....	<b>30</b>
<b>เอกสารอ้างอิง</b> .....	<b>31</b>
<b>ภาคผนวก ก.</b> .....	<b>34</b>
1. การศึกษาอิทธิพลของ pH.....	34
2. การศึกษาอิทธิพลของปริมาณของ anti – PTH.....	37
3. การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์.....	37
4. การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti – PTH labeled AuNPs.....	38
กับ antigen	
5. การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti – PTH labeled AuNPs.....	39
กับ antigen	
<b>ภาคผนวก ข.สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย</b> .....	<b>40</b>
<b>ประวัตินักวิจัย</b> .....	<b>42</b>

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงตำแหน่งที่อยู่ของต่อมพาราไทรอยด์.....	3
2.2 แสดงสูตรโครงสร้างของฮอร์โมนพาราไทรอยด์.....	3
2.3 แสดงการควบคุมสมดุลของระดับแคลเซียมในเลือด.....	4
2.4 แสดงภาพจำลองของแอนติเจนและ epitope.....	5
2.5 แสดงภาพจำลองโครงสร้างของแอนติบอดี.....	6
2.6 แสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน.....	7
2.7 แสดงส่วนประกอบของอุปกรณ์ทดสอบ.....	8
2.8 แสดงการออกแบบและกลไกการทำงานของอุปกรณ์ทดสอบ.....	9
2.9 กระบวนการสั่นของพลาสมอน (plasmon oscillation) สำหรับอนุภาคทรงกลมระดับนาโน.....	10
2.10 แสดงกลไกการตรวจวัดฮอร์โมนพาราไทรอยด์ที่เสนอในงานวิจัยนี้.....	11
4.1 (ก) แสดง surface plasmon band ของอนุภาคทองคำนาโน.....	20
(ข) แสดงสีของสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้น.....	
4.2 (ก) แสดงลักษณะของอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากรูปถ่าย TEM.....	21
(ข) แสดงการกระจายของขนาดอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้.....	
4.3 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs สังเคราะห์ได้และที่ pH ต่างๆ.....	22
(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs ที่ pH ต่างๆ (ที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร).....	
4.4 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้และที่หลังการเติม.....	23
แอนติบอดีในปริมาณต่างๆ.....	
(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs หลังการเติมแอนติบอดีในปริมาณต่างๆ.....	
(ที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร).....	
4.5 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้และที่หลังการเติม.....	24
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณต่างๆ.....	
(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs หลังการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณต่างๆ.....	
(ที่ความยาวคลื่น 524 นาโนเมตร).....	
4.6 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้และที่หลังการทำปฏิกิริยา.....	26
กับแอนติเจนในสภาวะต่างๆ.....	
(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs หลังการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในสภาวะต่างๆ.....	
(ที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร).....	
4.7 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้และที่หลังการทำ.....	27
ปฏิกิริยากับแอนติเจนที่อุณหภูมิต่างๆต่างๆ.....	
(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs หลังการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณต่างๆ.....	
(ที่ความยาวคลื่น 524 นาโนเมตร).....	
ก.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate.....	34
ก.2 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 5.....	34
ก.3 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 6.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 7.....	35
ก.5 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 8.....	36
ก.6 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 9.....	36
ข.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ที่เติมแอนติบอดี ปริมาตรต่างๆ.....	37
ค.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ที่เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตรต่างๆ.....	37
ง.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen.....	38
โดยไม่มี การ incubate ก่อนเติม antigen	
ง.2 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen.....	38
โดยมี การ incubate ก่อนเติม antigen	
จ.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen.....	39
ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
จ.2 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen.....	39
ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พาราไทรอยด์ฮอร์โมน (Parathormone, PTH) หรือ พาราไทรอยด์ฮอร์โมน (Parathyroid hormone) สร้างขึ้นจากต่อมพาราไทรอยด์ จัดเป็นโพลีเปปไทด์ ทำหน้าที่รักษาระดับสมดุลของแคลเซียมในกระแสเลือด ความผิดปกติของร่างกายเนื่องจากพาราไทรอยด์ฮอร์โมน จะมี 2 ลักษณะ ได้แก่ ภาวะการขาดพาราไทรอยด์ฮอร์โมน และภาวะมีพาราไทรอยด์ฮอร์โมนมากเกินไป ขั้นตอนการรักษาภาวะการมีพาราไทรอยด์ฮอร์โมนมากเกินไปโดยการผ่าตัดนั้น ก่อนผ่าตัดจะต้องวัดระดับพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในเลือดของผู้ป่วย แล้วกำหนดเป็นค่าพื้นฐาน หลังผ่าตัดจะเก็บตัวอย่างเลือดไปวัดระดับพาราไทรอยด์ฮอร์โมน หากระดับพาราไทรอยด์ฮอร์โมนลดลงเหลือครึ่งหนึ่งหรือน้อยกว่าครึ่งหนึ่งจากค่าพื้นฐาน ก็ไม่ต้องตัดต่อมพาราไทรอยด์ออกไปอีก จากการประชุมเพื่อหาความร่วมมือในงานวิจัย ระหว่างคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล แพทย์ผู้ทำการผ่าตัดต่อมพาราไทรอยด์ ให้ข้อมูลว่า ขั้นตอนการนำส่งตัวอย่างจากห้องผ่าตัดไปยังห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลรวมถึงขั้นตอนการตรวจวัดระดับพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในเลือดด้วยเครื่องมือขนาดใหญ่ใช้เวลานาน แพทย์ผู้ผ่าตัดต้องการวิธีตรวจวัดระดับพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในเลือดที่รู้ผลเร็ว สามารถทำการทดสอบเบื้องต้นได้เองโดยแพทย์หรือพยาบาล

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จึงจะพัฒนาชุดตรวจวัดระดับพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในเลือดที่รู้ผลเร็ว เรียกว่า ชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในเลือด (Blood parathormone test kit) หลักการตรวจวัดจะอาศัยปฏิกิริยาการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโน (Gold nanoparticles, AuNPs) เมื่อมีพาราไทรอยด์ฮอร์โมน เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีม่วง ความเข้มของสีม่วงจะแปรผันตรงกับปริมาณพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในเลือด ชุดทดสอบ จะประกอบด้วยแถบทดสอบและอุปกรณ์ตรวจวัดซึ่งจะใช้โทรศัพท์มือถือที่มีแอปพลิเคชันสำหรับถ่ายรูปลูกัดผลิตภัณฑ์สีม่วงที่เกิดขึ้นบนแถบทดสอบและประมวลผลเปลี่ยนจากความเข้มสีเป็นระดับความเข้มข้นของพาราไทรอยด์ฮอร์โมนแล้วแสดงผลผ่านหน้าจอโทรศัพท์มือถือ

#### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในเลือดโดยใช้แอปพลิเคชันในโทรศัพท์มือถือ
- 2 เพื่อทดสอบความถูกต้องของชุดทดสอบภาคสนาม

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

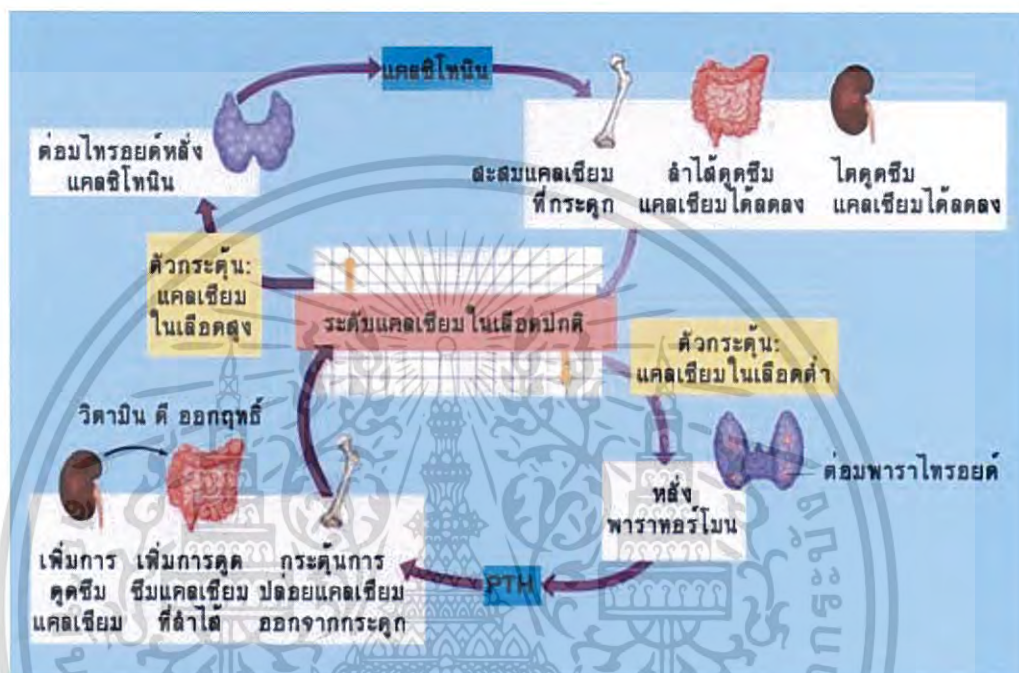
เริ่มจากสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง แล้วเริ่มสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน และศึกษาขนาดของอนุภาคทองที่สังเคราะห์ขึ้นโดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) และศึกษาสมบัติ Surface Plasmon resonance ของอนุภาคทองระดับนาโนในสารละลายตัวกลาง ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ พัฒนาหลักการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของพาราทอร์โมน โดยหลักการตรวจวัดจะอาศัยปฏิกิริยาระหว่างพาราทอร์โมนกับอนุภาคทองระดับนาโน ในลำดับต่อไป จะทำการออกแบบและพัฒนาชุดทดสอบ เมื่อได้ชุดทดสอบแล้ว จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้วิเคราะห์ได้ถูกต้องและใช้เวลาการวิเคราะห์ที่ไม่นาน แล้วจึงประเมินคุณลักษณะทางเคมีวิเคราะห์ของชุดทดสอบต่อไปจะทดสอบความถูกต้อง (Method validation) ของชุดทดสอบภาคสนามที่พัฒนาขึ้น ขั้นตอนสุดท้าย คือเผยแพร่ผลงานวิจัย ควบคู่ไปการดำเนินการจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร เพื่อดำเนินการต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับพาราทอร์โมนในเลือดที่จะพัฒนาในโครงการนี้ มุ่งหวังให้ประยุกต์ใช้กับงานวิเคราะห์กึ่งเชิงปริมาณ (Semi-quantitative analysis) โดยหวังว่า สามารถวิเคราะห์ระดับพาราทอร์โมนได้สะดวกและมีความแม่นยำ และสามารถนำไปใช้ในห้องผ่าตัด เพื่อรายงานผลได้อย่างรวดเร็ว ในลักษณะการใช้งานเพื่อตรวจวินิจฉัยที่ข้างเตียงผู้ป่วย (Point-of-care-testing, POCT)



ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ มีหน้าที่สำคัญในการรักษาระดับสมดุลของปริมาณแคลเซียมในเลือด โดยทำงานร่วมกับฮอร์โมนแคลซิโทนินจากต่อมไทรอยด์ กลไกการทำงานแสดงได้ดังรูปที่ 2.3 ในคนที่ เป็นโรคคอพอกที่มีอาการคอโต ต่อมพาราไทรอยด์อาจถูกกดบังด้วยเนื้อของต่อมไทรอยด์ การตัดส่วนของต่อมไทรอยด์ออกเพื่อรักษาอาการคอพอก จะต้องไม่ตัดต่อมพาราไทรอยด์ติดไปโดยเด็ดขาด เพราะจะทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิตอันเนื่องมาจากการขาดฮอร์โมนพาราไทรอยด์ได้



รูปที่ 2.3 แสดงการควบคุมสมดุลของระดับแคลเซียมในเลือด [2]

ความผิดปกติของร่างกายเนื่องจากฮอร์โมนต่อมพาราไทรอยด์ เป็นดังสรุป ต่อไปนี้

1. ภาวะพร่องฮอร์โมน (Hypoparathyroidism) จะทำให้การดูดกลับคืนของแคลเซียมที่ท่อของหน่วยไตลดน้อยลง เกิดการสูญเสียแคลเซียมไปในปัสสาวะ เป็นผลให้ระดับแคลเซียมลดต่ำลง ทำให้กล้ามเนื้อเกร็งและชักกระตุก เรียกออาการนี้ว่า อาการของทรูโซ (Trousseau's sign) การขาดพาราไทรอยด์ฮอร์โมนในวัยเด็กจะทำให้เด็กโตช้ากว่าปกติ ฟันขึ้นช้า และปัญญาอ่อน

ให้การรักษาโดยการฉีดแคลเซียมเพื่อเพิ่มระดับแคลเซียมในเลือดโดยเร็ว พร้อมกับให้วิตามินดี เพื่อเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมจากลำไส้ หรืออาจรักษาโดยการฉีดฮอร์โมนพาราไทรอยด์ร่วมกับการให้แคลเซียมและวิตามินดีเพื่อให้การรักษาได้ผลเร็ว แต่การรักษาโดยการฉีดฮอร์โมนอาจทำให้เกิดพิษ โดยทำให้เกิด Hypercalcemia ซึ่งมีผลทำให้แคลเซียมไปสะสมที่อวัยวะส่วนต่างๆ เช่น หัวใจ ไต และม้าม ทำให้เกิดนิ่วที่ไตได้

2. ภาวะมีฮอร์โมนมากเกินไป (Hyperparathyroidism) จะทำให้เกิดการดึงแคลเซียมจากกระดูกและฟันทออกมาในเลือด ทำให้ระดับแคลเซียมในเลือดสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดอาการกระดูกบาง ฟันหักและผุง่าย นอกจากนี้แคลเซียมจะไปสะสมที่อวัยวะต่างๆ ได้แก่ หัวใจ ไต ม้าม โดยเฉพาะที่ไตจะทำให้เกิดเป็นนิ่วขึ้นได้ และอาจทำให้เลือดไหลเวียนได้ไม่ค่อยดี

การรักษา Hypercalcemia ทำโดยการให้ฮอร์โมนแคลซิโทนิน เพราะเป็นฮอร์โมนที่มีผลทำให้แคลเซียมในเลือดลดลงอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.1.2 หลักการของวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) [4-6]

วิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นการประยุกต์ใช้การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเพื่อการวินิจฉัยโรค โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

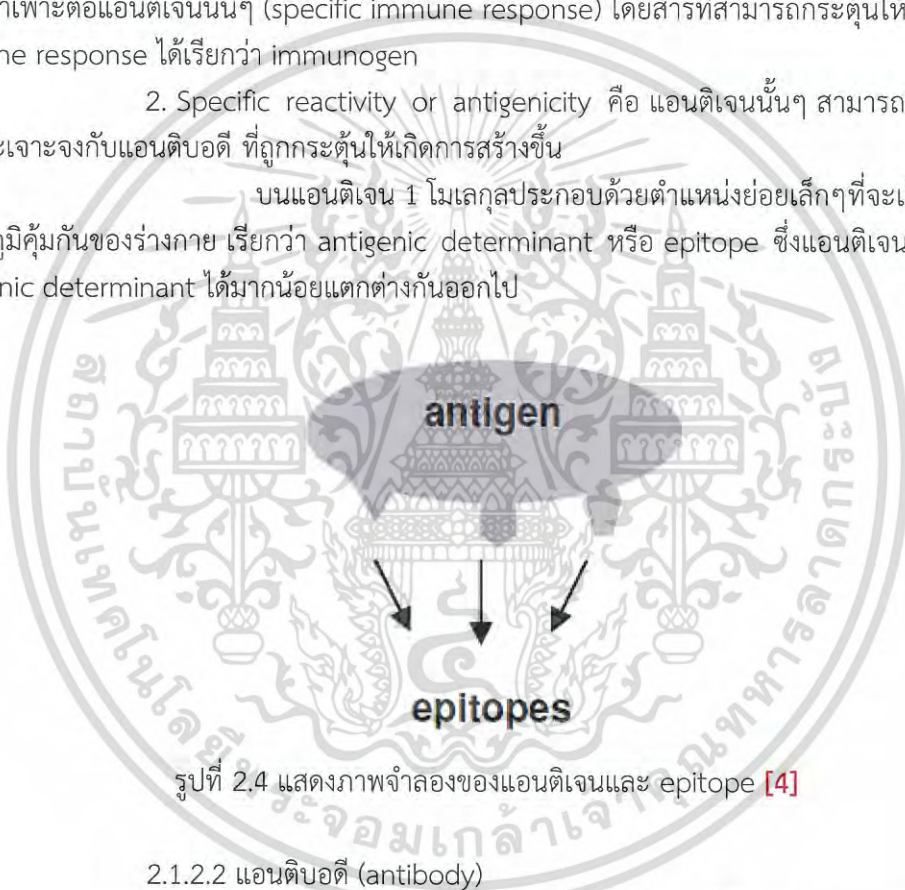
### 2.1.2.1 แอนติเจน (antigen)

แอนติเจนเป็นสารพอลิเมอร์ของโปรตีน ถือเป็นสิ่งแปลกปลอมของร่างกายที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกัน แอนติเจนจะไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนนั้นๆ โดยแอนติเจนต้องมีคุณสมบัติ 2 ประการ คือ

1. Immunogenicity คือ ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ (specific immune response) โดยสารที่สามารถกระตุ้นให้เกิด specific immune response ได้เรียกว่า immunogen

2. Specific reactivity or antigenicity คือ แอนติเจนนั้นๆ สามารถทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติบอดี ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างขึ้น

บนแอนติเจน 1 โมเลกุลประกอบด้วยตำแหน่งย่อยเล็กๆที่จะเป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เรียกว่า antigenic determinant หรือ epitope ซึ่งแอนติเจนแต่ละตัวจะมี antigenic determinant ได้มากน้อยแตกต่างกันออกไป



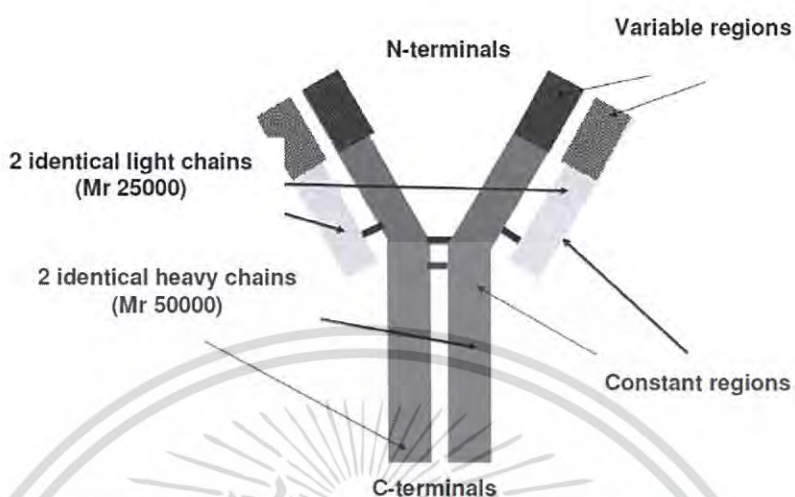
รูปที่ 2.4 แสดงภาพจำลองของแอนติเจนและ epitope [4]

### 2.1.2.2 แอนติบอดี (antibody)

แอนติบอดี (antibody) หรือ อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีหน้าที่ตรวจจับและทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น แบคทีเรีย และไวรัส โดยแอนติบอดีจะมีการทำงานอย่างจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนเป้าหมาย

โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีอยู่ในรูปตัววาย (Y shape) ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 เส้น คือ เส้นหนัก (heavy chain) 2 เส้น และเส้นเบา (light chain) 2 เส้น โดยเปรียบเทียบจากขนาดน้ำหนักโมเลกุล ส่วนที่โคนของตัววายของโมเลกุลแอนติบอดี เรียกว่า constant region จะบ่งบอกถึงชนิดของแอนติบอดีว่าเป็นคลาสใด เช่น IgG, IgA, IgM, IgD, IgE เป็นต้น

โดยที่ส่วนปลายของตัววายซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้จับกับแอนติเจนจะมีความหลากหลายไม่เหมือนกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด ในส่วนปลายนี้จะเรียกว่า variable region



รูปที่ 2.5 แสดงภาพจำลองโครงสร้างของแอนติบอดี [5]

### 2.1.2.3 ปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน

แอนติบอดีจะมีตำแหน่งที่สามารถยึดติดกับแอนติเจนได้อย่างน้อย 2 ด้าน ( 2 combining site) ส่วนแอนติเจนจะมีตำแหน่งที่สามารถยึดเกาะกับแอนติบอดีได้หลายด้านหรือหลาย epitope โดยทั่วไปเมื่อมีแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ร่างกายก็จะตอบสนองต่อแอนติเจนโดยการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมา ซึ่งมีสารสำคัญคือแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติและความสามารถในการจับกับแอนติเจนแปลกปลอมได้อย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้แอนติเจนนั้นๆหมดฤทธิ์ จากความสามารถในการทำปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีได้อย่างจำเพาะเจาะจงนี้ ทำให้สามารถนำคุณสมบัติดังกล่าวมาใช้ช่วยในการวินิจฉัยโรคต่างๆได้

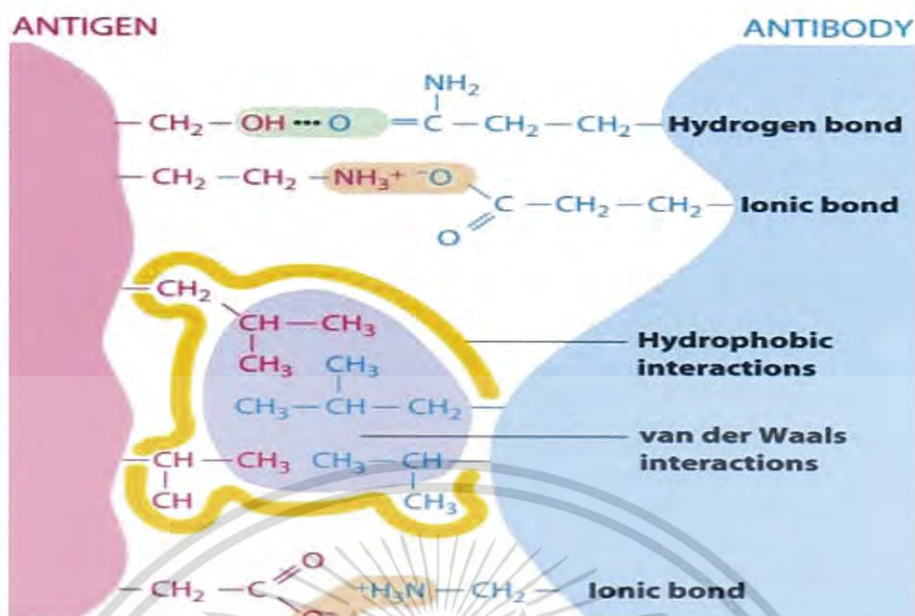
ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เกิดจาก non - covalent bond ซึ่งเป็นแรงอย่างอ่อน โดยแรงเหล่านี้ได้แก่

1. Electrostatic force (Coulombic force) เป็นแรงที่เกิดขึ้นเนื่องจากประจุที่ต่างกันระหว่าง แอนติเจนและแอนติบอดี

2. Hydrogen bonding force เป็นแรงที่เกิดจากการจับกันระหว่าง hydrophilic group เช่น -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH เป็นต้น แรงนี้ขึ้นกับความใกล้ชิดระหว่างโมเลกุลอย่างมาก

3. Hydrophobic force เป็นแรงที่เกิดจากการรวมตัวกันของสารพวก non-polar โดยจะนำส่วนที่เป็น hydrophobic group มารวมกัน

4. Van der Waals force เป็นแรงระหว่างโมเลกุลที่อยู่ใกล้ชิดกันแล้วเกิดปฏิกริยาระหว่าง external electron clouds เพื่อให้แรงดึงดูดของประจุอยู่ในสภาวะสมดุล



รูปที่ 2.6 แสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน

<https://www.slideshare.net/nidarehman1993/antigen-antibody-reactions-62260105>

สืบค้นเมื่อ มีนาคม 2560

นอกเหนือจากแรงทั้ง 4 ดังกล่าวแล้ว ลักษณะโครงสร้างของแอนติเจนและแอนติบอดี ก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้การจับกันแข็งแรงขึ้น นั่นคือ ถ้าโครงสร้างของโมเลกุลของแอนติเจนและแอนติบอดีมีความสอดคล้องกัน (complementary) เช่น ในลักษณะของแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key) การจับก็จะมั่นคงขึ้น และนอกจากนั้นสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ก็มีผลต่อการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีด้วย ได้แก่

1. pH: แอนติเจนและแอนติบอดี จะทำปฏิกิริยากันได้ค่อนข้างดีที่ pH 7.2-7.4 ที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้มากๆ การทำปฏิกิริยากันจะเกิดได้ไม่ดี
2. อุณหภูมิ: อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี จะอยู่ในช่วง 4-40°C ที่อุณหภูมิสูงเกินไป แอนติเจนและแอนติบอดีอาจเสียสภาพได้ (denature)
3. Ionic strength: ความเข้มข้นของ ion หรือ salt มีผลต่อการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีด้วย ความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมที่นิยมใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน คือ 0.15 M NaCl (0.9 % NaCl , isotonic solution) ซึ่งเป็น physiological salt solution หรือเรียกว่า normal saline solution (NSS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

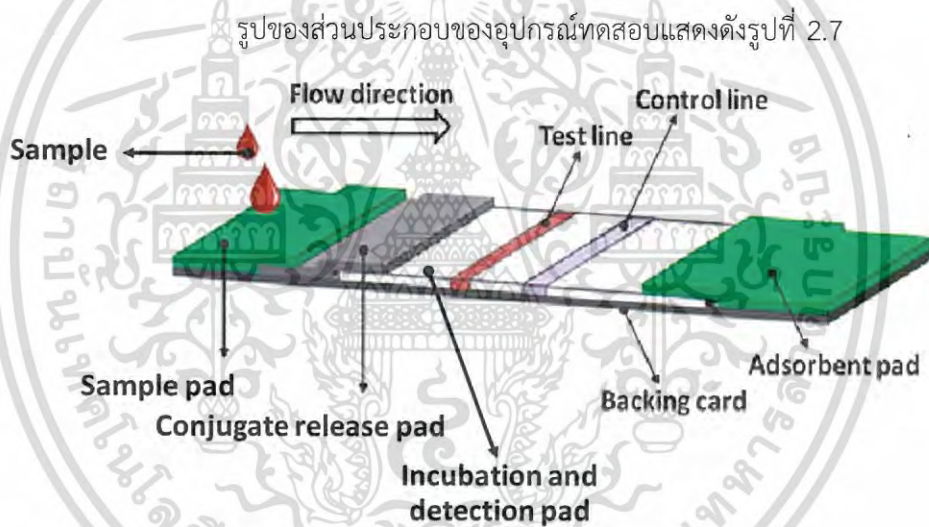
### 2.1.3 Lateral flow [7]

Lateral flow เป็นการตรวจสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกันโดยอาศัยการไหลของของเหลวตามแนวนอนบนแผ่นกระดาษ หรือเป็นที่รู้จักกันดีในรูปแบบของ 'test strip' ซึ่งการใช้รูปแบบการทดสอบดังกล่าวนี้มีข้อดีคือ

1. เป็นรูปแบบที่ใช้งานง่าย
2. สามารถทำการทดสอบและประเมินผลทดสอบได้อย่างรวดเร็ว
3. เป็นอุปกรณ์ทดสอบที่มีความเสถียร สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน
4. มีราคาไม่แพง

คุณสมบัติต่างๆเหล่านี้ ทำให้อุปกรณ์ทดสอบมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานภาคสนาม และเป็นอุปกรณ์ที่สามารถใช้เป็น 'point of care testing' ในการทดสอบทางด้านต่างๆ มากมาย เช่น ใช้ทางด้านทางการแพทย์ สิ่งแวดล้อม และทางการเกษตร เป็นต้น

#### 2.1.3.1 ส่วนประกอบของอุปกรณ์ทดสอบที่อาศัยหลักการ lateral flow [8]



รูปที่ 2.7 แสดงส่วนประกอบของอุปกรณ์ทดสอบ [8]

อุปกรณ์ทดสอบประกอบด้วย

1. conjugate release pad เป็นบริเวณที่ใช้ในการตรึง conjugate antibody โดยทั่วไปนิยมใช้อนุภาคทองคำนาโนหรืออนุภาคอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการเป็นตัวตรวจวัด ตรึงลงบนแผ่นกระดาษ
2. sample pad เป็นบริเวณที่ใช้ในการหยดสารตัวอย่างเพื่อการทดสอบ สามารถเตรียมได้โดย ใช้ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนจุ่มลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี Bovine serum albumin (BSA) และ TWEEN 20 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่งผสมอยู่
3. test line และ control line เป็นบริเวณที่แสดงผลการตรวจวัดและ บริเวณที่ใช้ควบคุมกระบวนการตรวจวัดตามลำดับ ทั้ง 2 บริเวณนี้แอนติบอดีจะถูกตรึงอยู่บนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนเช่นเดียวกันแตกต่างกันเพียงชนิดของแอนติบอดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

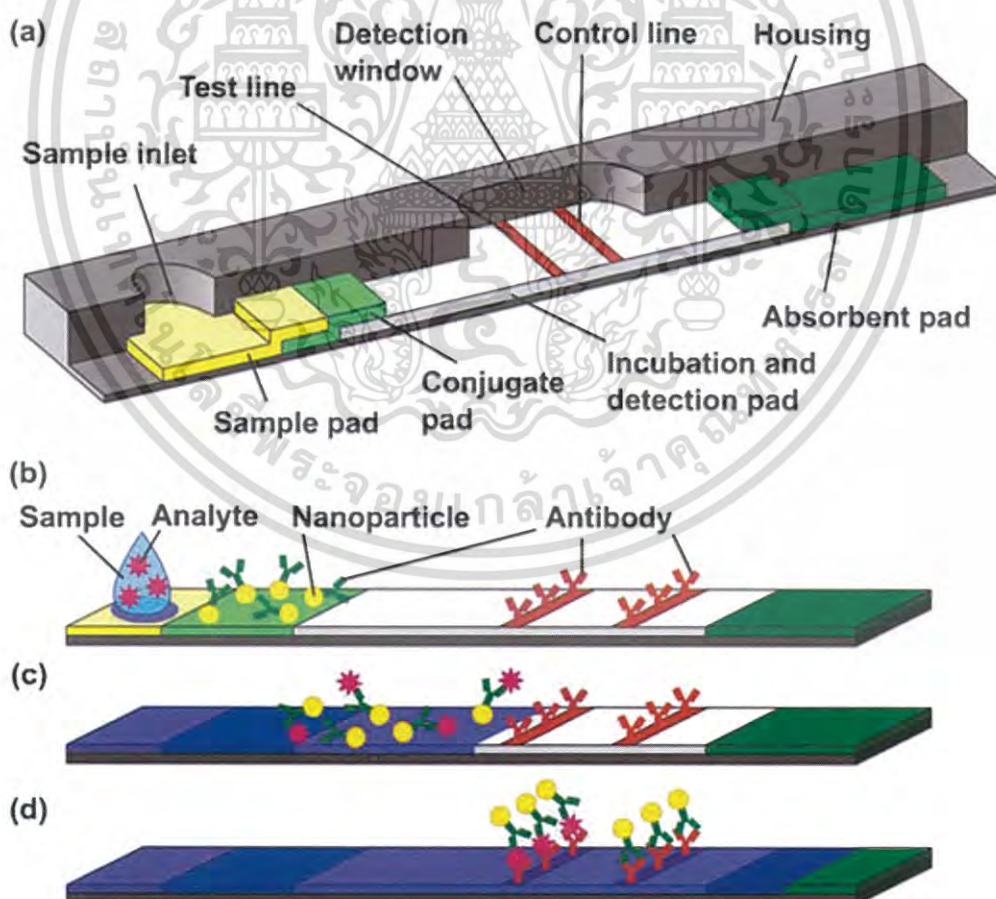
4. adsorbent pad เป็นบริเวณที่เปรียบเสมือนอ่างเก็บของเหลวที่ไหลผ่านอุปกรณ์ทดสอบ โดยอาศัยการดูดซึมของของเหลวลงบนรูพรุนของ adsorbent pad โดยนิยมใช้เซลลูโลสเป็นวัสดุ

5. incubation and detection pad เป็นบริเวณสำหรับการเกิดปฏิกิริยาและการตรวจวัด โดยหากสารตัวอย่างนั้นมีสารที่ต้องการวิเคราะห์ก็จะปรากฏแถบสีขึ้นทั้งบริเวณ test line และ control line แต่หากไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ก็จะปรากฏแถบสีขึ้นเพียงที่บริเวณ control line เท่านั้น

ส่วนประกอบต่างๆทั้งหมดนี้จะถูกยึดติดไว้โดย backing card ซึ่งทำมาจากพลาสติกแข็ง จากนั้นจะนำไปอบให้แห้งและเก็บไว้ในภาชนะที่ใส่สารดูดความชื้นและมีฝาปิด

#### 2.1.3.2 การทำงานของอุปกรณ์ทดสอบ [9]

เมื่อหยดสารตัวอย่างลงบนอุปกรณ์ทดสอบที่บริเวณ sample pad สารตัวอย่างจะเกิดการเคลื่อนที่ไปตามแรง capillary force และเมื่อถึงบริเวณ conjugate pad จะเกิดการจับกันระหว่าง conjugate แอนติบอดีและแอนติเจน ดังแสดงในรูป 2.8c จากนั้นสารจะเคลื่อนที่ต่อไปและถูกจับไว้ด้วยแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่บริเวณ test line และสำหรับ conjugate แอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจน จะเกิดการเคลื่อนที่และถูกจับด้วยแอนติบอดีตัวที่ 3 ที่บริเวณ control line ดังแสดงในรูป 2.8d



รูปที่ 2.8 แสดงการออกแบบและกลไกการทำงานของอุปกรณ์ทดสอบ [9]

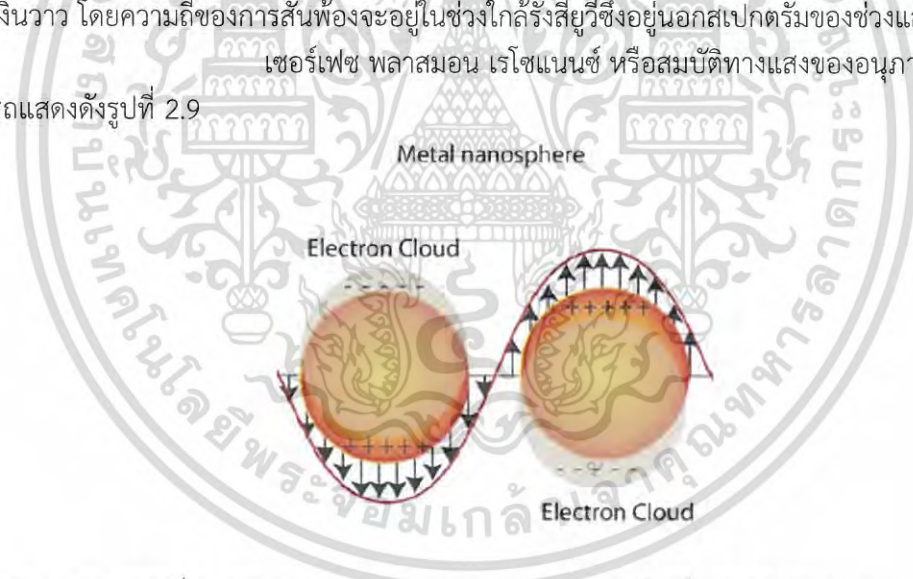
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.1.4 คุณสมบัติของอนุภาคทองคำนาโน [10 -11]

### 2.1.4.1 สมบัติทางแสง

สมบัติทางแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโน สามารถอธิบายได้ด้วยปรากฏการณ์เรโซแนนซ์พลาสมอน เรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) คือ ปรากฏการณ์เชิงแสง ซึ่งเกิดจากอันตรกิริยาของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและอิเล็กตรอนที่อยู่ในโลหะระดับนาโน กล่าวคือเมื่อมีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมาตกกระทบโลหะ กลุ่มหมอกอิเล็กตรอนที่ถูกจำกัดอยู่ในอนุภาคระดับนาโนจะเกิดการสั่นรวม (collective oscillation) และเมื่อคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมีความยาวคลื่นเดียวกันกับความยาวคลื่นที่อิเล็กตรอนสั่นในอนุภาคนาโน จะทำให้เกิดการสั่นพ้องขึ้น ซึ่งอันตรกิริยาที่แสงกระทำต่อโลหะจะเกิดได้สองแบบ คือ แสงจะตกกระทบและสะท้อนออกไปด้วยความยาวคลื่นเท่าเดิมทุกทิศทาง เรียกว่า การกระเจิง (scattering) และในขณะเดียวกัน บางโฟตอนก็จะถูกดูดกลืนและถูกเปลี่ยนไปเป็นพลังงานการสั่น ซึ่งเรียกว่า การดูดกลืนแสง (absorption) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยผิวต่อของโลหะกับสารไดอิเล็กทริก เช่น ระหว่างอนุภาคทองคำกับอากาศหรือสารละลาย โดยที่ขนาดของคลื่น และความกว้าง ของสเปกตรัมพลาสมอนเรโซแนนซ์ของวัสดุต่างๆ จะขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง ประเภทของวัสดุ และสภาพแวดล้อมรอบๆ วัสดุนั้น ด้วยปรากฏการณ์ SPR นี้ จะทำให้อนุภาคนาโนของทองคำมีสีแตกต่างกันจะเป็นสีเหลืองวาวอย่างที่พบได้ทั่วไป โลหะชนิดอื่นที่นอกเหนือจากทองคำก็สามารถแสดงปรากฏการณ์เชิงแสงในลักษณะเดียวกันนี้ได้เช่นกัน เช่น อนุภาคนาโนของเงินมีสีเหลืองเข้มแทนที่จะเป็นสีเงินวาว โดยความถี่ของการสั่นพ้องจะอยู่ในช่วงใกล้รังสียูวีซึ่งอยู่นอกสเปกตรัมของช่วงแสงที่มองเห็น

เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ หรือสมบัติทางแสงของอนุภาคระดับนาโน สามารถแสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 กระบวนการสั่นของพลาสมอน (plasmon oscillation) สำหรับอนุภาคนาโนทองคำระดับนาโน [10]

รูปที่ 2.8 แสดงกระบวนการสั่นของพลาสมอน แสดงให้เห็นการกระจัดของกลุ่มหมอกของประจุอิเล็กตรอน (conduction electron charge cloud) สัมพันธ์กับนิวเคลียสเมื่อได้รับแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ดังนั้นกลุ่มหมอกของอิเล็กตรอนอิสระจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสั่นพ้อง โดยความถี่ของการสั่นขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของอิเล็กตรอน (electron density) มวลสัมพัทธ์อิเล็กตรอน (effective electron mass) ขนาด รูปร่างของการกระจายของประจุ (charge distribution)

### 2.1.4.2 อนุภาคทองระดับนาโน

อนุภาคทองระดับนาโนเป็นอนุภาคทองที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากโลหะทองให้มีขนาดเล็กลงในระดับนาโนเมตร ทำให้อนุภาคทองระดับนาโนมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างไปจากทองปกติ เช่น มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไฟฟ้าได้ดี และมีสีที่เปลี่ยนแปลงตามขนาดของอนุภาค จากข้อดีต่างๆของอนุภาคทองระดับนาโนทำให้สามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อวิเคราะห์หาสารที่สนใจ

### 2.1.5 หลักการตรวจวัดที่เสนอในงานวิจัยนี้

หลักการตรวจวัดจะอาศัยปฏิกิริยาการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโน (Gold nanoparticles, AuNPs) เมื่อมีฮอร์โมนพาราไทรอยด์ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีม่วงขึ้น ความเข้มของสีม่วงจะแปรผันตรงกับปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์ในเลือด กลไกการตรวจวัดแสดงดังรูป 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงกลไกการตรวจวัดฮอร์โมนพาราไทรอยด์ที่เสนอในงานวิจัยนี้

## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ฮอร์โมนพาราไทรอยด์

#### 2.2.1.1 งานวิจัยที่อาศัยหลักการอิมมูโนวิทยา

การตรวจวัดโดยอาศัยหลักอิมมูโนวิทยาเป็นการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์สูง โดยการตรวจวัดจะอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี มีงานวิจัยมากมายนำหลักการนี้ไปประยุกต์ใช้ เช่น M. T. Julian และคณะ [12] ได้ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์หลังจากการผ่าตัดต่อมไทรอยด์ เพื่อใช้ในการทำนายประสิทธิภาพการทำงานของต่อมพาราไทรอยด์ในระยะยาว โดยทำการตรวจวัดระดับแคลเซียมและฮอร์โมนพาราไทรอยด์ในระยะเวลาหลังการผ่าตัด 24 ชั่วโมงและ 6 เดือน การตรวจวัดฮอร์โมนพาราไทรอยด์จะตรวจวัดโดยเครื่อง automated electrochemiluminescent immunoassay analyzer และสำหรับการตรวจวัดระดับแคลเซียมจะอาศัยการทำปฏิกิริยากับ o-cresolphthalein เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี จากการตรวจวัดพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์และแคลเซียม ต่ำกว่า 5.8 pg/mL และ 1.95 mmol/L ตามลำดับ จะมีความเสี่ยงต่อภาวะพร่องฮอร์โมนพาราไทรอยด์อย่างถาวร (permanent hypoparathyroidism)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E. P. Garcia-Santos และคณะ [13] ได้ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์ในระหว่างการผ่าตัดสำหรับผู้ป่วยที่มีระดับฮอร์โมนสูงกว่าปกติ การตรวจวัดจะใช้ immunochemiluminescence ร่วมกับ STAT system สำหรับการประมวลผล โดยทำการตรวจวัดระหว่างผ่าตัดและหลังการผ่าตัด 5 และ 10 นาที ตามลำดับ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินลักษณะการผ่าตัดให้ตรงกับผู้ป่วยเพื่อลดความเจ็บปวดและระยะเวลาในการพักรักษาในโรงพยาบาล จากการตรวจวัดผู้ป่วยจำนวน 91 ราย พบว่าผู้ป่วย 39 รายต้องใช้การวางยาสลบในการผ่าตัด ในขณะที่อีก 52 รายสามารถทำการผ่าตัดโดยการ block บริเวณคอ

V. Cote และคณะ [14] ได้ทำการตรวจวัดระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์สำหรับผู้ป่วยหลังการผ่าตัดต่อมไทรอยด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การตรวจวัดจะใช้ Roche Elecsys System 2010 electrochemiluminescence immunoassay ร่วมกับการตรวจวัดระดับแคลเซียมในเลือด พบว่า 43 % ของผู้ป่วยที่มีการพัฒนาสู่ภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ จะมีปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์ต่ำกว่าค่า cut-off (8 ng/L) 80 % ของผู้ป่วยที่มีการพัฒนาสู่ภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ จะมีปริมาณ PTH ต่ำกว่า 15 ng/L และ 2.2 % ของผู้ป่วยที่มีการตรวจพบฮอร์โมนพาราไทรอยด์ต่ำกว่า 15 ng/L ไม่มีการพัฒนาสู่ภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ

จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์จะอาศัยเครื่องมือทดสอบแบบอัตโนมัติและใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการประมวลผล จึงทำให้มีนักวิจัยได้พัฒนาการตรวจวัดขึ้นใช้โดยอาศัยหลักการอิมมูโนวิทยาเช่นเดียวกัน เช่น W.U. Dittmer และคณะ [15] ได้ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์โดยอาศัยอนุภาคแม่เหล็กติดฉลากร่วมกับการตรวจวัดแรงต้านทาน อนุภาคที่ติดฉลากด้วย conjugated antibody จะถูกกระตุ้นและเกิดการจับกับ target จากนั้นอนุภาคจะถูกส่งไปยังบริเวณพื้นผิวของเซนเซอร์ที่มี capture antibody ตรึงอยู่ ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ GMR วิธีการนี้มีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 10 pM และ 0.8 pM โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 15 นาที สำหรับการใช้อนุภาคขนาด 300 และ 500 nm ตามลำดับ

C. S. Simsek และคณะ [16] ได้พัฒนาการตรวจวัดโดยใช้ขั้วทองอิเล็กโทรดที่มีการดัดแปลงด้วย 6-mercaptohexanol และ silane ตรวจวัดโดยใช้ cyclic voltammetry และการวัดค่า impedance พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดระดับฮอร์โมนได้ในช่วงความเข้มข้น 10 – 50 pg/mL

นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาหลักการตรวจวัดประยุกต์ใช้สำหรับเป็นอุปกรณ์ point of care โดย V. Jarrige และคณะ [17] อาศัยการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีคุณสมบัติแม่เหล็กในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์ โดยฮอร์โมนพาราไทรอยด์จะถูกจับไว้โดยอนุภาคแม่เหล็กที่มีการติดแอนติบอดี (anti-N-terminal-PTH) จากนั้นอนุภาคจะเคลื่อนที่ด้วยแรงแม่เหล็กและถูกยึดติดไว้ที่บริเวณพื้นผิวของเซนเซอร์ที่มีการติดแอนติบอดีไว้ (anti-C-terminal-PTH) อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดได้ในระดับพิโคโมลาร์ โดยใช้เวลาในการตรวจวัดต่ำกว่า 10 นาที

### 2.2.1.2 งานวิจัยที่ใช้วิธีอื่นๆในการตรวจวัดฮอร์โมนพาราไทรอยด์

นอกจากงานวิจัยที่อาศัยหลักการอิมมูโนวิทยาสำหรับการตรวจวัดฮอร์โมนพาราไทรอยด์แล้ว ยังมีการใช้วิธีการอื่นๆ ได้แก่ M. Kamberi และคณะ [18] ได้ใช้ size exclusion chromatography ในการตรวจวัด hPTH โดยอาศัยปฏิกิริยา hydrophobic และ electrostatic กับสารที่บรรจุภายในคอลัมน์ ใช้ TFA 0.1% ใน 0.2 M โซเดียมคลอไรด์/อะซิโตนไนล์ อัตราส่วน 80 : 20 โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ และมี injection volume 40 ไมโครลิตร พบว่าการแยกสามารถเกิดได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 7 นาที

S. S. Rane และคณะ [19] ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์ โดยใช้ reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) และ ultra performance liquid chromatography (RP-UPLC) ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น Trifluoroacetic acid ในน้ำ และ Trifluoroacetic acid ในอะซิโตไนล์ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 17 นาที และ 2 นาที สำหรับ HPLC และ UPLC ตามลำดับ

E. E. Chambers และคณะ [20] ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพาราไทรอยด์โดยใช้ LC-MS/MS คอลัมน์ที่ใช้เป็นแบบ hybrid บรรจุอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 2 ไมครอน เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้คอลัมน์ C18 โดยมีกรดฟอร์มิกเป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 6 นาที โดยสามารถวิเคราะห์ได้ในช่วงความเข้มข้น 15 – 500 pg/mL

### 2.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิค lateral flow

เพื่อให้การตรวจวัดสามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว และสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์ point of care จึงทำให้มีงานวิจัยต่างๆนำเทคนิคที่อาศัยการไหลของสารบนกระดาษมาช่วยในการตรวจวัด เช่น Q. Yang และคณะ [21] ทำการตรวจวัด alpha fetoprotein โดยใช้ควอนตัมดอทเป็น Fluorescence biosensor ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดแบบ home made ตรวจวัดความเข้มแสงที่บริเวณ test line และ control line โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด 1 ng/mL และใช้เวลาในการตรวจวัด 10 นาที B. Wu และคณะ [22] ทำการตรวจวัด Salmonella pullorum โดยใช้อนุภาคนาโนที่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ทำการ spray แอนติเจนและแอนติบอดีลงบน nitrocellulose membrane แถบทดสอบนี้ใช้เวลาในการแปรผล 30 นาที D. Douglas และคณะ [23] ทำการตรวจวัด  $\beta$ -Lactam และ Flunixin ในน้ำนมดิบ เพื่อใช้ในการติดตามการตกค้างของยาปฏิชีวนะ และเปรียบเทียบผลวิเคราะห์กับเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิธีการตรวจวัดนี้สามารถวิเคราะห์ได้ต่ำกว่าระดับที่ประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดไว้ R. L. Liang และคณะ [24] ทำการตรวจวัด alpha fetoprotein โดยใช้ europium (III) chelate microparticles การวิเคราะห์ทำโดยการตรวจวัดอัตราส่วนความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ระหว่าง test line และ control line สามารถตรวจวัดได้ในช่วง 1.0-1000 IU/mL ใช้เวลา 15 นาที และ P. Preechakasedkit [25] และคณะ ทำการตรวจวัด Salmonella typhi โดยใช้อนุภาคนาโน ใช้เวลาในการตรวจวัด 15 นาที และมีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์  $1.14 \times 10^5$  cfu mL<sup>-1</sup> ซึ่งผลการตรวจวัดสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดด้วยตาเปล่า (naked eye) ได้

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ความบริสุทธิ์ (%)	ยี่ห้อและประเทศผู้ผลิต
กรดเตตระคลอโรอริก (Tetrachloroauric (III) acid)	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\geq 99.9$	Sigma-Aldrich, USA
โซเดียมซิเตรท ไดไฮเดรต (Sodium citrate tribasic dihydrate or Trisodium citratedihydrate)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\geq 99.0$	Sigma-Aldrich, USA
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	$\text{NaCl}$	99.5	LOBA Chemie, India
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	$\text{NaOH}$	98.0	Rankem, India
Anti – PTH (ab 53040)	-	$\geq 99.9$	Abcam, UK
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS)	-	$\geq 95$	Sigma-Aldrich, Switzerland
ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (parathyroid)	-	$\geq 95$	Sigma-Aldrich, USA

#### 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. ขวดวัดปริมาตร
2. ปีกเกอร์
3. ไมโครปิเปต
4. ขวดรูปชมพู่
5. เครื่องให้ความร้อนพร้อมการปั่นกวน - IKA<sup>®</sup> C-MAG HS 7
6. นาฬิกาจับเวลา
7. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) – FEI รุ่น TECNAI T20 G2, Netherlands
8. เครื่องวัด pH METTLER TOLEDO Five Easy Plus<sup>™</sup>, Germany
9. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง – Shimadzu, China
10. เครื่องเขย่าสาร – Vortex, Genie 2, USA
11. เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ - Jasco V630, USA
12. หลอดไมโครเซนติฟิวจ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. เครื่อง spin down – TOMOS laboratory products MiniStar Centrifuge, Singapore
14. อ่างควบคุมอุณหภูมิ – LAUDA AQUAline AL25, Germany

### 3.3 การเตรียมสารละลาย

สารละลายทุกตัวเตรียมจากน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ได้จากเครื่อง ZENEER UP 900 (human corporation, Korea ) และผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave (JSR model : JSAC – 60 Autoclave Steam Sterilizer, Korea) สารเคมีทุกตัวเป็นเกรดสำหรับงานวิเคราะห์ทางเคมี (Analytical Reagent Grade)

#### 3.3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)

1. สารละลายกรดเตตระคลอโรอริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก  
ละลายกรดเตตระคลอโรอริก 0.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น 100.00 มิลลิลิตร
2. สารละลายไตรโซเดียมไซเตรต ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก  
ละลายไตรโซเดียมไซเตรต 0.25 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น 25.00 มิลลิลิตร

#### 3.3.2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (PBS)

ละลาย PBS 1 แท็บเล็ต ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 200 ไมโครลิตร จะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.01 โมล / ลิตร

#### 3.3.3 การเตรียมสารละลายสำหรับการติด anti – PTH ลงบนอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)

1. สารละลาย anti – PTH ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร  
ปีเปตจากสารละลาย anti – PTH ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร มา 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 20 ไมโครลิตร
2. สารละลาย anti – PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร  
ปีเปตจากสารละลาย anti – PTH ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร มา 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 100 ไมโครลิตร
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร  
ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น 1.00 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมล / ลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น 1.00 มิลลิลิตร

## 5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1, 0.05 และ 0.01 โมล / ลิตร

เตรียมโดยปิเปตจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมล / ลิตร ที่เตรียมได้ในข้อ 4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน โดยปริมาตรที่ปิเปตและความเข้มข้นสุดท้ายเป็นดังตารางด้านล่าง

ปริมาตรที่ปิเปต (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร (โมล / ลิตร)
0.1	0.01
0.5	0.05
1	0.1

## 3.3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนพาราไทรอยด์

1. สารละลายมาตรฐานฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ความเข้มข้น  $5 \times 10^7$  พิโคกรัม / มิลลิลิตร ละลายฮอร์โมนพาราไทรอยด์ 50 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 1 มิลลิลิตร

2. สารละลายมาตรฐานฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000,  $5 \times 10^3$  และ  $5 \times 10^5$  พิโคกรัม / มิลลิลิตร  
เตรียมโดยปิเปตจากสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนพาราไทรอยด์ดังตารางด้านล่าง ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 1 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารละลาย ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ที่ใช้ในการปิเปต (พิโคกรัม / มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ปิเปต (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1.00 มิลลิลิตร (พิโคกรัม / มิลลิลิตร)
$5 \times 10^7$	10	$5 \times 10^5$
$5 \times 10^5$	10	$5 \times 10^3$
$5 \times 10^3$	200	1000
1000	100	100
100	100	10
10	100	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.4.1 การศึกษาสมบัติของอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)

##### 3.4.1.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

เทสสารละลายกรดเตตระคลอโรอริค ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ต้มจนเดือดพร้อมปั่นกวนด้วยความเร็วสูง เมื่อสารละลายเดือดเติมไตรโซเดียมไซเตรต ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว ให้ความร้อนต่อเป็นเวลา 15 นาที สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงไวน์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการใช้งานต่อไป

##### 3.4.1.2 การศึกษา surface plasmon band ของอนุภาคทองคำนาโน

การศึกษา surface plasmon band จะศึกษาโดยเทสสารละลายที่มีอนุภาคทองคำนาโนลงในควอร์ทเซลล์ (Lightpath Optical, UK) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 – 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี – วิซิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในการปรับค่าศูนย์ (auto – zero)

##### 3.4.1.3 การศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำนาโนด้วยเครื่อง TEM

นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้น มาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) จากนั้นทำการถ่ายภาพและประมวลผล

#### 3.4.2 การศึกษาเกี่ยวกับการติด anti – PTH ลงบนอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)

##### 3.4.2.1 การศึกษาอิทธิพลของ pH

1. ปิเปตสารละลายอนุภาคทองคำนาโน pH ต่างๆ ที่ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1, 0.05 และ 0.01 โมล / ลิตร เป็น pH 5 – 9 ตามลำดับ จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์

2. เติมสารละลาย anti - PTH ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร จำนวน 3 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 20 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4. นำไปสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการ auto zero

##### 3.4.2.2 การศึกษาอิทธิพลของปริมาตรของ anti – PTH

1. ปิเปตสารละลายอนุภาคทองคำนาโน pH 7.0 จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์

2. เติมสารละลาย anti - PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร จำนวน 3 - 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก จำนวน 20 ไมโครลิตร ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับปริมาตรเป็น 150 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4. นำไปสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี – วิซิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการ auto zero

### 3.4.2.3 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์

1. ปิเปตสารละลายอนุภาคทองคำนาโน pH 7.0 จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์

2. เติมสารละลาย anti - PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร จำนวน 15 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก จำนวน 5 - 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับปริมาตรเป็น 150 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4. นำไปสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการ auto zero

### 3.4.3 การศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti - PTH labeled AuNPs กับ antigen

#### 3.4.3.1 การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการทำปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายอนุภาคทองคำนาโน pH 7.0 จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์

2. เติมสารละลาย anti - PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร จำนวน 15 ไมโครลิตร

3. เติมสารละลายฮอริโมนพาราไทรอยด์ความเข้มข้นต่างๆจำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4. นำไปสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการ auto zero

5. ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 1 - 4 โดยเปลี่ยนสภาวะการทดลองเป็นทั้งสารละลายที่ได้จากข้อ 1 และ 2 ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาเติมฮอริโมนพาราไทรอยด์ความเข้มข้นต่างๆ

#### 3.4.3.1 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายอนุภาคทองคำนาโน pH 7.0 จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์

2. เติมสารละลาย anti - PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร จำนวน 15 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมสารละลายฮอร์โมนพาราไทรอยด์ความเข้มข้นต่างๆจำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
4. นำไปสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการ auto zero
5. ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 1 – 4 โดยเปลี่ยนสภาวะการทดลองเป็นอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



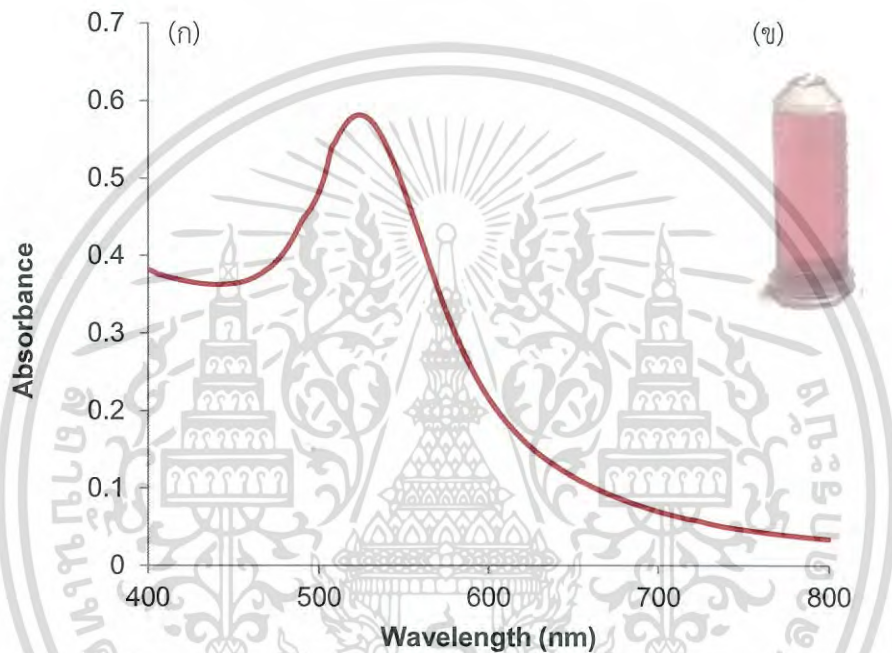
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การศึกษาสมบัติของอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) ที่สังเคราะห์ขึ้น

#### 4.1.1 การศึกษา surface plasmon band ของ AuNPs

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยใช้สารละลายกรดเตตระคลอโรอริกและสารละลายโซเดียมซิเตรต พบว่ามีลักษณะของ surface plasmon band แสดงดังรูปที่ 4.1

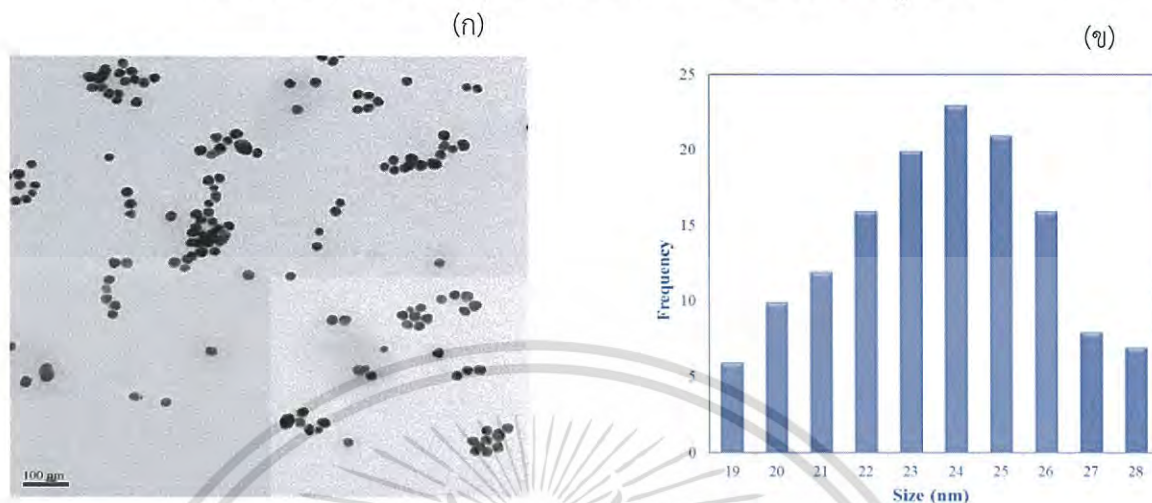


รูปที่ 4.1 (ก) แสดง surface plasmon band ของอนุภาคทองคำนาโน  
(ข) แสดงสีของสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้น

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 พบว่าสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีสีแดงไวน์ และเมื่อทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 นาโนเมตร พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร

#### 4.1.2 การศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำนาโนด้วยเครื่อง TEM

ผลการศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 (ก) แสดงลักษณะของอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากรูปถ่าย TEM

(ข) แสดงการกระจายของขนาดอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้

จากรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม และอนุภาคส่วนใหญ่มีขนาด 19 – 28 นาโนเมตร จึงอาจกล่าวได้ว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตรจริง และมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคแคบ กล่าวได้ว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดไม่แตกต่างกันมากเท่าใด คือมีลักษณะเป็น monodispersed nanoparticles

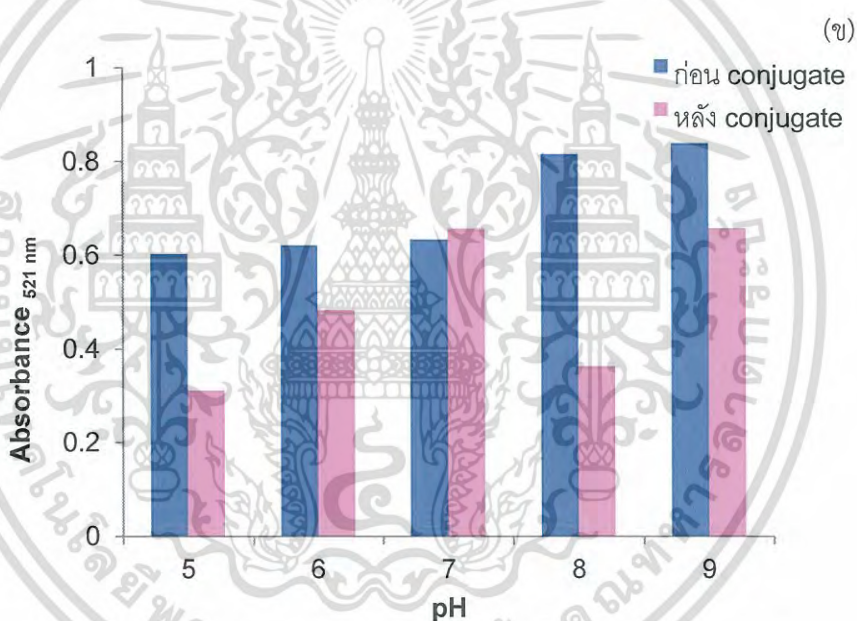
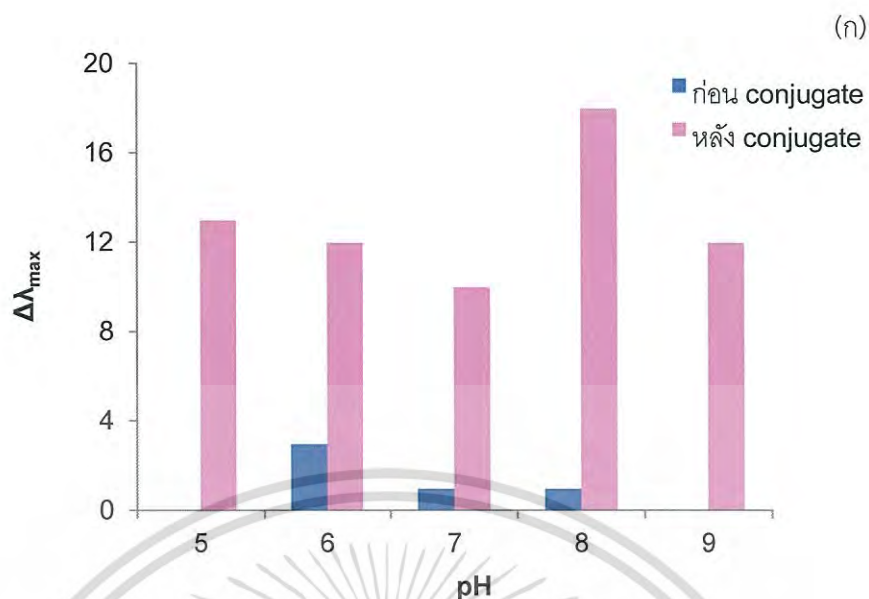
#### 4.2 การศึกษาเกี่ยวกับการติด anti – PTH ลงบนอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)

##### 4.2.1 การศึกษาอิทธิพลของ pH

ทำการศึกษาอิทธิพลของ pH โดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 โมล / ลิตร ในการปรับ pH ของสารละลายอนุภาคทองคำนาโนเป็น 5 – 9 ก่อนนำมาติด anti – PTH ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.3 (ก) และ (ข)

จากรูปที่ 4.3 (ก) พบว่า หลังการปรับ pH ที่ pH 5 และ 9 มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างจากค่าความยาวคลื่นของอนุภาคทองคำนาโนก่อนทำการปรับ pH จึงไม่ปรากฏสัญญาณความแตกต่างของค่าความยาวคลื่น ( $\Delta\lambda_{max}$ ) ในขณะเดียวกัน ที่ pH 6, 7 และ 8 มีค่า  $\Delta\lambda_{max}$  น้อย นั่นคือความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงแตกต่างไปจากค่าความยาวคลื่นของอนุภาคทองคำนาโนก่อนทำการปรับ pH เล็กน้อย สามารถกล่าวได้ว่า การปรับ pH ไม่มีผลต่อการเกิด self – aggregation ของอนุภาคทองคำนาโน และเมื่อทำการติด anti – PTH พบว่า อนุภาคทองคำนาโนหลัง conjugate ที่ pH ต่างๆ มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงแตกต่างไปจากค่าความยาวคลื่นของอนุภาคทองคำนาโนก่อนทำการปรับ pH อย่างไรก็ตาม พบว่า ที่ pH 7 มีค่าความแตกต่างของความยาวคลื่นน้อยที่สุด และเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4.3 (ข) พบว่าหลังการ conjugate อนุภาคทองคำนาโนที่ pH 7 จะมีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับเมื่อก่อน conjugate มากที่สุด นั่นคือ ที่ pH นี้การติด anti – PTH ไม่ทำให้อนุภาคทองคำนาโนเกิด self – aggregation จึงเลือกใช้อนุภาคทองคำนาโนที่ pH 7 ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



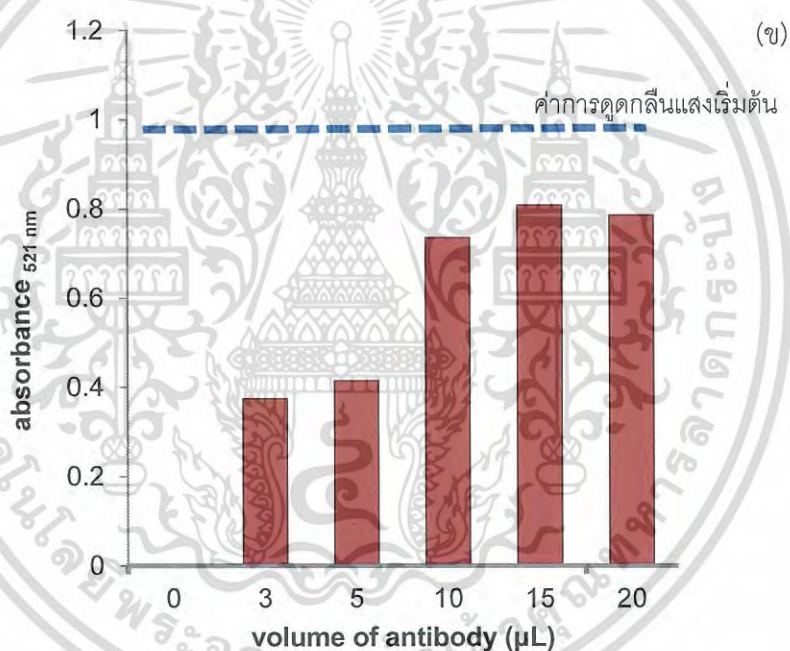
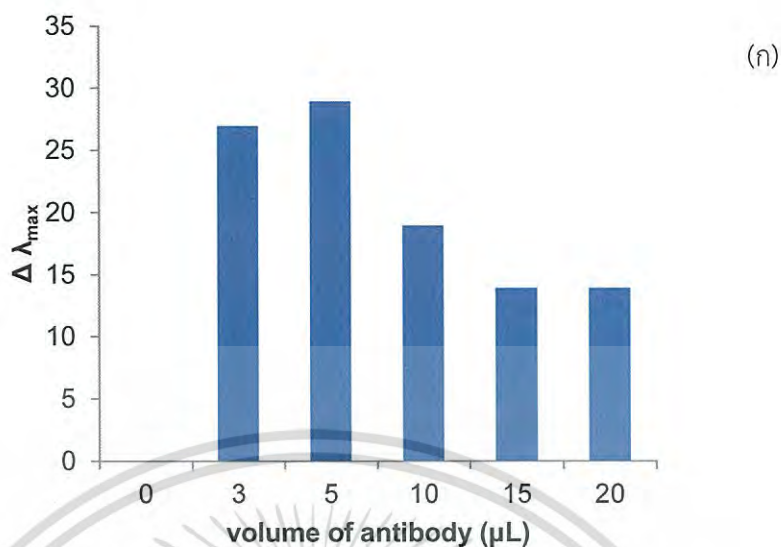
รูปที่ 4.3 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs สังเคราะห์ที่ได้และที่ pH ต่างๆ

(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs ที่ pH ต่างๆ (ที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร)

#### 4.2.2 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณของ anti - PTH

ทำการศึกษาอิทธิพลของปริมาณของ anti - PTH โดยใช้ anti - PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ปริมาตร 3 - 20 ไมโครลิตร นำมาติดบนอนุภาคทองคำนาโน pH 7 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่มีการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ลงไป 20 ไมโครลิตร ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.4 (ก) และ 4.4 (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้และที่หลังการเติมแอนติบอดีในปริมาณต่างๆ

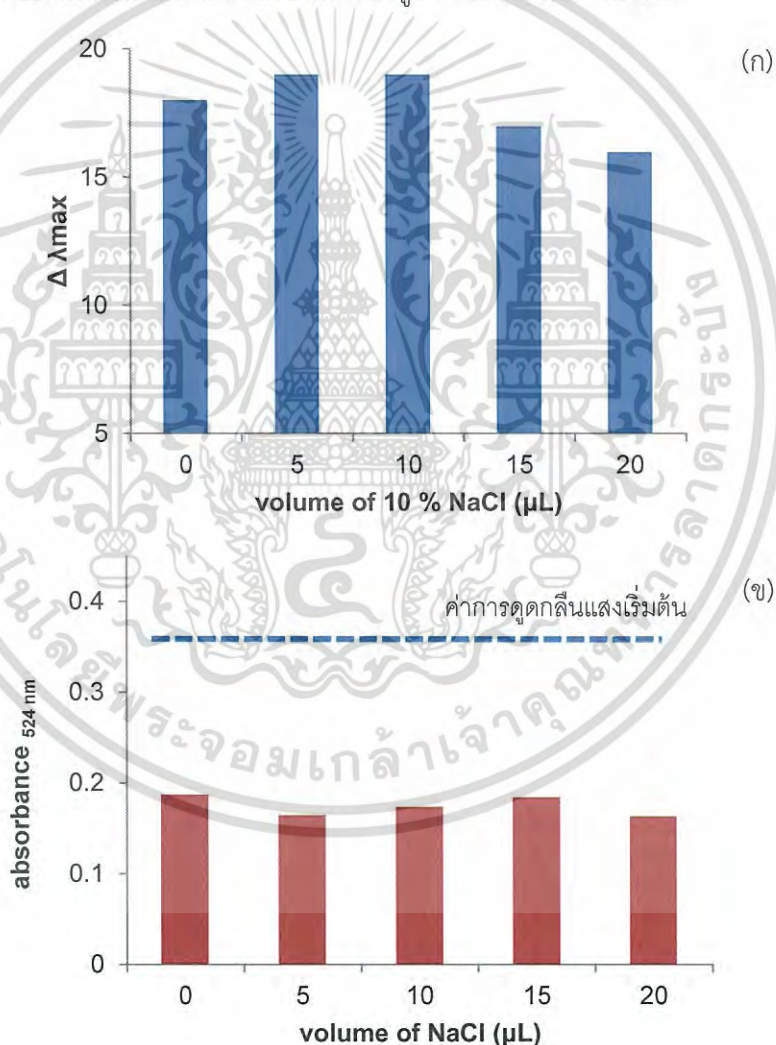
(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs หลังการเติมแอนติบอดีในปริมาณต่างๆ (ที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร)

เมื่อเติม anti - PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ลงในสารละลายอนุภาคทองคำนาโน pH 7 ที่มีการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงไป 20 ไมโครลิตร anti - PTH ที่เติมลงไปจะไปช่วยยับยั้งการเหนี่ยวนำให้เกิด self - aggregation ของอนุภาคทองคำนาโนโดยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ได้ จากรูปที่ 4.4 (ก) พบว่า ค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงสำหรับการเติม anti - PTH ปริมาตรต่างๆ มีค่าแตกต่างไปจากค่าความยาวคลื่นของอนุภาคทองคำนาโนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนเติม anti - PTH โดยที่การเติม anti - PTH ปริมาตร 15 ไมโครลิตร จะมีความแตกต่างของค่าความยาวคลื่นน้อยที่สุด สอดคล้องกับผลการทดลองรูปที่ 4.4 (ข) พบว่า การเติม anti - PTH ปริมาตร 15 ไมโครลิตร จะให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับเมื่อก่อนเติมแอนติบอดีมากที่สุด กล่าวคือ เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้อนุภาคทองนาโนเกิด self - aggregation จึงเลือกใช้ anti - PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ในการศึกษาอื่นๆต่อไป

#### 4.2.3 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์

ทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 - 20 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายอนุภาคทองนาโน pH 7 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ติด anti - PTH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.5 (ก) และ 4.5 (ข)



รูปที่ 4.5 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้และที่หลังการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณต่างๆ

(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs หลังการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณต่างๆ (ที่ความยาวคลื่น 524 นาโนเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5 (ก) พบว่า ค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงมีค่าแตกต่างไปจากค่าความยาวคลื่นของอนุภาคทองคำนาโนก่อนเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงไปจะเกิดการเหนี่ยวนำให้อนุภาคทองคำนาโนเกิด self – aggregation ส่งผลให้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงมีการ shift สอดคล้องกับผลการทดลองรูปที่ 4.5 (ข) พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 524 นาโนเมตร มีค่าลดลงหลังการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตรต่างๆลงในสารละลายอนุภาคทองคำนาโน อย่างไรก็ตาม พบว่า การเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 524 นาโนเมตรแตกต่างไปจากค่าความยาวคลื่นและค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายอนุภาคทองคำนาโนก่อนเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์น้อยที่สุด นั่นคือ เกิด self – aggregation น้อยที่สุด จึงเลือกการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ในการศึกษาอื่นๆต่อไป

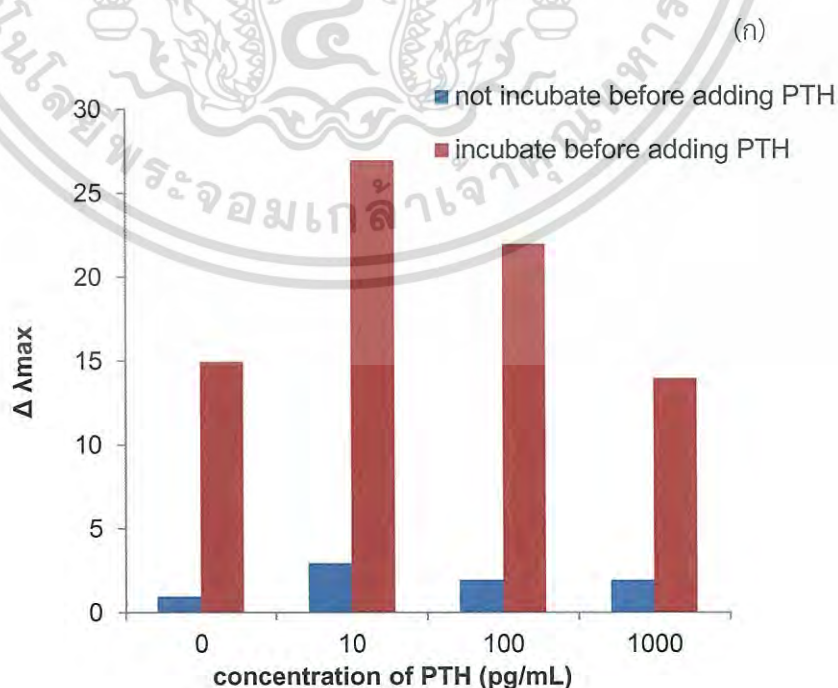
#### 4.3 การศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti – PTH labeled AuNPs กับ antigen

##### 4.3.1 การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการทำปฏิกิริยา

ทำการศึกษาอิทธิพลของเวลาในการทำปฏิกิริยา โดยทำการศึกษา 2 สภาวะ คือ

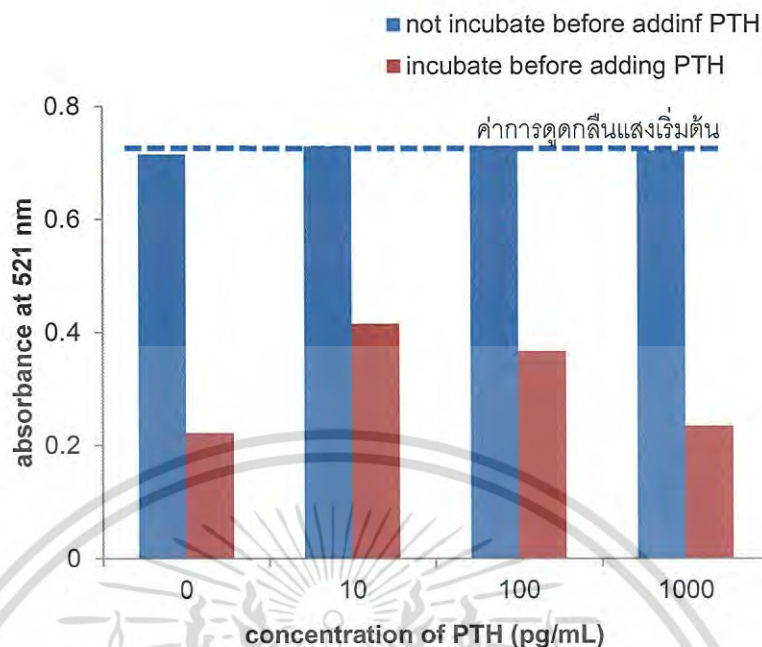
1. ไม่ incubate anti – PTH labeled AuNPs ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง
2. incubate anti – PTH labeled AuNPs เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen โดยทิ้ง anti – PTH labeled AuNPs ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.6 (ก) และ 4.6 (ข)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ข)



รูปที่ 4.6 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้และที่หลังการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในสภาวะต่างๆ

(ข) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs หลังการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในสภาวะต่างๆ (ที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร)

จากรูปที่ 4.6 (ก) พบว่า สภาวะการทดลองที่ไม่ incubate anti – PTH labeled AuNPs ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen จะมีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงแตกต่างไปจากค่าความยาวคลื่นของอนุภาคทองคำนาโนก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen น้อยกว่าสภาวะการทดลองที่มีการ incubate นั่นคือ หากไม่ทำการ incubate ก่อนทำปฏิกิริยาจะส่งผลทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยารวมตัว (aggregation) ของอนุภาคทองคำนาโน ทำให้ไม่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งต่างจากสภาวะการทดลองที่มีการ incubate จะมีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงแตกต่างไปจากค่าความยาวคลื่นของอนุภาคทองคำนาโนก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen มาก แสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยารวมตัว (aggregation) เกิดขึ้น เป็นไปตามหลักการตรวจวัด กล่าวคือ เมื่ออนุภาคทองคำนาโนทำปฏิกิริยากับ antigen จะเกิดการรวมตัวและสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีแดงไวน์เป็นสีม่วง สอดคล้องกับรูปที่ 4.6 (ข) จะเห็นได้ว่าสภาวะที่ไม่มีการ incubate ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนหลังทำปฏิกิริยากับ antigen ความเข้มข้นต่างๆ มีค่าต่างกันเพียงเล็กน้อยและมีค่าไม่แตกต่างจากค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนก่อนทำปฏิกิริยา ซึ่งต่างจากสภาวะการทดลองที่มีการ incubate พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนหลังทำปฏิกิริยากับ antigen ความเข้มข้นต่างๆ มีค่าต่างกัน จึงเลือกสภาวะการทดลองที่มีการ incubate สำหรับการศึกษานี้ต่อไป

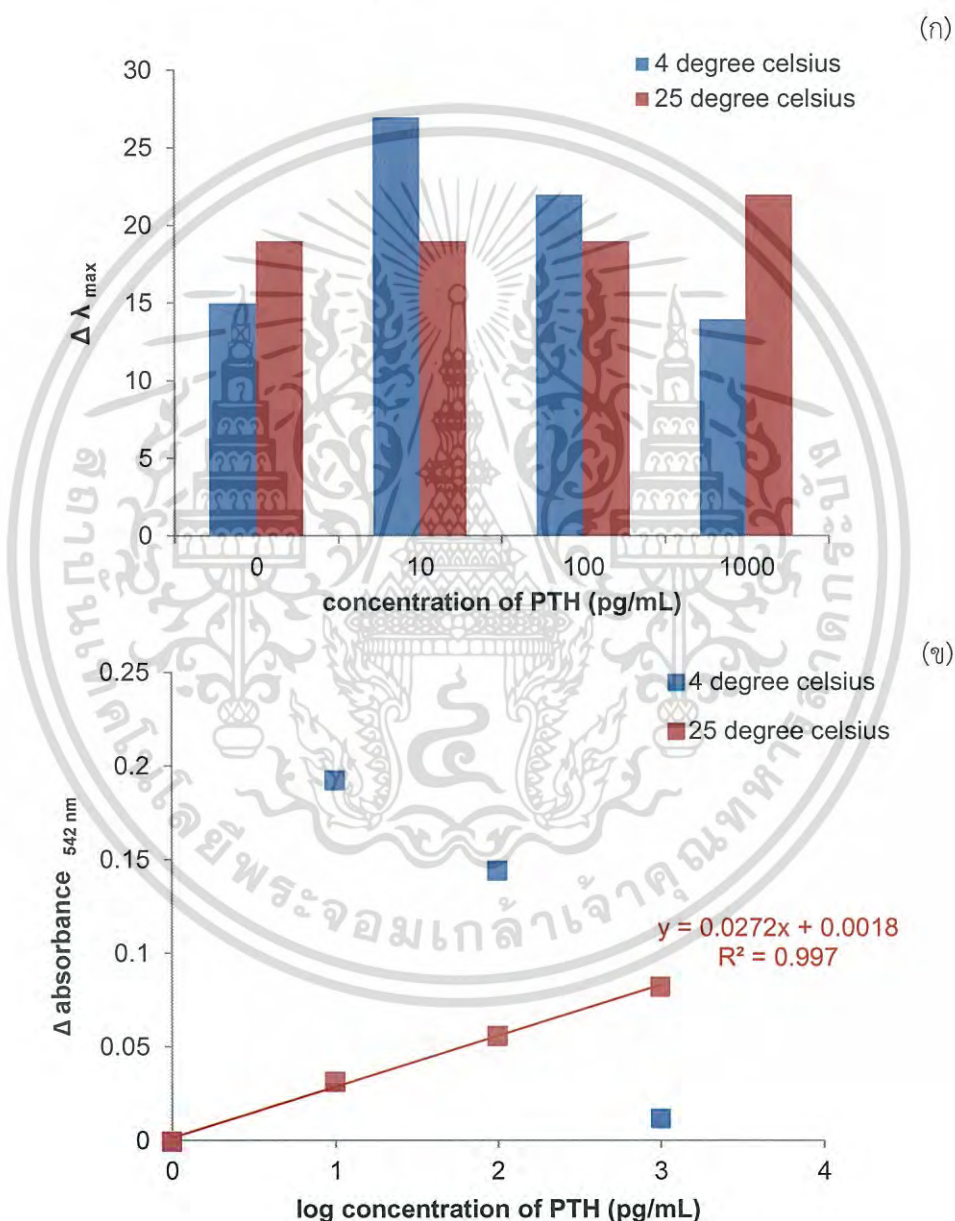
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.2 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา

ทำการศึกษอิทธิพลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา โดยทำการศึกษา 2 สภาวะ คือ

1. ทำปฏิกิริยาระหว่าง anti - PTH labeled AuNPs กับ antigen ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)
2. ทำปฏิกิริยาระหว่าง anti - PTH labeled AuNPs กับ antigen ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.7 (ก) และ 4.7 (ข)



รูปที่ 4.7 (ก) แสดงความแตกต่างของความยาวคลื่นของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้และที่หลังการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่อุณหภูมิต่างๆ

(ข) แสดงความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs หลังการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.7 (ก) พบว่า หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen ความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงทั้งสภาวะการทดลองที่ 4 และ 25 องศาเซลเซียส มีค่าแตกต่างกันไปจากค่าความยาวคลื่นของอนุภาคทองคำก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen ทั้งสิ้น แสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยาการรวมตัว (aggregation) เกิดขึ้นหลังการทำปฏิกิริยา ซึ่งเป็นไปตามหลักการการตรวจวัดที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากรูป 4.7 (ข) พบว่า การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่เป็นแนวโน้มตามความเข้มข้นของ antigen แตกต่างจากการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเป็นแนวโน้มตามความเข้มข้นของ antigen ในช่วงความเข้มข้น 10 – 1,000 พีโคกรัม / มิลลิลิตร และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสีใจที่ดี เนื่องจากอุณหภูมิมีส่วนช่วยในการเร่งให้เกิดการทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น จึงเลือกใช้การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในการศึกษาอื่นๆต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์ในเลือด โดยได้ทำการสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะต่างๆของอนุภาคทองคำนาโน และศึกษาอิทธิพลต่างๆที่ส่งผลในการ conjugate สารละลาย anti - PTH ลงบนอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้น แล้วจึงนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจวัดระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์ในเลือด โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคทองคำนาโนเมื่อมีฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์ได้ในช่วงความเข้มข้น 10 – 1,00 พิโคกรัม / มิลลิลิตร

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

การประยุกต์ใช้ชุดทดสอบภาคสนามควรมีการระมัดระวังการปนเปื้อน ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการตรวจวัดได้

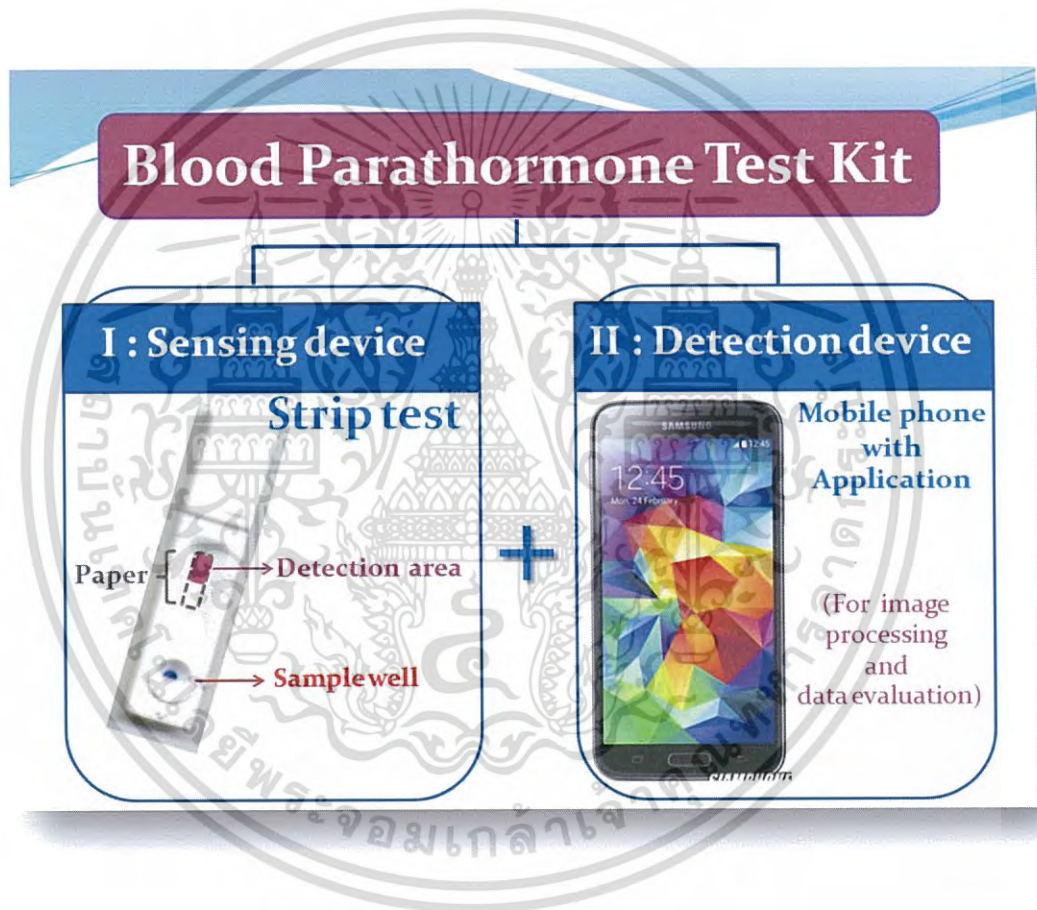


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 6

### สรุปผลผลิตงานวิจัย

ชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับพาราไทมอนในเลือด (Blood parathormone test kit)  
แสดงผังรูปด้านล่าง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- [1] นายแพทย์เจษฎา กาญจนอัมพร. Collective Review Parathyroid disorder. **จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.**
- [2] บทที่ 4 ฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ พาราไทรอยด์ และต่อมหมวกไต  
([http://www.il.mahidol.ac.th/emedial/hormone/chapter4/parathyroid\\_hormone.htm](http://www.il.mahidol.ac.th/emedial/hormone/chapter4/parathyroid_hormone.htm)  
สืบค้นเมื่อ มีนาคม 2560)
- [3] หน่วยที่ 9 ฮอร์โมน  
(<http://www.ipesp.ac.th/learning/biocheme/html/bt9.pdf> สืบค้นเมื่อ มีนาคม 2560)
- [4] อ.นพ. สุวิน ว่องวัจนะ. แอนติเจน (Antigen). MC079.  
([http://file.siam2web.com/siam85/pdf/201086\\_41733.pdf](http://file.siam2web.com/siam85/pdf/201086_41733.pdf) สืบค้นเมื่อ มกราคม 2560)
- [5] สารต้านภูมิคุ้มกัน  
(<https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%A0%E0%B8%B9%E0%B8%A1%E0%B8%B4%E0%B8%95%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%97%E0%B8%B2%E0%B8%99> สืบค้นเมื่อ มีนาคม 2560)
- [6] อ.นพ.สุวิน ว่องวัจนะ. ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในห้องปฏิบัติการ. MC089.  
(<http://www.chem.science.cmu.ac.th/userfiles/chm009/file/Ag-Ab%20reaction.pdf>  
สืบค้นเมื่อ มกราคม 2560)
- [7] TechNote 303. Lateral Flow Tests. **Bangs Laboratories, Inc.**
- [8] K. M. Koczula and A. Gallotta. 2016. Lateral flow assays. **Essays In Biochemistry.** 60 (1): 111-120.
- [9] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. Stetten and R. Zengerle. 2010. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. **Chemical Society Reviews.** 39: 1153-1182.
- [10] อภิวัฒน์ ชมภูสอ. โครงสร้างระดับนาโนของทอง: การสังเคราะห์และการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง. 2013. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข. ปีที่ 41.** 44: 859-872.
- [11] กฤษกร ไล่เจริญรัตน์ และ ภัทธิยา กิตติเดชาชาญ. 2556. การสร้างเครื่องมือเครื่องมือวัดทางแสงเชิงเส้นตรงและการศึกษาลักษณะสมบัติทางแสงบนพื้นผิวโลหะขนาดจิว. **สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.**
- [12] M. T. Julian, J. M. Balibrea, M. L. Granada, P. Moreno, A. Alastrue, M. Puig-Domingo and A. Lucas. 2013. Intact parathyroid hormone measurement at 24 hours after thyroid surgery as predictor of parathyroid function at long term. **The American Journal of Surgery.** 206: 783-789.
- [13] E. P. García-Santos, J. Martín-Fernández, A. Gil-Rendo, B. Menchén-Trujillo, F. M. de Paz, M. C. Manzaneres-Campillo, V. Muñoz-Atienza and S. Sánchez-García. 2014. Rapid intraoperative determination of intact parathyroid hormone during surgery for primary hyperparathyroidism. Experience at our center. **ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN.** 61 (1): 3-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [14] V. Cote, N. Sands, M. P. Hier, M. J. Black, M. Tamilia, E. MacNamara, X. Zhang, and R. J. Payne. 2008. Cost savings associated with post-thyroidectomy parathyroid hormone levels. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 138: 204-208.
- [15] W. U. Dittmer, P. de Kievit, M. W. Prins, J. L. M. Vissers, M. E. C. Mersch and M. F. W. C. Martens. 2008. Sensitive and rapid immunoassay for parathyroid hormone using magnetic particle labels and magnetic actuation. *Journal of Immunological Methods*. 338: 40-46.
- [16] C. S. Simsek, M. N. S. Karaboğa and M. K. Sezgintürk. 2015. A new immobilization procedure for development of an electrochemical immune sensor for parathyroid hormone detection based on gold electrodes modified with 6-mercaptophexanol and silane. *Talanta*. 144: 210-218.
- [17] V. Jarrige, J. H. Nieuwenhuis, J. P. H. F. van Son, M. F. W. C. Martens and J. L. M. Vissers. 2011. A fast intraoperative PTH point-of-care assay on the Philips handheld magnotech system. *Langenbecks Arch. Surg.* 396: 337-343.
- [18] M. Kamberi, P. Chung, R. DeVas, L. Li, Z. Li, X. Ma (Sharon), S. Fields and C. M. Riley. 2004. Analysis of non-covalent aggregation of synthetic hPTH (1-34) by size-exclusion chromatography and the importance of suppression of non-specific interactions for a precise quantitation. *Journal of Chromatography B*. 810: 151-155.
- [19] S. S. Rane, A. Ajameri, R. Mody and P. Padmaja. 2012. Development and validation of RP-HPLC and RP-UPLC methods for quantification of parathyroid hormones (1-34) in medicinal product formulated with meta-cresol. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2 (2): 136 – 142.
- [20] E. E. Chambers, M. E. Lame, J. Bardsley, Sally Hannam, C. Legido-Quigley, N. Smith, K. J. Fountain, E. Collins and E. Thomas. 2013. High sensitivity LC-MS/MS method for direct quantification of human parathyroid 1-34 (teriparatide) in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 938: 96- 104.
- [21] Q. Yang, X. Gong, T. Song, J. Yang, S. Zhu, Y. Li, Y. Cui, Y. Li, B. Zhang and J. Chang. 2011. Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein. *Biosensors and Bioelectronics*. 30: 145- 150.
- [22] B. Wu, X. Zhang, W. Pan, L. Zhang and F. Zhang. 2015. Determination of Salmonella pullorum with Nanoparticles Immune Based Lateral Flow Strip Assay. *Advances in Microbiology*. 5: 364-369.
- [23] D. Douglas, K. Banaszewski, R. Juskelis, F. Al-Taher, Y. Chen, J. Cappozzo, L. Mcrobbie, and R. S. Salter. 2012. Validation of a Rapid Lateral Flow Test for the Simultaneous Determination of b-Lactam Drugs and Flunixin in Raw Milk. *Journal of Food Protection*. 75 (7): 1270-1277.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

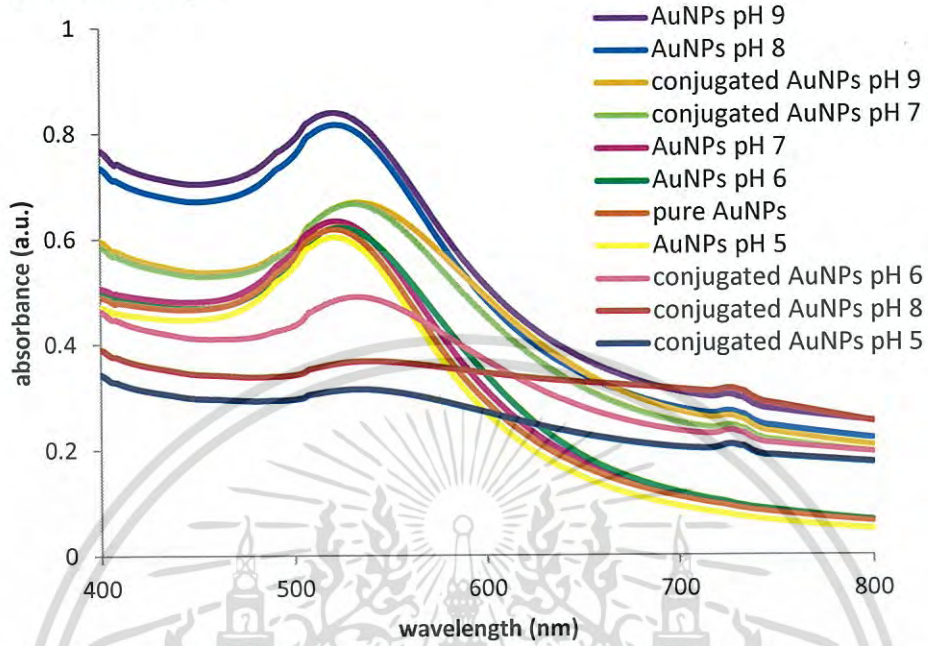
- [24] R. L. Liang, X. P. Xu, T. C. Liu, J. W. Zhou, X. G. Wang, Z. Q. Ren, F. Hao and Y. S. Wu. 2015. Rapid and sensitive lateral flow immunoassay method for determining alpha fetoprotein in serum using europium (III) chelate microparticles-based lateral flow test strips. *Analytica Chimica Acta*. 891: 277 – 283.
- [25] P. Preechakasedkit, K. Pinwattana, W. Dungchai, W. Siangproh, W. Chaicumpa, P. Tongtawe and O. Chailapakul. 2012. Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of *Salmonella typhi* in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*. 31: 562–566.



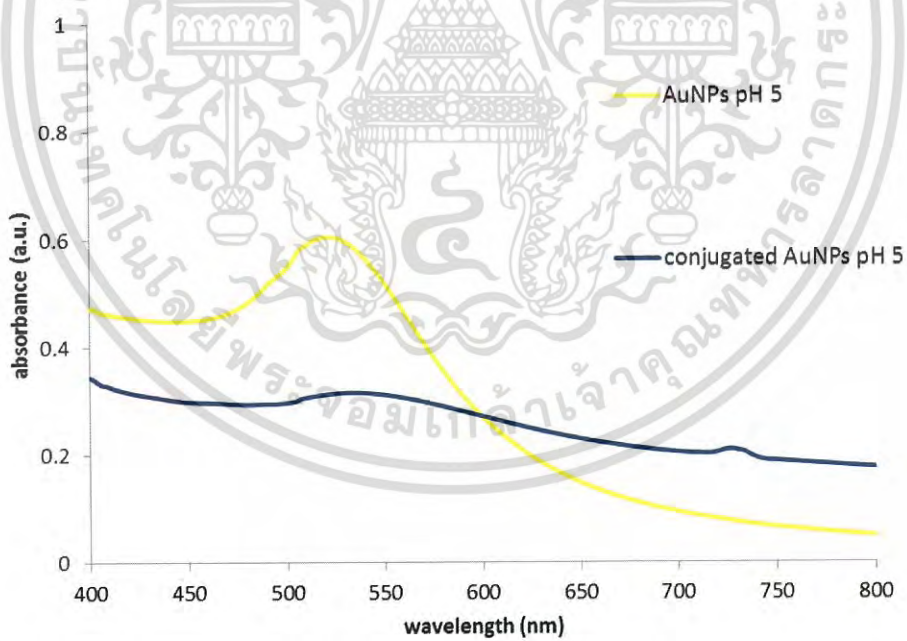
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก.

### 1. การศึกษาอิทธิพลของ pH

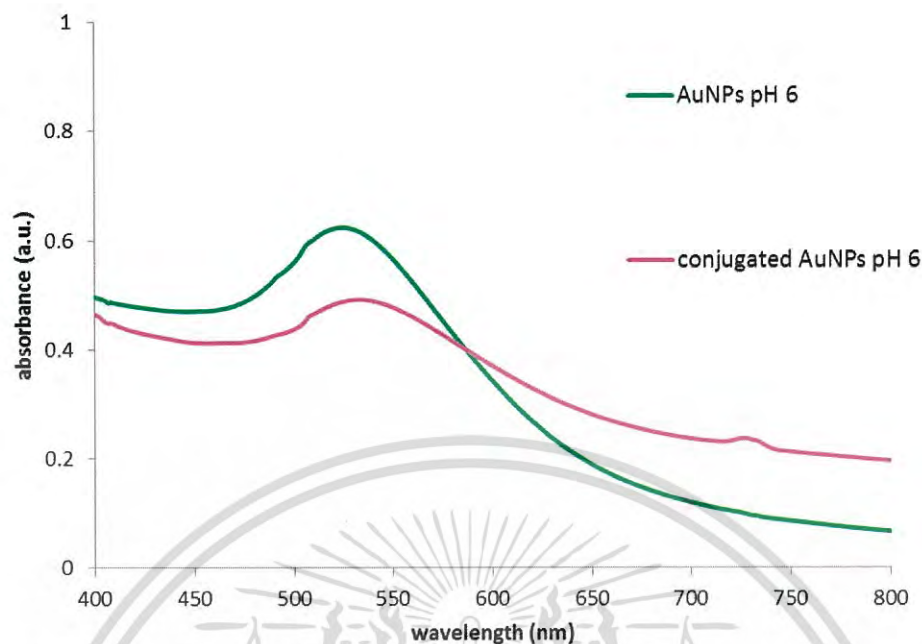


รูปที่ ก.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate

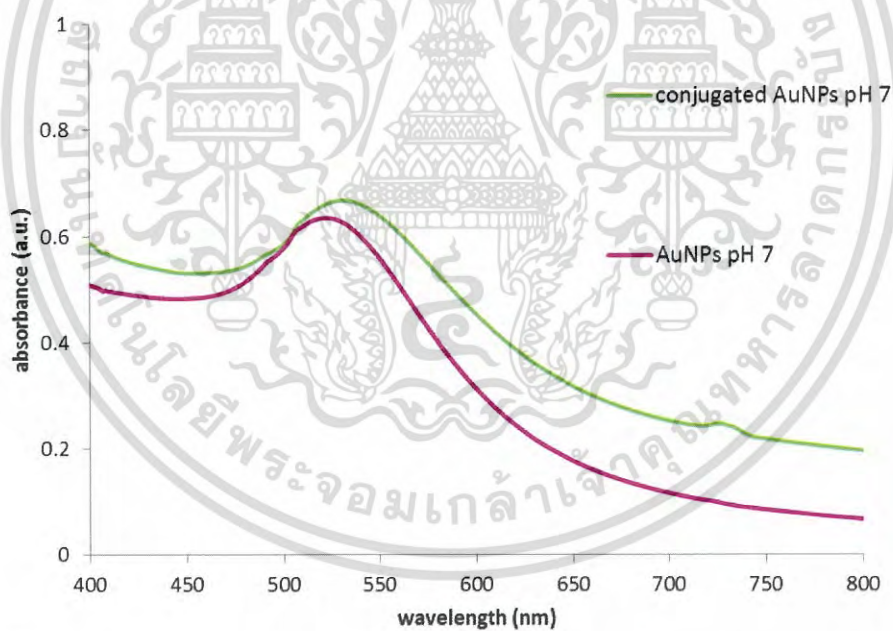


รูปที่ ก.2 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

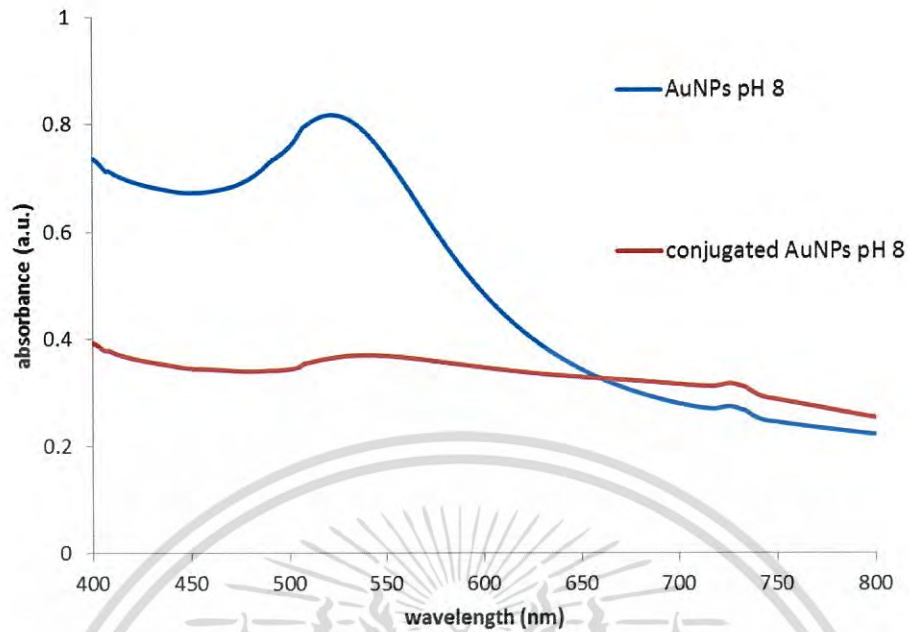


รูปที่ ก.3 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 6

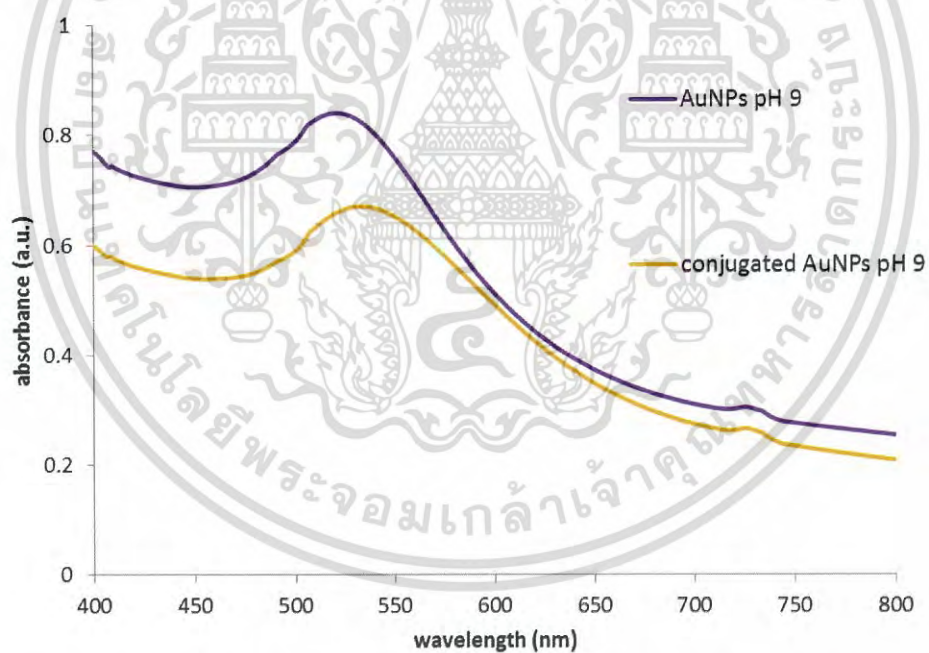


รูปที่ ก.4 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



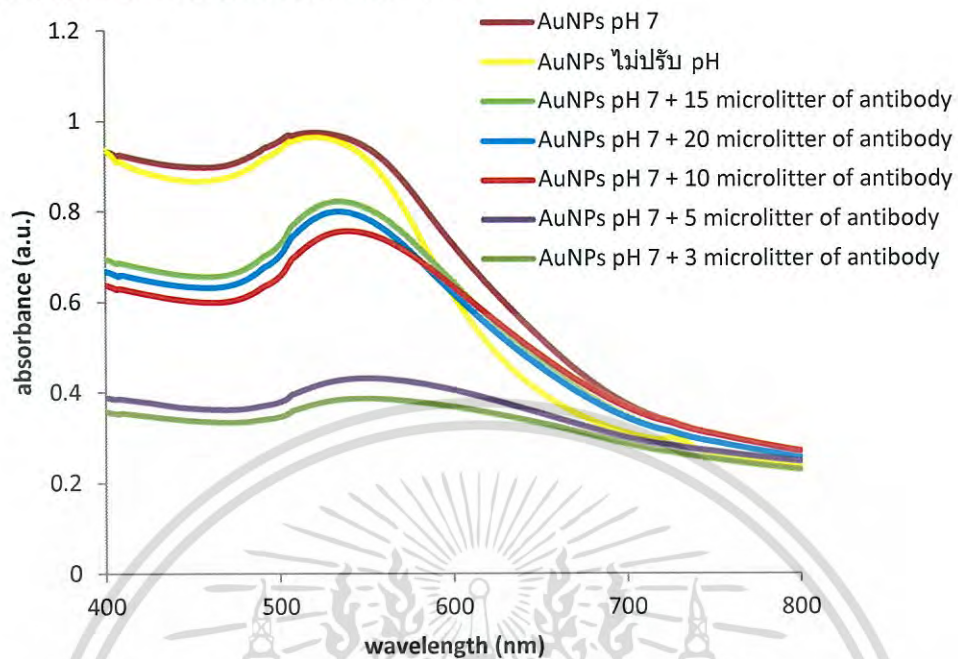
รูปที่ ก.5 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 8



รูปที่ ก.6 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ก่อนและหลังการ conjugate ที่ pH 9

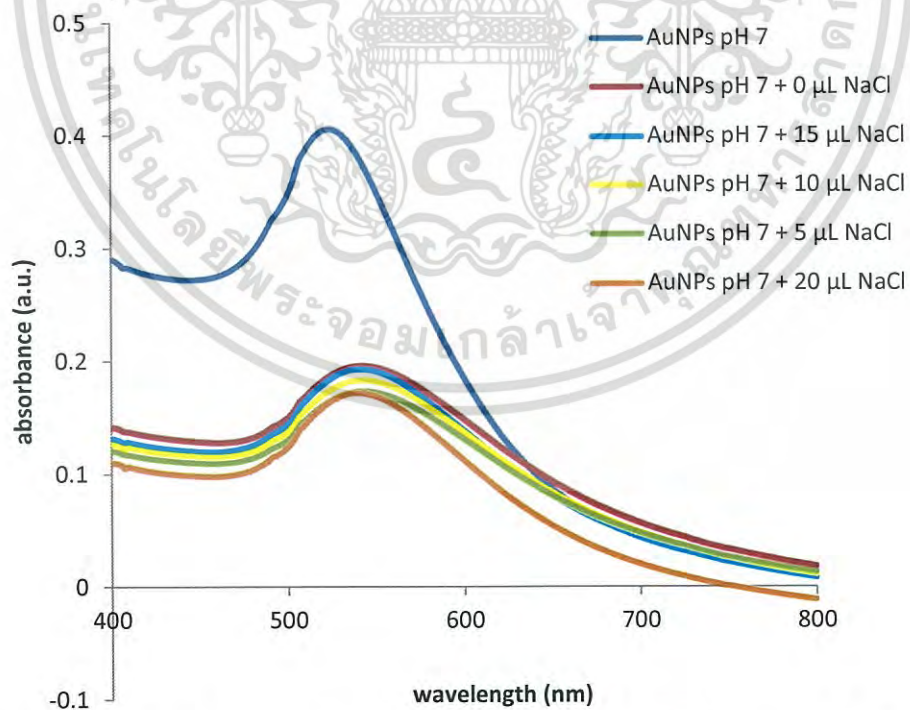
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การศึกษาอิทธิพลของปริมาณของ anti - PTH



รูปที่ ข.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ที่เติมแอนติบอดี ปริมาตรต่างๆ

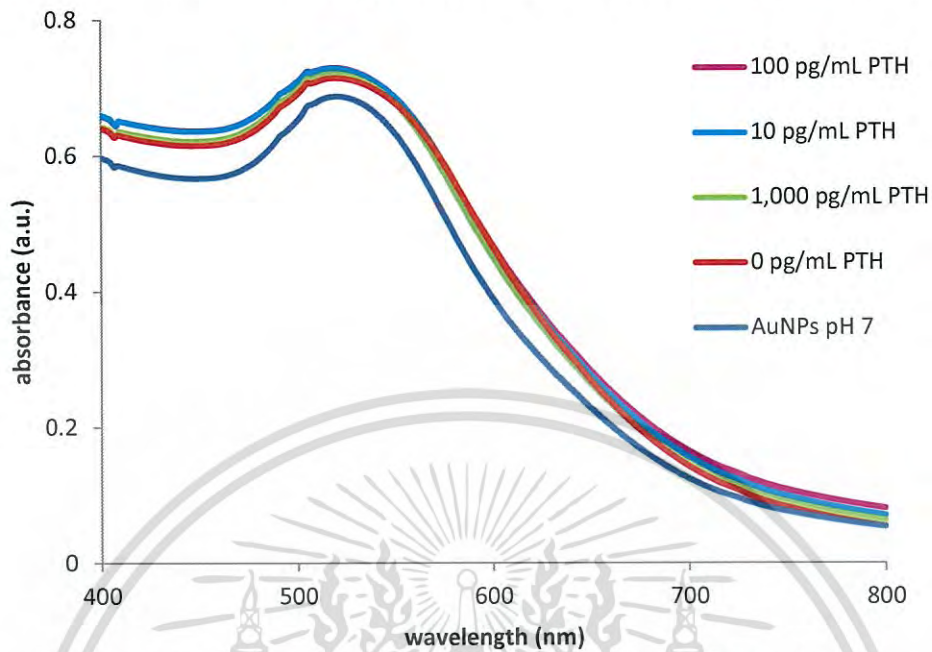
## 3. การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์



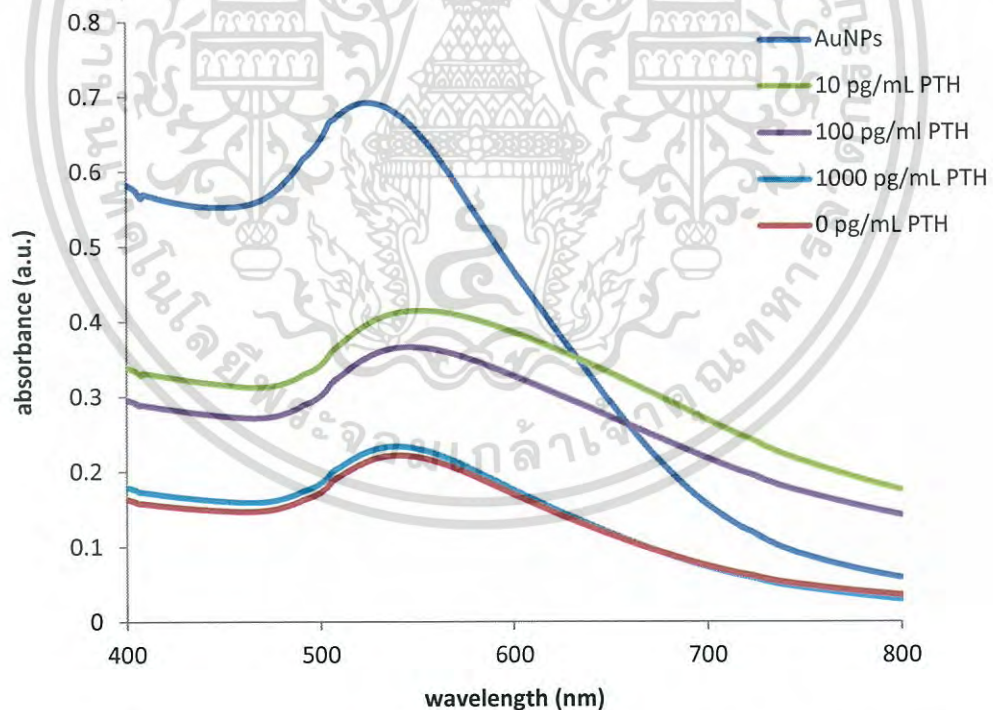
รูปที่ ค.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles ที่เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตรต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การศึกษาอิทธิพลของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti - PTH labeled AuNPs กับ antigen



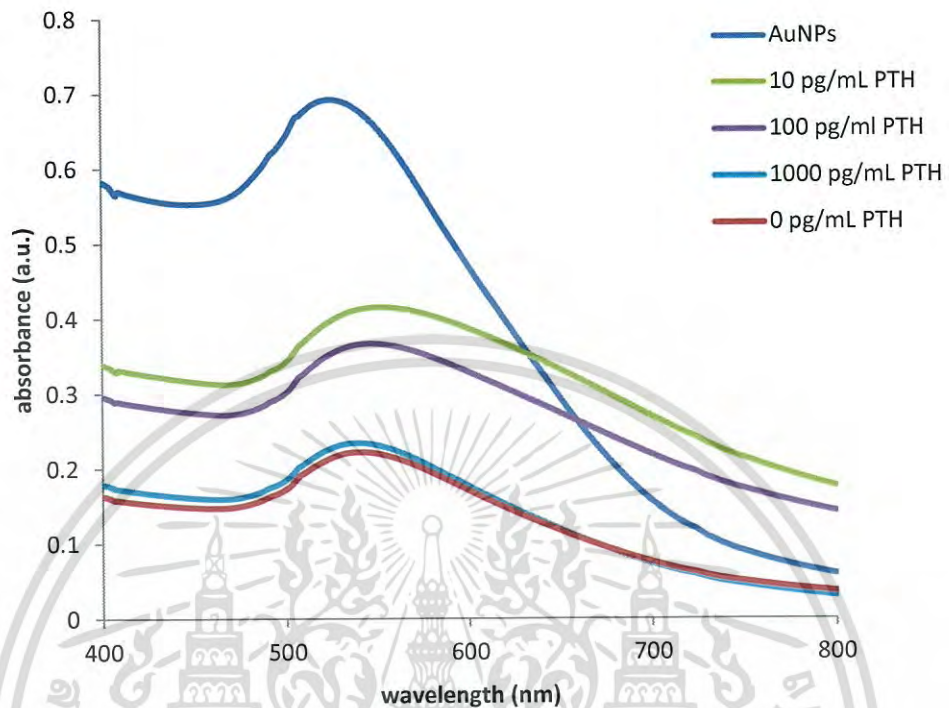
รูปที่ 1.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen โดยไม่มีการ incubate ก่อนเติม antigen



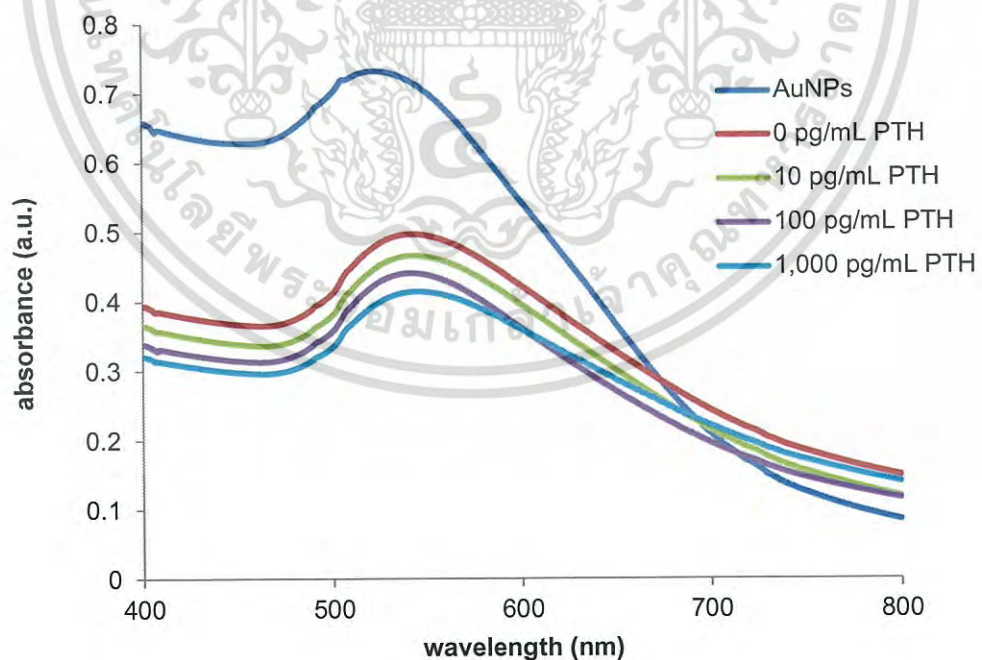
รูปที่ 1.2 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen โดยมีการ incubate ก่อนเติม antigen

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti - PTH labeled AuNPs กับ antigen



รูปที่ จ.1 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ จ.2 แสดงสเปกตรัมของ gold nanoparticles หลังการทำปฏิกิริยากับ antigen ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวก ข.**  
**สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย**

บันทึกการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ 2559-0105 ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2559  
แหล่งทุน: เงินงบรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559  
ชื่อโครงการ : ชุดทดสอบภาคสนามสำหรับตรวจวัดระดับพาราธอร์โมนในเลือด  
ชื่อหัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชัน

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างอิง	รายการรับ - จ่าย		รายรับ ดอกเบี้ยรับ	งบกลาง ค่าจ้างชั่วคราว	รายจ่าย			งบลงทุน ค่าครุภัณฑ์	รวม รายจ่าย
			รับ	จ่าย			ค่าตอบแทน	ค่าวัสดุ	ค่าเช่าอุปกรณ์		
	งบประมาณที่ได้รับอนุมัติ (ตามแผน)		212,500.00		390.2						
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1 = 85%)		37,500.00								
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2 = 15%)		250,114.61								
	หัก ค่าใช้จ่าย										
	งบประมาณคงเหลือ		250,000.00	114.61	390.20	60,000.00	60,200.00	129,914.61			250,114.61
	<b>รายละเอียดค่าใช้จ่าย</b>										
8 ม.ค. 16	โอนเงินงวดแรก		212,500.00					212,500.00			60,000.00
18 มี.ค. 16	ค่าตอบแทนผู้ช่วยวิจัย		60,000.00					152,500.00			580.00
31 ต.ค. 15	ทอมแท็บเล็ต 100% (100 แผ่น)		580.00					151,920.00			300.00
	ทอมแท็บเล็ต (100 แผ่น)		300.00					151,620.00			2,320.00
15 ม.ค. 16	ทอมแท็บเล็ต 100% (400 แผ่น)		2,320.00					149,300.00			1,740.00
21 มี.ค. 16	ทอมแท็บเล็ต 100% (300 แผ่น)		1,740.00					147,560.00			900.00
	ทอมแท็บเล็ต (300 แผ่น)		900.00					146,660.00			11,697.13
	Anti-rabbit IGG	IV1605377						134,962.87			9,360.00
24 พ.ค. 16	ค่าสื่อ TEM	401248/59						125,602.87			22,024.24
	PTH Human	IV1605377						103,578.63			3,549.62
	Gold nanoparticles	IV1605765						100,029.01			2,568.00
2 มิ.ย. 16	ค่าสื่อ FE-SEM	RV16005357						97,461.01			16,554.51
	Anti-PTH	IV1606305						80,906.50			8,406.99
	Goat anti-rabbit IGG	SO-1604-116						72,499.51			21,391.12
	Rabbit anti PTH antibody	SO-1605-108						51,108.39			
25 มิ.ย. 16	ดอกเบี้ย				390.20						
14 ก.ค. 16	โอนเงินงวดที่ 2		37,500.00					88,608.39			2,782.00
28 ก.ค. 16	แบบจำลองห้องสร้าง	IV59/0497						85,826.39			9,416.00
	PBS Buffered saline pH 7.4 + tablet	RI501111						76,410.39			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 ส.ค. 16	กระดาษ	401-004810		370.00	76,040.39					370.00			370.00
	ก่อนมอบประสงค์	501-004129		698.00	75,342.39					698.00			698.00
	Anti-PTI antibody			20,551.00	54,791.39					20,551.00			20,551.00
	ค่าจ้างจัดทำบัญชีใบรายงานต่างๆ			5,000.00	49,791.39				5,000.00				5,000.00
	ค่าถ่ายเอกสาร			1,750.00	48,041.39				1,750.00				1,750.00
	ค่าจัดทำเล่มรายงาน			1,090.00	46,951.39				1,090.00				990.00
	ค่าจ้างออกแบบชุดทดสอบต้นแบบ			3,500.00	43,451.39				3,500.00				3,500.00
7 ก.ย. 16	ค่ากล่องครีติก	ES-OA5909-0044		2,140.00	41,311.39					2,140.00			2,140.00
	ค่าอะครีติก	ES-OA5909-0056		1,926.00	39,385.39					1,926.00			1,926.00
9 ก.ย. 16	ค่าส่ง TEM			6,500.00	32,885.39					6,500.00			6,500.00
	ค่าจ้างออกแบบกล่องครีติก			8,000.00	24,885.39					8,000.00			8,000.00
	ค่าจ้างเขียน software ประมวลผล			25,000.00	114.61					25,000.00			25,000.00
	รวม		250,000.00	250,114.61	114.61				60,000.00	129,914.61			250,114.61

หมายเหตุ ใช้จ่ายเกินงบประมาณที่ได้รับเป็นจำนวน 114.61 บาท ซึ่งรายจ่ายส่วนที่เกินนี้ หัวหน้าโครงการจะเป็นผู้จ่ายเอง

ลงชื่อหัวหน้าโครงการ ..... วันที่ 31 ส.ค.2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้