

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

โพเทนซีอเมทริกอิμμโนเซนเซอร์สำหรับอัลฟาฟีโตโปรตีน

โดยใช้สกรีน-ปรีนท์อิเล็กทรอนิกส์



1107848



นายรัชพล เตจ้ะยา

ร/พ.

ร 345 พ

2000

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 107848
วัน,เดือน,ปี - 8 ส.ย. 2553

b. 12215bb1
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Potentiometric immunosensor for Alpha-fetoprotein (AFP)

by Screen-printed carbon electrode (SPCE)

Mr. Ratchapol Tajaya

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Major in Industrial Chemistry Analytical Instrumentation

Department of Chemistry

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang


Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	โพเทนซีอิมเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับ	Alpha-fetoprotein
	(AFP) โดยสกรีน - ปริ้นท์อิเล็กทรอนิกส์	
นักศึกษา	นายรัชพล เต๊ะยะยา	
ภาควิชา	เคมี	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
สาขา	เคมีอุตสาหกรรม - เครื่องมือวิเคราะห์	
ปีการศึกษา	2550	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์	

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล	
กรรมการ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	
กรรมการ รศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์	


 (ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์)
 หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	โพเทนชิอเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับอัลฟาฟีโตโปรตีน โดยใช้ สกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด
นักศึกษา	นายรัชพล เต๊ะยะยา
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
สาขา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการเตรียมสกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด (Screen-Printed Carbon Electrode) ในรูปแบบหัววัดอิมมูโนเซนเซอร์แบบโพเทนชิอเมตริก (Potentiometric immunosensor) เพื่อความรวดเร็วในการวัด Alpha-fetoprotein (AFP) ในซีรัมมนุษย์ อิมมูโนเซนเซอร์ถูกเตรียมขึ้นโดยการตรึงแอนติบอดีกับไบโอดีนซึ่งเคลือบบนขั้วสกรีน-ปรินต์ และทำการโมดิฟายอิเล็กโทรดด้วยกลูตาไรลดีไฮด์โดยสารดังกล่าวเป็นสารไบฟังก์ชันนอลทำหน้าที่เชื่อมไขว้ทางไบโอเซนเซอร์โดยปลายทั้งสองของกลูตาไรลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของอัลฟาฟีโตโปรตีน เกิดเป็น complex film บนขั้วอิมมูโนเซนเซอร์แล้วทำการทดสอบคุณสมบัติต่างๆทางโพเทนชิอเมตริกของขั้วไฟฟ้า ได้แก่ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวัด AFP โดยใช้สกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด เช่น การศึกษาสภาวะทางเคมีไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์, การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP และศึกษาประสิทธิภาพของการวัด AFP จากสกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรดที่สร้างขึ้น เปรียบเทียบกับเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ตลอดจนสามารถตรวจวิเคราะห์หาระดับสาร AFP ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยจริง เพื่อคัดกรองวินิจฉัย และติดตามผลการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง

Project Title	Potentiometric immunosensor for Alpha-fetoprotein (AFP) by Screen-printed carbon electrode (SPCE)
Student	Mr.Ratchapon Tajaya
Department	Chemistry
Program	Analytical Instruments for Industrial Chemistry
Academic Year	2007
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr.Suwan Chaiyasith

ABSTRACT

This project focused on potentiometric immunosensor for the determination of human Alpha – fetoprotein (AFP) by screen-printed carbon electrode (SPCE). The effective immobilization of the antibody comes from the entrapment by biotin on screen-printed carbon electrode and modified by glutaraldehyde. As well as the amines of antibody will be cross-linked by glutaraldehyde and form compact film. Study experimental condition for AFP by potentiometric immunosensor technique such as the appropriate electrochemistry condition for analyze and the detection efficiency compare to the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA). Thus, the developed immunoassay may provide a feasible alternative tool for determining AFP in human serum in clinical laboratory.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดีด้วยคำแนะนำ และคำปรึกษาเกี่ยวกับหลักการทางเคมีไฟฟ้า กระบวนการเตรียมสกรีน-ปรินต์อิเล็กทรอนิกส์ รวมถึงแนวทางและวิธีการแก้ปัญหาจาก รศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์อาจารย์ผู้ควบคุมโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณ รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล และ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ กรรมการสอบโครงการพิเศษที่ได้กรุณาให้คำแนะนำทางแก้ไขปัญหาและตรวจสอบข้อมูลต่างๆในโครงการพิเศษฉบับนี้ให้เป็นไปอย่างถูกต้อง

ขอขอบพระคุณ คุณอารีย์ ประสิทธิ์ยงค์ หัวหน้ากลุ่มงานอิมมูโนวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาข้อมูลด้านอิมมูโนวิทยา ตลอดจนข้อมูลด้านการวิเคราะห์

ขอขอบคุณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้การสนับสนุน และอนุเคราะห์สารเคมีในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ครอบครัวเต็จะยา สำหรับกำลังใจที่มีให้เสมอมา

สำหรับประโยชน์และคุณค่าอันพึงมีจากโครงการพิเศษเล่มนี้ ขอมอบให้กับครอบครัว เต็จะยา ตลอดจนครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้อันมีค่ายิ่ง และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้

รัชพล เต็จะยา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	IX
อักษรย่อที่ใช้ในงานวิจัยเล่มนี้.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	4
2.1 หลักการของเทคนิคโพเทนชิอเมทรี.....	4
2.1.1 การวิเคราะห์โดยการวัดศักย์ไฟฟ้าโดยตรง (Direct Potentiometry).....	5
2.1.2 กลไกการเกิดศักย์ไฟฟ้าที่ขั้ว.....	8
2.2 ไบเซนเซอร์และอิมมูโนเซนเซอร์.....	9
2.2.1 ไบโอเซนเซอร์ (biosensor).....	9
2.2.2 อิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor).....	10
2.2.3 การตรึงสารแอนติบอดีบนทรานส์ดิวเซอร์.....	12
2.2.4 เซนเซอร์ที่อาศัยการวัดแบบโพเทนชิอเมทรี.....	13
2.3 สกรีน-ปรีนต์อิเล็กโทรด screen-printed carbon electrode (SPCE).....	14
2.4 อัลฟาฟีโตโปรตีน.....	15
2.4.1 องค์ประกอบทางเคมีแอลฟาฟีโตโปรตีน.....	18
2.4.2 แอนติบอดี (Ab).....	18
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	20
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	20
3.1.1 อุปกรณ์.....	20
3.1.2 สารเคมี.....	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตเห็นาเบ้ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

3.2	การเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กทรอนิกส์.....	21
3.2.1	การสร้างขั้วไฟฟ้าสกรีน-ปริ้นท์.....	21
3.3	การทดสอบขั้วไฟฟ้า.....	23
3.4	วิธีการทดลอง.....	23
3.4.1	การเตรียมสกรีน-ปริ้นท์ อิเล็กโทรด ที่ตรึงด้วย AFP.....	23
3.4.2	การหาสภาวะทางเคมีไฟฟ้าของขั้วที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP.....	23
3.4.2.1	การหา pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์.....	23
3.4.2.2	การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์.....	24
3.4.2.3	การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการอ่านค่าศักย์ไฟฟ้าที่.....	24
3.4.3	การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP.....	24
3.4.3.1	การศึกษาความเป็นเส้นตรงของการวัดศักย์ไฟฟ้า.....	24
3.4.3.2	การศึกษาความเที่ยง.....	24
3.4.3.3	การศึกษาขีดจำกัดในการวิเคราะห์.....	25
3.4.3.4	การหาอายุการใช้งานของขั้ว.....	25
3.4.3.5	การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP.....	25
3.4.3.5.1	การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์.....	25
3.4.3.5.2	การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่าง.....	25
บทที่ 4	ผลการทดลอง และอภิปรายผล.....	27
4.1	การสร้างสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กทรอนิกส์ โดยการตรึงสาร anti-AFP และ.....	27
4.1.1	การทดสอบประสิทธิภาพขั้วไฟฟ้า.....	27
4.2	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP.....	28
4.2.1	ค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด AFP.....	28
4.2.2	อุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์.....	30
4.2.3	เวลาที่เหมาะสมในการอ่านค่าศักย์ไฟฟ้า	31
4.3	การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP.....	32
4.3.1	การศึกษาสภาพไวของขั้ว.....	32
4.3.2	การศึกษาความเที่ยง.....	33
4.3.3	การศึกษาขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP.....	34
4.3.4	อายุการใช้งานของขั้ว.....	35
4.3.5	การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่าง ด้วยเทคนิค	
	โพเทนชิอเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์.....	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	38
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	38
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	39
เอกสารอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก.....	42
ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมี.....	42
ภาคผนวก ข. ผลการทดลอง.....	44
ภาคผนวก ค. การคำนวณขีดจำกัดในการตรวจวัด.....	52
ภาคผนวก ง. การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่างซีรัม.....	55



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้าที่
4.1 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ย และ %RSD (Percent of Relative- Standard Delviation) จากการวัด AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทร- ไลต์โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี	34
4.2 แสดงค่า potantail จากการวัดตัวอย่างซีรัม 2 ตัวอย่าง โดยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี..... อิมมูโนเซนเซอร์	36
4.3 ตารางแสดง การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP ด้วย สกรีน-ปรินท์..... อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้น กับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)	37
5.1 สภาพที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP.....	38
5.2 สมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde.....	39
5.3 The determination result of AFP by SPCE immunosensor and ECLIA method.....	39
ข.1 ค่า pH ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์กับค่าความต่างศักย์ที่ได้จากการตรวจ..... สารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 μ L โดย สกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ที่ ปรับปรุงขั้วแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี	44
ข.2 ค่าอุณหภูมิ ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ กับค่าความต่างศักย์ ที่ได้จากการ..... ตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.80 ng/mL ปริมาณ 0.2 mL โดย สกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงขั้วแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี	45
ข.3 แสดงค่าศักย์ไฟฟ้า(mV)ในการวัด AFP เข้มข้น 10.80 mg/mL ปริมาณ 0.2 mL โดยใช้ แผ่นสกรีน - ปรินท์อิเล็กโทรดที่ ปรับปรุงแล้วที่ เวลาต่างๆ	46
ข.4 การหาการศึกษาสภาพความไวของขั้ว เพื่อหาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น..... โดยการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า กับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 0 – 214.4 ng/mL	47

สารบัญตาราง(ต่อ)

ข.5	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ย และ %RSD49
	(Percent of Relative Standard Delviation) จากการวัด AFP เข้มข้น 10.80 mg/mL
	ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิค
	โพเทนชิอเมทรี
ข.6	The lifetime of the immunosensor to 10.80 mg/mL AFP.....51
ค.1	แสดงค่า Potentail ของสารละลายมาตรฐาน AFP ที่ความเข้มข้น 6.1 – 353.5 ng/mL.....52
ง.1	แสดงค่า Potentail ของสารละลายมาตรฐาน AFP ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....55
ง.2	แสดงค่าตัวอย่างการวัดซีรัม AFP.....56
ง.3	The determination result of AFP by SPCE immunosensor and ECLIA method.....58
ง.4	การหา t-test โดยใช้สถิติทดสอบ Pair t-test.....59
ง.5	ตาราง t- test สำหรับสถิติทดสอบ.....59



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้าที่
2.1 เซลล์ไฟฟ้าเคมี.....	5
2.2 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์.....	9
2.3 แสดงชนิดต่างๆ ของไบโอรีเซพเตอร์.....	11
2.4 Protein Receptor.....	11
2.5 โปเทนชิอเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์.....	13
2.6 ส่วนประกอบของแผ่นสกรีน-พรีนต์อิเล็กโทรด.....	14
2.7 สกรีน-พรีนต์อิเล็กโทรด.....	15
2.8 มะเร็งเซลล์ตับ (Hepatocellular carcinoma ; HCC).....	16
2.9 แอลฟาไฟโตโปรตีน.....	17
3.1 แสดงสกรีน-พรีนต์อิเล็กโทรดที่เตรียมได้.....	22
4.1 แสดงค่า potentiometric response (-mV) ของละลาย 0.005 M $K_3Fe(CN)_6$	28
โดยขั้วที่ ตรึงสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde และขั้วที่ยังไม่ได้ การปรับปรุง	
4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์กับค่าความ.....	29
ต่างศักย์ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 μ L โดย สกรีน-พรีนต์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงขั้วแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี	
4.3 สมการแสดงปฏิกิริยา cross linkage ของ glutaraldehyde และ biotinylated.....	30
~ anti-AFP ที่เคลือบบนขั้วใช้งาน	
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ กับค่า pH ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์กับ.....	31
ค่าความต่างศักย์ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ปริมาณ 20 μ L โดย สกรีน-พรีนต์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงขั้วแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี	
4.5 ค่า ศักย์ไฟฟ้า (mV) ของสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ที่แสดงค่า.....	32
ณ เวลาต่างๆ จากการตรวจวัดโดย แผ่นสกรีน-พรีนต์ อิเล็กโทรด ด้วยเทคนิคโพเทน- ชิอเมทรี	
4.6 กราฟมาตรฐานแสดงค่า ศักย์ไฟฟ้า กับค่าความเข้มข้นของ AFP ที่ 6.1 , 30.5 ,.....	33
48.9 , 91.1 , 116.1 , 160.8 และ 214.4 ng/mL ตามลำดับ	
4.7 แสดงการหาขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP โดยการพลอตแบบแกรน (Gran's plot).....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

4.8 กราฟแสดงค่า Potentiometric responses (mV) ที่วัดโดยสกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรด.....36	
สำหรับสาร AFP ด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี ในแต่ละวัน	
ข.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ค่า ศักย์ไฟฟ้า กับค่าความเข้มข้นของ AFP.....48	
ข.2 The speciation of Fe(III) in 0.7 m NaCl at 25 °C.....50	
ค.1 กราฟมาตรฐานแสดงค่า ของสารละลาย AFP ที่ความเข้มข้น 6.1 – 353.5 ng/mL.....53	
ค.2 แสดงขั้นตอนการหาขีดจำกัดในการวิเคราะห์ โดยการพลอตแบบแกรน (Gran's plot)...54	
ง.1 Calibration curve of the potentionmetric immunosensor obtained using AFP	
standard solution.....57	



อักษรย่อที่ใช้ในงานวิจัยเล่มนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ตับเป็นอวัยวะที่มีมะเร็งจากอวัยวะต่างๆ แพร่กระจายมามากที่สุดเนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีเลือดมาเลี้ยงมากและลักษณะของโพรงเส้นเลือดในตับ (hepatic sinusoid) ที่มีช่อง (fenestration) ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถผ่านเข้าไปในเนื้อตับได้ง่าย มะเร็งแพร่กระจายมาที่ตับพบได้ประมาณร้อยละ 40-50 ของเนื้องอกของตับ [4]. มะเร็งแพร่กระจายมาที่ตับ ที่พบได้บ่อยคือ มะเร็งของอวัยวะในช่องท้องที่เลือดระบายผ่านเส้นเลือดดำพอร์ทัล (portal vein) เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ ตับอ่อนและกระเพาะอาหาร ส่วนที่เหลือมาจากอวัยวะอื่นเช่น มะเร็งปอด เต้านมและผิวหนัง (melanoma) เป็นต้น [2-4]. มะเร็งเซลล์ตับ (Hepatocellular carcinoma; HCC) เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงของเซลล์ตับ พบได้บ่อยและพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะจีน ญี่ปุ่น เกาหลีและประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบว่าเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดของมะเร็งในเพศชายและเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดของมะเร็งอวัยวะระบบทางเดินอาหาร พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงประมาณ 4.5 เท่า อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยประมาณ 48 ปี [12] สารบ่งชี้มะเร็ง (Tumor markers) คือตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีที่จะบอกว่ามีมะเร็งหรือไม่ อาจเป็นสารที่ไม่พบในภาวะปกติ หรือเป็นสารปกติในร่างกายเราแต่มีปริมาณเพิ่มสูงมากผิดปกติไปจากปกติ สามารถตรวจพบได้ทั้งในเลือด หรือสารคัดหลั่ง (biological fluid) มี 2 ประเภท คือ สารที่ไม่พบในภาวะปกติ และเป็นสารที่ผลิตมาจากเซลล์มะเร็งโดยตรง เช่น CEA, AFP, PSA, และ CA 19-9 เป็นต้น สารที่มีอยู่แล้วในร่างกายซึ่งผลิตโดยเซลล์ปกติ แต่กลับเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อ เซลล์นั้นกลายเป็น เซลล์มะเร็ง สารดังกล่าวได้แก่ฮอร์โมนต่างๆเช่น HCG, Calcitonin, ACTH เป็นต้น หรือเอนไซม์เช่น PAP, ALP, LDH, GGT เป็นต้น ประโยชน์ของการตรวจหาTumor marker ได้แก่ ช่วยในการวินิจฉัย ช่วยในการวางแผนการรักษา และ ช่วยบอกวามะเร็งหมด และมีการกลับมาเป็นใหม่หรือไม่หลังรักษาแล้ว

Alpha fetoprotein (AFP) เป็น fetal serum protein ตรวจพบในปี 1956 เป็น glycoprotein หลัก ในซีรัมของทารกในครรภ์ มีขนาด 720 Kd ถูกสังเคราะห์จาก yolk sac /liver/ ทางเดินอาหาร แล้วผ่านเข้าสู่ น้ำคร่ำ โดยผ่านทางเลือดของทารกข้าม placental barrier เข้าสู่เลือดของมารดา ดังนั้นจึงทำให้ซีรัมของสตรีมีครรภ์มีค่า AFP สูงขึ้นบ้างและจะแปรผันตามอายุครรภ์ด้วย AFP มิได้มีความจำเพาะต่ออวัยวะใดอวัยวะหนึ่งเพียงอย่างเดียว แต่จะพบค่าขึ้นสูงมากและพบได้บ่อยใน มะเร็งของตับ (hepatocellular carcinoma / hepatoma) ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยประมาณ 70%และพบได้บ้างแต่ค่าไม่สูงมากนักใน มะเร็งรังไข่/อณตะ มะเร็งปอด มะเร็งทางเดินอาหารและโรคตับอื่นๆ เป็นต้น [2-12]. AFP ในปัจจุบันใช้เป็น tumor markers ในการคัดกรองตรวจหาผู้ป่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะเร็งตับ (hepatoma) ในระยะเริ่มแรกก่อนที่จะมีอาการทางคลินิก ใช้ตรวจในประชากรที่มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับสูง เช่น ผู้ที่เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบี / ตับอักเสบริโอริง / ตับแข็ง โดยควรมีการตรวจซ้ำทุก 3-6 เดือน ต่อครั้ง และ ระดับ AFP ที่ใช้ในการวินิจฉัยมะเร็งเซลล์ตับ คือ >500 นก./มล. เนื่องจากระดับที่ต่ำกว่านี้สามารถพบได้ในโรคอื่นได้เช่น ไวรัสตับอักเสบบีเฉียบพลัน ไวรัสตับอักเสบริโอริงและตับแข็งจากสาเหตุต่างๆ แต่ในมะเร็งเซลล์ตับขนาดเล็กโดยเฉพาะเล็กกว่า 5 ซม. ระดับ AFP จะสูงไม่มาก ความไวของ AFP ในการวินิจฉัยมะเร็งเซลล์ตับประมาณร้อยละ 75 และมีความจำเพาะประมาณร้อยละ 90 [13-15]. วิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในปัจจุบันเป็นเทคนิคทาง Immunoassay โดยอาจเป็นวิธี RIA / EIA / CICA/ELISA ซึ่งจะมีผลรบกวนผลการทดสอบ ในปฏิกิริยา immunoassay ตามทฤษฎีแล้วจะมีความเสี่ยงที่จะเกิดการรบกวนของผลทดสอบได้ ซึ่งมีหลักที่ควรคำนึงถึงคือ High dose Hook Effect และ Heterophile antibodies รวมทั้งความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างเลือด และสารละลายในการวิเคราะห์

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

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เตรียมสกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด สำหรับการตรวจวัดสาร AFP
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวัด AFP โดยใช้สกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด(Screen-printed electrode)
3. ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP จาก สกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้น กับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)
4. ตรวจวัดหาปริมาณสาร AFP ในตัวอย่างซีรัมจริง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมสกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด สำหรับการตรวจวัดสาร AFP
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวัด AFP โดยใช้สกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด(Screen-printed electrode) ได้แก่
 - การศึกษาสภาวะทางเคมีไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ AFP
 - การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti- AFP
3. ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP จาก สกรีน-ปรินต์อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้น กับการวัดเปรียบเทียบโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)
4. ตรวจวัดหาปริมาณสาร AFP ในซีรัมของผู้ป่วยจริง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสร้าง immunosensor สำหรับตรวจวัด สาร AFP ในเลือด ที่ใช้งานได้ง่าย และมีขนาดเล็ก
3. สามารถตรวจหาสารบ่งชี้มะเร็ง (Tumor markers) ของ โรคมะเร็งตับ ในระยะแรกเริ่ม ในเลือดเพื่อ ช่วยวินิจฉัยและ ติดตามผลของการรักษาได้อย่างรวดเร็วในห้องปฏิบัติการ ทาง Clinic
4. เพิ่มประสิทธิภาพงานวิจัยทางการรักษาโรคมะเร็งตับในหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับบำบัดรักษาโรคมะเร็ง เช่น ศูนย์รักษามะเร็งในโรงพยาบาล ศูนย์วิจัยมะเร็งแห่งชาติ
5. กระตุ้นให้เกิดการพัฒนาเทคโนโลยีด้าน immunosensor ทางการแพทย์ โดยการผลิตขึ้นใช้เอง และสามารถพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงการพิเศษเรื่องนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาทฤษฎีเอกสาร วารสาร รายงาน และบทความวิชาการ ทั้งในและต่างประเทศ เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยดังหัวข้อดังต่อไปนี้

- หลักการของเทคนิคโพเทนชิอเมทรี
- ไบโอสเซนเซอร์และอิมมูโนเซนเซอร์
- สกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรด screen-printed carbon electrode (SPCE)
- แอลฟาฟีโตโปรตีน alpha-1-fetoprotein (AFP)
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

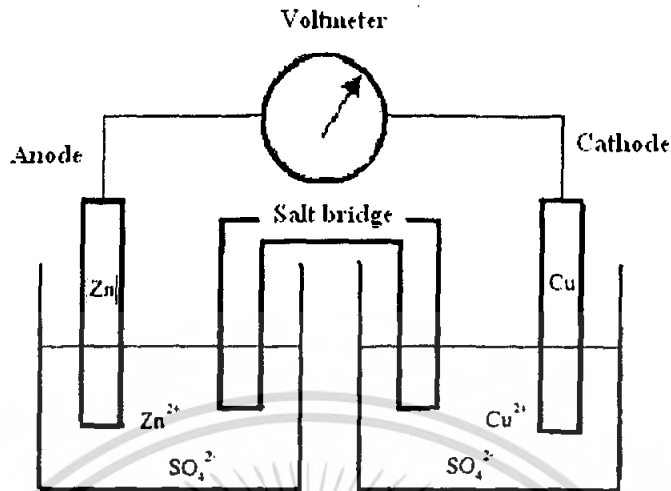
2.1 หลักการของเทคนิคโพเทนชิอเมทรี

โพเทนชิอเมทรี เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีเชิงไฟฟ้าวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการวัดค่าศักย์ของสารละลายตัวอย่างภายใต้เงื่อนไขที่ไม่มีกระแสไฟฟ้าไหลซึ่งค่าศักย์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เคมีไฟฟ้า เป็นผลที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการปรับตัวเข้าสู่สภาวะสมดุลของปฏิกิริยาเคมีเซลล์เคมีไฟฟ้า ของเทคนิคโพเทนชิอเมทรี จัดเป็นเซลล์กัลวานิกซึ่งปฏิกิริยาทางเคมีสามารถเกิดขึ้นได้เองที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า เซลล์เคมีไฟฟ้าประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้าแอโนดซึ่งต่ออยู่กับขั้วลบ และแคโทดซึ่งเป็นขั้วบวก ค่าความต่างศักย์เกิดขึ้นระหว่างขั้วแอโนดและแคโทดเรียกว่า ศักย์อุณหภูมิหรืออาจเรียกว่าศักย์เซลล์ (E_{cell}) ซึ่งในสภาวะมาตรฐานอาจแสดงสมการแสดงค่าศักย์เซลล์ได้ดังนี้

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

ในสมการจะมีการรวมเทอมของศักย์รอยต่อ (E_j) [1]. ไร้ด้วยเพราะการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรีอาจมีค่าศักย์รอยต่อเกิดขึ้นร่วมด้วยกรณีที่ปฏิกิริยาทางเคมีไม่ได้เกิดขึ้นที่สภาวะมาตรฐาน เราสามารถคำนวณค่าศักย์เซลล์ที่เกิดขึ้นโดยใช้สมการของเนินสต์ [6-7]. โดยทั่วไปวิธีการวิเคราะห์แบบโพเทนชิอเมทรี ขั้วแคโทดที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นขั้วไฟฟ้าแบบเลือกไอออน (ion-selective electrodes) ซึ่งจะยอมให้เฉพาะไอออนที่สนใจที่จะวิเคราะห์ผ่านเยื่อ (membrane) เข้าไปได้ทำให้เกิดศักย์เซลล์เคมีไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 เซลล์ไฟฟ้าเคมี

2.1.1 การวิเคราะห์โดยการวัดศักย์ไฟฟ้าโดยตรง (Direct Potentiometry)

การทำปริมาณวิเคราะห์วิธีนี้เป็นที่คุ้นเคยและถือเป็นงานปกติทั่วไปของการใช้พี-เอชมิเตอร์ คือ การวัด pH ของสารละลาย สำหรับการหาปริมาณของทั้งแอนไอออน และแคทไอออน โดยการวัดค่า pI เป็นงานที่ค่อนข้างเฉพาะ ต้องใช้กับพี-เอชมิเตอร์ที่สร้างส่วนแยกวงจรรองรับขั้วไฟฟ้าในการวัด pI เท่านั้น หรือเครื่องที่เรียกว่า พี-ไอมิเตอร์ ซึ่งใช้เฉพาะกับงานตรวจหาปริมาณไอออนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ไอออนไฮโดรเจน [12].

ขั้วไฟฟ้าใช้งาน

ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สำหรับเทคนิคโพเทนชิอเมทรี คือ ขั้วไฟฟ้าแบบเจาะจงไอออน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการทำโพเทนชิอเมทรี

ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง

- ขั้วไฟฟ้าคาโลเมล
- ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์ – ซิลเวอร์คลอไรด์

ขั้วไฟฟ้าใช้งาน

- ขั้วไฟฟ้าเยื่อแก้ว
- ขั้วไฟฟ้าเยื่อสถานะของแข็ง
- ขั้วไฟฟ้าเยื่อแลกเปลี่ยนก๊าซ
- ขั้วไฟฟ้าตรวจวัดเอนไซม์

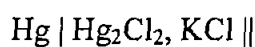
ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง

โดยทั่วไปขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่นิยมใช้จะต้องให้ค่าศักย์ที่คงที่และไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้
ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่นิยมใช้สำหรับเทคนิคโพเทนชิอเมทรี ได้แก่

- ขั้วไฟฟ้าคาโลเมล
- ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์ – ซิลเวอร์คลอไรด์

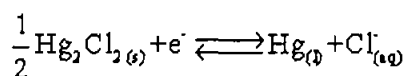
ขั้วไฟฟ้าคาโลเมล

ขั้วไฟฟ้าคาโลเมล เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุด ประกอบด้วยหลอดแก้วสวมกัน 2 ชั้น หลอดแก้วชั้นในมีหลอดควมำจุ่มอยู่ในส่วนผสมของโลหะปรอทและเมอร์คิวรีคลอไรด์ (Hg_2Cl_2) หรือคาโลเมล หลอดแก้วชั้นนอกเป็นสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) สารละลายจากหลอดแก้วทั้งสองชั้นติดต่อกันทางรูเล็ก ๆ ที่ก้นของหลอดแก้วตัวใน ที่หลอดแก้วตัวนอก ซึ่งเป็นส่วนของขั้วไฟฟ้าที่ใช้จุ่มในสารละลายตัวอย่างมีรูที่ส่วนปลายหลอด รูพรุนนี้ทำหน้าที่เป็นสะพานเกลือของขั้วไฟฟ้า สามารถเขียนแผนภาพครึ่งเซลล์คาโลเมล ได้ดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาครึ่งเซลล์ของขั้วไฟฟ้า เขียนได้ดังนี้



$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{red}}}{a_{\text{ox}}}$$

$$K_{sp} = [\text{Cl}^-]^2 [\text{Hg}_2^{2+}]$$

$$[\text{Hg}_2^{2+}] = K_{sp} / [\text{Cl}^-]^2$$

ขั้วไฟฟ้าคาโลเมล (Saturated Calomel Reference Electrode(SCE))

ขั้วไฟฟ้าคาโลเมลสำเร็จรูปเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงชนิดหนึ่งที่อยู่ในรูปขั้วไฟฟ้าสำเร็จรูป ซึ่งประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าแก้วเป็นรูป H ที่มีลวดแพลตินัม และวัสดุแก้วพรุน ไวคอร์ (porous vycor (frit)) ภายในมีหลอดแก้วเล็กๆ บรรจุสารละลายอิ่มตัวของ KCl และคาโลเมล (Calomel paste) [7].

ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์ – ซิลเวอร์คลอไรด์

ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์ – ซิลเวอร์คลอไรด์ ประกอบด้วย หลอดแก้วที่มีลวดโลหะเงิน เคลือบด้วยซิลเวอร์คลอไรด์จุ่มอยู่ในสารละลายอิ่มตัวของโพแทสเซียมคลอไรด์และซิลเวอร์คลอไรด์ ส่วนปลายของหลอดแก้วเป็นแผ่นพรุนกั้นส่วนของโพแทสเซียมคลอไรด์กับสารละลายตัวอย่าง

1. ขั้วไฟฟ้าแบบเลือกไอออน (ion-selective electrode)

ขั้วไฟฟ้าแบบเจาะจงไอออนเป็นขั้วไฟฟ้าแบบเยื่อเลือกผ่าน (membrane) ซึ่งมีความสามารถในการตอบสนองต่อไอออนที่สนใจศึกษา ซึ่งประกอบด้วยเครื่องมือวัด (probe) ซึ่งมีความสามารถในการวัด ไอออนที่จำเพาะและแก๊สที่อยู่ในรูปสารละลายขั้วไฟฟ้าแบบเจาะจงไอออนสามารถให้ศักย์ ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สนใจ ขั้วไฟฟ้าแบบเจาะจงไอออนที่นิยมใช้มากที่สุดคือขั้วไฟฟ้าพี-เอช (pH electrode) ซึ่งประกอบด้วยเยื่อแก้วขนาดบางที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลาย [1-12]. การที่ขั้วไฟฟ้าแบบเลือกไอออน สามารถเจาะจงกับไอออนชนิดใดนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเยื่อ(membrane) ว่าประกอบด้วยอะไรบ้าง เช่น

- **ขั้วไฟฟ้าเยื่อแก้ว** จะตอบสนองต่อไอออนของไฮโดรเจนและจัดเป็นขั้วไฟฟ้าแบบเจาะจง ไอออนชนิดแรก ซึ่งมีประโยชน์มากสำหรับการวัดค่าพี-เอชและไอออนของโลหะหมู่ 1 บางตัว

- **ขั้วไฟฟ้าเยื่อสถานะของแข็ง(Solid state membrane electrode)** เยื่อของขั้วไฟฟ้าชนิดนี้ ประกอบด้วย เกลือที่มีค่าการละลายต่ำแต่สามารถนำไฟฟ้าได้ ขั้วไฟฟ้าชนิดนี้ใช้สำหรับวัดไอออนต่าง ๆ เช่น ฟลูออไรด์ โบรไมด์ แคลเซียม คลอไรด์และไอโอดีน เป็นต้น ข้อดีของขั้วไฟฟ้าเยื่อสถานะของแข็งคือใช้ง่าย และจำเพาะเจาะจงต่อไอออนที่สนใจจะวิเคราะห์

- **ขั้วไฟฟ้าเยื่อแลกเปลี่ยนก๊าซ(gas sensing electrode)** ขั้วไฟฟ้าชนิดนี้ถูกใช้สำหรับวิเคราะห์ก๊าซที่อยู่ในสารละลาย เช่น แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจนออกไซด์และสารละลายของออกซิเจน ซึ่งโมเลกุลของก๊าซจะแพร่ผ่านเยื่อและเข้าทำปฏิกิริยากับบัฟเฟอร์ทำให้ค่า pH ของบัฟเฟอร์เปลี่ยนไป ค่า pH ที่เปลี่ยนไปนี้สามารถวัดได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้าแก้วภายใน ขั้วไฟฟ้าชนิดนี้เป็นที่นิยมมากรองจากขั้วไฟฟ้าตรวจวัดชนิดเยื่อแก้ว

- **ขั้วไฟฟ้าตรวจวัดเอนไซม์(Enzyme electrode)** ตัวอย่างเช่น ขั้วไฟฟ้าตรวจวัดเอนไซม์ยูรีเอส(Urease electrode) ขั้วไฟฟ้าชนิดนี้ใช้สำหรับตรวจวัดค่าพี-เอช ซึ่งขั้วไฟฟ้าถูกเคลือบด้วยเจลที่อิมมัลชันของเอนไซม์ยูรีเอส ในกรณีเช่นนี้ยูเรีย(urea) จะสามารถซึมผ่านเจลและเกิดเป็นแอมโมเนียม(ammonium; NH_4^+) อันเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์ในเจลทำให้ ค่า pH เปลี่ยนไป ซึ่งสามารถตรวจวัดได้

- **ขั้วไฟฟ้าเยื่อแลกเปลี่ยนไอออนของเหลว (Liquid state membrane electrode)** มีลักษณะคล้ายขั้วไฟฟ้า pH ยกเว้นเยื่อที่ใช้ ถ้าเป็นขั้วไฟฟ้าพี-เอชจะใช้เยื่อแก้ว แต่เยื่อแลกเปลี่ยนไอออนของเหลวจะเป็นสารพอลิเมอร์อินทรีย์ที่ทำให้อิมมัลชัน ด้วยตัวแลกเปลี่ยนไอออนของเหลว อันตรกิริยาระหว่างตัวแลกเปลี่ยนไอออนกับไอออนของสารตัวอย่างทำให้มีศักย์ไฟฟ้าเกิดขึ้น ตัววัดชนิดนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์ไอออนต่าง ๆ เช่น NH_4^+ Ca^{2+} Cl^- และไอออนในน้ำกระด้าง เป็นต้น

2.1.2 กลไกการเกิดศักย์ไฟฟ้าที่ขั้ว

การวัดศักย์โดยตรง เป็นวิธีที่คุ้นเคยและใช้กันมากที่สุด วิธีการสำหรับการวัดศักย์โดยตรง ค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากขั้วไฟฟ้าทำงานจะแปรเปลี่ยนไปตามความเข้มข้นของสารละลาย คือเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าศักย์ไฟฟ้าที่อ่านได้มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งอธิบายง่ายๆว่า เมื่อสารละลายมีความเข้มข้นสูง ไอออนในสารละลายย่อมมีจำนวนมาก การส่งผ่านอิเล็กตรอนข้ามผิวหน้าขั้วไฟฟ้าย่อมเกิดขึ้นได้ดี ทำให้วัดศักย์ได้เพิ่มขึ้น ในทางทฤษฎีความสัมพันธ์ของค่า

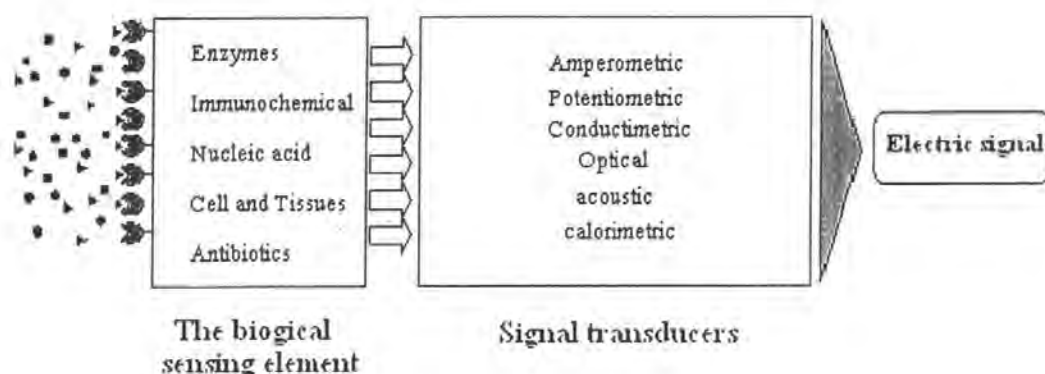
(transducer) หรือตัววัดสัญญาณ ในส่วนของสารชีวภาพนั้นจะต้องมีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการวัด ตัวอย่างของสารชีวภาพที่นำมาใช้ในการวัด ได้แก่ เอนไซม์ จูลินทรีย์ เนื้อเยื่อพืชและสัตว์ แอนติเจน แอนติบอดี เป็นต้น การทำงานของไบโอเซนเซอร์นั้นจะเริ่มจากการที่สารชีวภาพทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวัดแล้ว ก่อให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ ที่ถูกแปรเป็นสัญญาณที่ส่งมานั้น ทรานสดิวเซอร์เป็นอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ ที่ทำหน้าที่รับและแปลงสัญญาณที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวัดวิเคราะห์ให้กลายเป็นกระแสไฟฟ้าซึ่งสัญญาณไฟฟ้านี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้ และถูกนำไปดำเนินการต่อเพื่อแสดงผลออกมา การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ในระยะแรกส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการ สร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากกลูโคสเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญต่อกลไกภายในร่างกายมนุษย์มาก [10].

2.2.2 อิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor)[10].

Bioreceptor

Enzyme

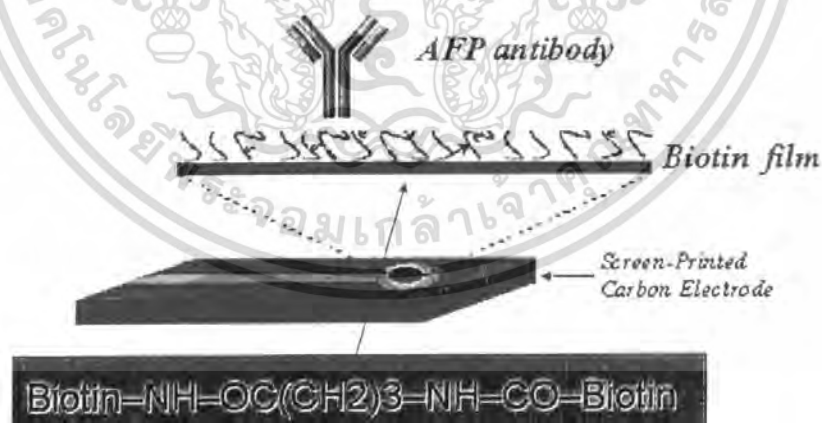
เอนไซม์มีโครงสร้างเป็นสามมิติ ซึ่งเข้ากันได้กับสารตั้งต้นเฉพาะ เมื่อร่างกายได้รับอาหาร อาหารจะถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็กๆ ในร่างกายด้วย ปฏิกิริยามากมายหลายขั้นตอน ด้วยขบวนการ catabolism แล้วโมเลกุลเล็กๆ เหล่านี้ถูกใช้เพื่อ เป็นโครงสร้างของร่างกาย เช่น โปรตีน ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เหล่านี้คือ ขบวนการ anabolism ขบวนการ catabolism และ anabolism ซึ่งรวมเรียกว่า ขบวนการเมตาบอลิซึมนี้ ต้องอาศัยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงด้วยคุณสมบัติในการจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะนี้จึงได้มีการนำเอนไซม์มาใช้เป็นไบโอรีเซพเตอร์



รูปที่ 2.3 แสดงชนิดต่างๆ ของไบโอรีเซพเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์ในไบโอเซนเซอร์[10].

Antibody[14].

แอนติบอดีเป็นองค์ประกอบประมาณ 20% ของพลาสมา โปรตีนทั้งหมดและถูกเรียกว่า immunoglobulins (Ig) ทำหน้าที่จับกับสารแปลกปลอมและกำจัดออกจากระบบ แอนติบอดีมีบริเวณที่จะจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ แอนติเจนเกือบทั้งหมดเป็น โมเลกุลขนาดใหญ่ที่สามารถชักนำการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน.



รูปที่ 2.4 Protein Receptor

โปรตีนรีเซพเตอร์ ทำหน้าที่สำหรับการเปิดและปิดช่องเมมเบรนสำหรับการผ่านเข้าออกของสารเมตาบอลิท์ที่จำเพาะ โปรตีนเหล่านี้ส่วนมากจับอยู่กับเมมเบรน ได้แก่ ตัวรับฮอร์โมน ตัวรับรส ตัวรับกลิ่น (olfactory receptor for smelling) ตัวรับแสง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Transducer ตัวแปลงสัญญาณที่มีการใช้กันมากสำหรับเครื่องไบโอเซนเซอร์ คือ Amperometry, Potentiometry และ Photometry

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

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

Photometric ผลึกภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือสารตั้งต้นที่จะตรวจวัดต้องเป็นสารที่มีสีหรือให้แสงเรือง fluorescent หรือ luminescent โดยมีการใช้งานของ optic fiber เพื่อช่วยในการชักนำ (สะท้อน) แสงจากแหล่งกำเนิดแสงไปยังเครื่องตรวจวัด (detector)

ไบโอเซนเซอร์ถูกประดิษฐ์ขึ้นครั้งแรกโดย Clark และ Lyons (1962 : 29) ในปี ค.ศ. 1962 เพื่อใช้ในการวัดปริมาณกลูโคสในเลือด กลูโคสทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ glucose oxidase ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยขั้วไฟฟ้าที่ผลิตจากทองคำขาว เครื่อง Yellow Springs Instrument รุ่น 23 YSI เป็นไบโอเซนเซอร์เครื่องแรกที่ยกสู่ตลาดในปี ค.ศ. 1974 ต่อมาได้มีการพัฒนาเพิ่มเติมโดยการปรับปรุงชั้นเมมเบรนเพื่อให้สารตั้งต้น ตัวถูกวิเคราะห์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่านได้ดี แต่ป้องกันการผ่านของกรด แอสคอร์บิก (วิตามินซี) ซึ่งเป็นสารรบกวนต่อการวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น [3].

2.2.3 การตรึงสารแอนติบอดีบนทรานส์ดิวเซอร์[3].

การตรึงสารอิมมูโน (Immobilization of immunoagents)

อิมมูโนเซนเซอร์เป็นไบโอเซนเซอร์ชนิดหนึ่งที่มีการนำสารอิมมูโนซึ่งเป็นสารทางชีวภาพมาตรึงบนทรานส์ดิวเซอร์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะวัดของทรานส์ดิวเซอร์ คือ

1. อิมมูโนเซนเซอร์ที่อาศัยการวัดโดยตรง

เมื่อเกิดคู่ควมกันระหว่างสารอิมมูโน คือ Ag กับ Ab แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ที่เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ที่เป็นผลมาจากคู่ควมดังกล่าว

2. อิมมูโนเซนเซอร์ที่อาศัยสารติดตามในการบ่งชี้

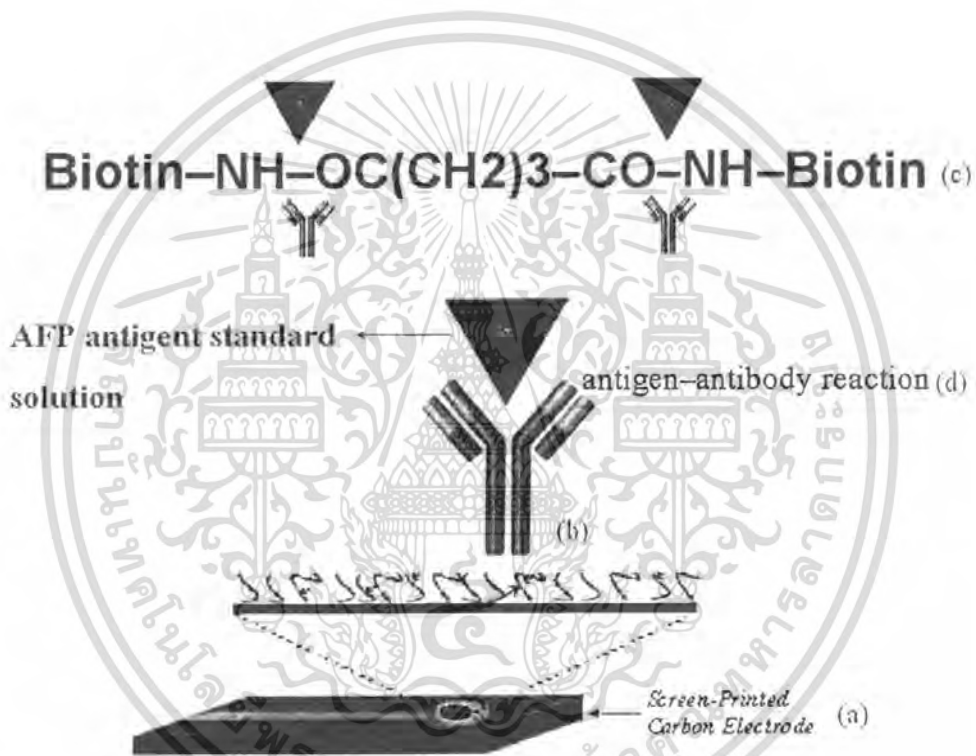
จะบ่งบอกปริมาณสารที่เกิดปฏิกิริยากับสารบ่งชี้ เช่น อาศัยเอนไซม์เป็นตัวติดตามการจับของ Ag กับ Ab ซึ่งภายหลังการจับกันแล้ว เอนไซม์ที่ติดตามบนทรานส์ดิวเซอร์จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทของเอนไซม์กลายเป็นผลึกภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 เซนเซอร์ที่อาศัยการวัดแบบโพเทนซีอเมตริก

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยสารแอนติบอดีเป็นสารชีวภาพ และใช้วิธีทางโพเทนซีอเมตริกในการวัดปริมาณสารทางอิมมูโน ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างอื่นที่ใช้โพเทนซีอเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์ในการตรวจวัด เช่น การวัดปริมาณสารไดโกซิน (digoxin) โดยอาศัยขั้วคาร์บอนไดออกไซด์อิเล็กโทรด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ขั้วอื่น ๆ ในการตรวจวัดโดยอยู่ภายใต้หลักการโพเทนซีอเมตริก คือ โพเทนซีอเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัด AFP ดังรูปที่

2.5

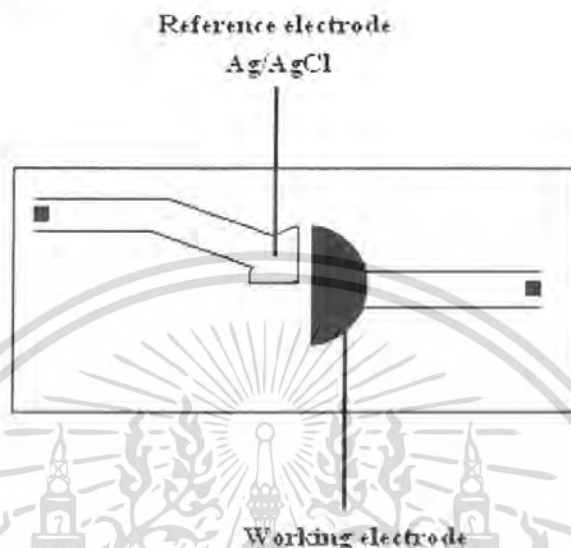


รูปที่ 2.5 โพเทนซีอเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัด AFP: (a) สกรีน-ปรีนต์ อิเล็กโทรดที่เตรียมพร้อมสำหรับเคลือบสารแอนติบอดี, (b) ไบโอดีน+ anti-AFP ที่เคลือบขั้วใช้งานบน สกรีน-ปรีนต์ อิเล็กโทรด, (c) การปรับปรุงขั้วด้วยกลูตาไรลดีไฮด์ ดังสมการหน้า 30. (d) การตรวจวัดตัวอย่าง AFP ได้จากการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดจากคบบังไอออนเนื่องมาจาก antigen-antibody reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรด Screen-printed Carbon Electrode (SPCE)[3].

เป็นการพัฒนาที่มีความสำคัญทางอิเล็กโทรด คือ การพัฒนาสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ซึ่งประกอบด้วยชั้นทำงานที่ทำด้วยผงคาร์บอน และอาศัยการพิมพ์หมึกลงบนแผ่นพีวีซี ขั้วอ้างอิงที่ใช้คือ Ag/AgCl ดังรูปที่ 2.6

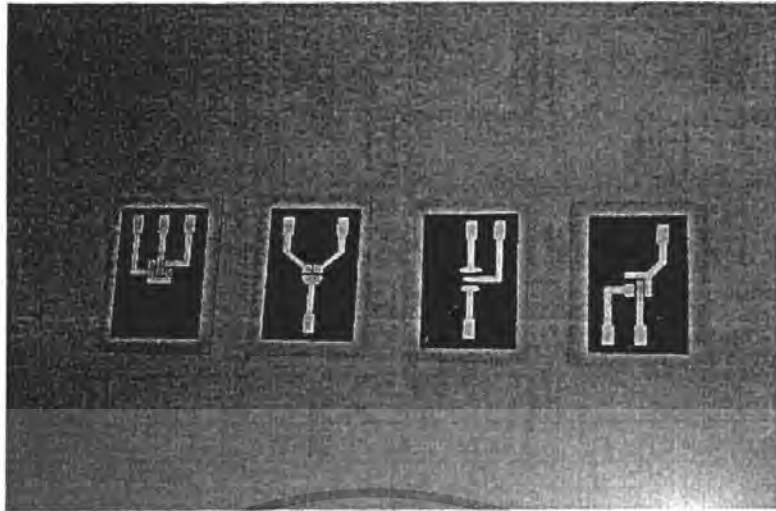


รูปที่ 2.6 ส่วนประกอบของแผ่นสกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรด

การโมดิฟายอิเล็กโทรดโดยวิธีนี้มีข้อดีที่สามารถนำสารโมดิฟายด์ที่ต้องการไป ตรึงบนอิเล็กโทรดได้ง่ายโดยการผสมสารโมดิฟายด์ต่างๆ ลงในหมึกคาร์บอน เช่น การผสมด้วยทอง เมอร์คิวรี สารคีเลต สำหรับใช้ในกระบวนการ stripping voltammetry หรือสารมีเดียมเตอร์ เช่น phthalocyanines เพอโรซีน (ทำหน้าที่ถ่ายทอดอิเล็กตรอน)หรือเอนไซม์ ข้อดีอีกประการหนึ่งของอิเล็กโทรดแบบนี้ คือ สามารถพัฒนาอิเล็กโทรดให้มีขนาดเล็กได้ทำให้มีราคาถูกลง ดังรูปที่ 2.7 เพื่อเป็นการพัฒนาออกสู่การค้าในลักษณะของอิเล็กโทรดที่ใช้แล้วทิ้ง (disposable)

นอกจากนี้แล้วสกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรด ยังมีคุณสมบัติที่ดีอีกหลายประการเช่น สามารถหลีกเลี่ยงสิ่งเจือปน ลดปัญหาสัญญาณที่วัดได้ค่อนข้างต่ำเนื่องจากประสิทธิภาพของขั้วต่ำลง และสามารถเตรียมขึ้นได้จำนวนมากบนแผ่นรองรับที่เหมือนกันหรือแตกต่างกัน.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

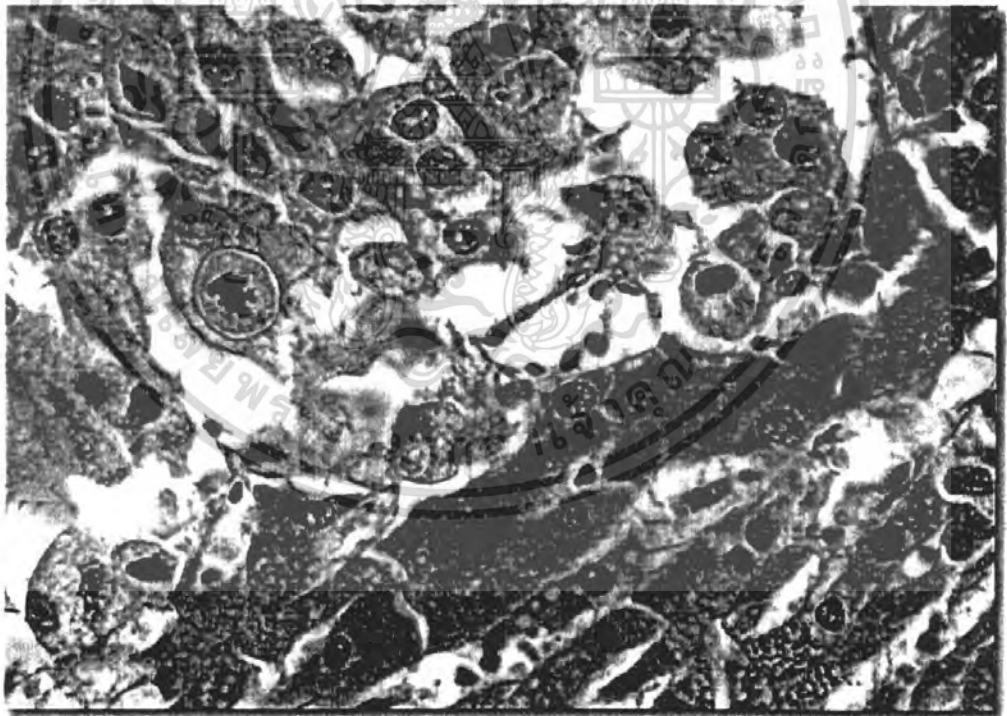
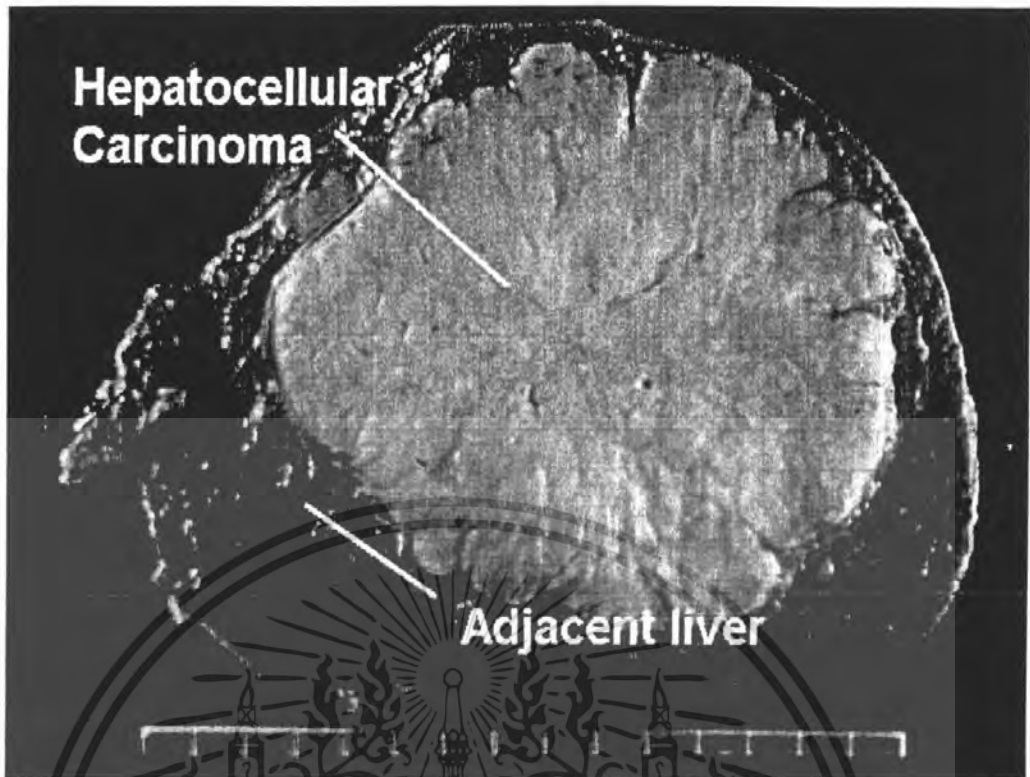


รูปที่ 2.7 สกรีน-ปรินท์อิเล็กทรอนิกส์

2.4 อัลฟาฟีโตโปรตีน alpha-1-fetoprotein (AFP)[2].

AFP เป็น Single chain glycoprotein ที่สร้างขึ้นโดยเซลล์ตับในระยะที่เป็นตัวอ่อนในครรภ์มารดา และหลั่งออกมาในกระแสเลือด ดังนั้นจะพบมีปริมาณสูงมากในเซรัมของทารกในครรภ์มารดา แต่ระดับ AFP จะลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังคลอดจนถึง 1 ปี ซึ่งจะตรวจพบในระดับต่ำมากจนแทบจะตรวจไม่พบในผู้ใหญ่ ดังนั้นถ้าตรวจพบว่ามีระดับสูงแสดงว่าอาจเป็นมะเร็งชนิดใดชนิดหนึ่งเพราะระดับของ AFP สัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งได้หลายชนิด ดังรูปที่ 2.9 เช่น testicular, lung, liver, stomach และ pancreas ดังรูปที่ 2.8 เป็นต้น [2-15]. พบว่าระดับของ AFP จะขึ้นสูงเป็นเวลานานก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการหรือสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีอื่น และหลังจากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาแล้ว การตรวจติดตามผลโดยดูจากระดับ AFP ลดลงจนถึงระดับปกติ มักแสดงให้เห็นว่าการรักษาได้ผล นั่นคือการเกิดผลของก้อนมะเร็ง อย่างไรก็ตามก็ตีในผู้ป่วยที่มีระดับ AFP ลดลงเป็นปกติแล้ว แต่ถ้าระดับ AFP กลับสูงขึ้นไปใหม่ นั่นจะแสดงให้เห็นทราบว่าโรคมะเร็งที่ผ่าตัดลงไปแล้ว กลับมาเจริญเติบโตขึ้นใหม่ได้อีกวนะหนึ่ง อนึ่งระดับของ AFP อาจสูงขึ้นได้ในภาวะอื่นๆเช่น ในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอักเสบ (hepatitis) หรือโรคตับแข็ง (cirrhosis) แต่ระดับจะไม่สูงเท่ากับผู้ป่วยที่เป็น โรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma

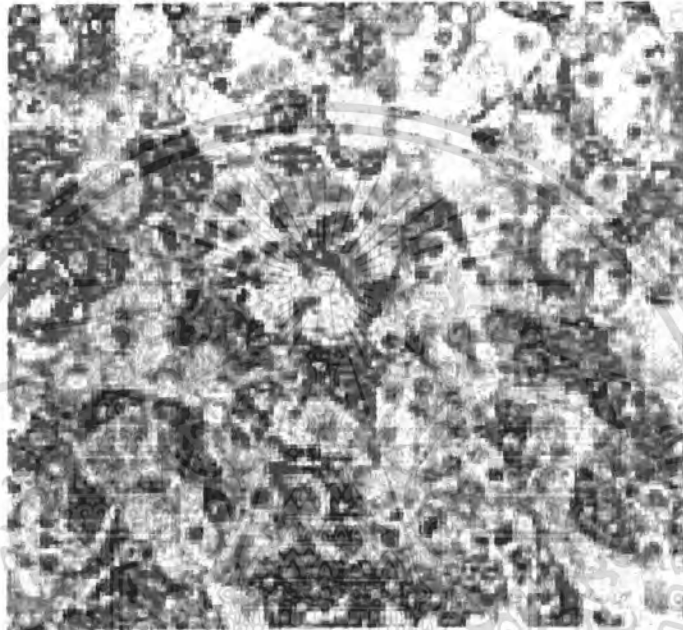
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 มะเร็งเซลล์ตับ (Hepatocellular carcinoma ; HCC) [4-9].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.9 อัลฟาฟิโตโปรตีน: ตัวอย่างมะเร็งตับชนิด Human fetal liver: แสดงการตรวจวัดด้วยเทคนิค immunohistochemical เพื่อตรวจจับ alpha fetoprotein โดยใช้ NCL-AFP [15].

2.4.1 องค์ประกอบทางเคมีอัลฟาฟิโตโปรตีน [15].

- AFP เป็นสารชีวโมเลกุลประเภท Single chain glycoprotein

2.4.2 แอนติบอดี (Ab) [3].

เป็นสาร โปรตีนอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลว ของร่างกาย สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ เมื่อมีแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย แอนติบอดีชนิดต่างๆ จะมาจับแอนติเจนอย่างเฉพาะเจาะจงเป็นชนิดๆ ไป ซึ่งจะมีปฏิกิริยาแตกต่างกันจะปล่อยสารที่เป็นพิษต่อต้านแอนติเจน โดยแอนติบอดี จะจับกับโมเลกุลของสารพิษ ที่แอนติเจนปล่อยออกมากลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่เรียกว่าสารประกอบแอนติเจน แอนติบอดี

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Chun-liag Feng (2000) ได้ศึกษาความไวของ Immunosensor โดยใช้เทคนิค potentiometric ในการวัด Immunoglobulin (IgG) ซึ่งทำการเคลือบ anti-IgG บน silver (Ag) electrode และทำการวัด IgG ในตัวอย่างโดยอาศัย antigen-antibody reaction ซึ่งผลจากการวิจัยนี้บ่งชี้ว่า การตรวจวัดจาก Immunosensor นี้ มีความไวจำเพาะเจาะจง ให้ค่าการวัดต่ำสุดที่ 0.2-1.2 ng/mL และมีอายุการใช้งาน 28 วัน

G. Guilbault (2001) ได้ศึกษาเครื่องมือในการวิเคราะห์ allergy antibodies (Ige) ในตัวอย่างเลือด ซึ่งการวิจัยได้ศึกษาเทคโนโลยีด้าน screen-printed carbon electrode (SPCE) และ เทคนิค amperometric โดยจะวัด p-aminophenyl ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จาก alkaline phosphatase ที่ +300 mV บนขั้วสกรีน-ปรินท์ ซึ่งเกิดกระบวนการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในการวัด IgE โดยการหยดตัวอย่างเลือดที่ขั้ว ซึ่งจะให้กระแสออกมา ผลการวิจัยพบว่า ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัด IgE โดยวิธีนี้ คือ 0.09 ng/mL และใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์เพียง 30 นาที

Huangxian Ju (2004) ได้ผลิต Immunosensor ที่ใช้แล้วทั้งในการตรวจวัด AFP ในซีรัมมนุษย์ อิมมูโนเซนเซอร์ถูกเตรียมโดยตรงแอนติบอดีไว้กับเยื่อไคโทซานซึ่งเคลือบบน SPCE แอนติบอดีดังกล่าวได้ถูกติดฉลากไว้ด้วย horseradish peroxidase (HRP) เยื่อไคโทซานถูกตรวจสอบโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและใช้วิธีทางเคมีไฟฟ้า การเชื่อมอิมมูโนเซนเซอร์ใน AFP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 35 นาทีจะทำให้ HRP ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันไทโอดินโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บางส่วนถูกยับยั้ง ในการทดลองซึ่งใช้ไทโอดิน 1.2 mM และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 6 mM พบว่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยาจะลดลงเป็นเส้นตรงใน 2 ช่วง เมื่อมี AFP อยู่ในช่วง 0-20 ng/mL และช่วง 20-150 ng/mL ด้วยขีดจำกัดอยู่ที่ 0.74 ng/mL วิธีนี้ให้ผลถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีการอิมมูโน-รังสี ในการเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธี พบว่า สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ที่ 6.6% และ 4.2% เมื่อใช้ AFP 10 ng/mL และ 100 ng/mL ตามลำดับ สารละลาย AFP ที่เตรียมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 สามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 10 วัน ที่ 4°C วิธีการที่ได้กล่าวมาสามารถใช้ตรวจ AFP ได้ในขั้นตอนเดียว และใช้ได้ดีในการวิเคราะห์ทางการแพทย์

Ruo Yuan (2005) และคณะได้ทำการศึกษา potentiometric Immunosensor สำหรับตรวจวัดสาร AFP ในมนุษย์ โดยการตรึงสาร anti-AFP บนผิว platinum disk electrode ซึ่งใช้ gelatin film และ silver nanoparticles เป็นตัวเชื่อมสาร anti-AFP ให้ติดกับขั้วอิเล็กโทรดและเติม glutaraldehyde เพื่อกระตุ้นให้เกิด antigen-antibody reaction และ electrochemical reaction เมื่อเติมสารตัวอย่าง AFP งานวิจัยชิ้นนี้แสดง ความไวในการตรวจวัด ระยะเวลาในการวิเคราะห์ที่น้อยกว่า 5 นาที และขั้วอิเล็กโทรด ที่มีการเคลือบสารดังกล่าว มีระยะเวลาใช้งานนาน 60 วัน ที่ pH และอุณหภูมิควบคุม

Estene Fabregas (2007) ได้ประยุกต์ screen-printed electrochemical Immunosensor โดยการใช้ carbon nanotube เป็น nanoparticles บนผิว transducer ที่ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวขั้วซึ่งจะส่งผลให้การวัดที่รวดเร็วขึ้น โดย membrane ซึ่งตรึงบนผิวจะเป็น carbon nanotube / polysulfone membrane จากผลการวิจัยไบโอเซนเซอร์ดังกล่าวนี้ พบว่ากระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของ horse radish peroxidase (HRP) enzyme ที่ติดฉลากกับ anti-RIGG บนขั้ว ซึ่งจะให้ค่าความไวสูงกว่า graphite electrodes ถึง 5 เท่า และค่าต่ำสุดที่วัดได้ คือ 1.66 ng/mL

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การดำเนินงานโครงการพิเศษ

การวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัย เพื่อเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อเล็กโทรด สำหรับตรวจวัดสาร AFP โดยเทคนิคโพเทนชิออสแตทิก ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของขั้วดังกล่าว ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยดังนี้

- 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี
- 3.2 การเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อเล็กโทรด
- 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพสกรีน-ปริ้นท์อเล็กโทรด
- 3.4 วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องตรวจวัดพี-เอช รุ่น Metrohm 654 (Metrohm, Switzerland)
2. เครื่องทำน้ำปราศจากไอออนรุ่น Mill – Q (Milford , MA ,USA)
3. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด (Denver Instrument Company, USA)
4. เครื่องอัลตราโซนิค (รุ่น Eltrosonic type 0.7 profi , USA)
5. เครื่องกรองแบบลดความดัน (Tokyo Rikkakai Co ,Ltd.Type A-3s, Japan)
6. สกรีน-ปริ้นท์อเล็กโทรด (SPCE)
7. ไมโครปิเปต
8. โดคูคความชื้น
9. คู่มือสาร

3.1.2 สารเคมี

1. Monoclonal Anti- α -Fetoprotein(AFP)CLONE C3 Mouse Ascites Fluid(SIGMA, USA)
2. Monoclonal α -Fetoprotein(AFP)(AFP Control)(สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, ประเทศไทย)
3. AFP ELISA kits(สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, ประเทศไทย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Glutaraldehyde (Analytical grade, SIGMA, USA)
5. Potassium hexacyanoferrate (II)(III) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
6. Phosphate – buffered Solution (PBS) pH6.5,pH7 (Analytical grade, Merck Ltd, Thailand)
7. Gelatin solution (Analytical grade, SIGMA, USA)
8. Biotin solution (Analytical grade, SIGMA, USA)
9. Serum sample (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, ประเทศไทย)
10. Distilled water

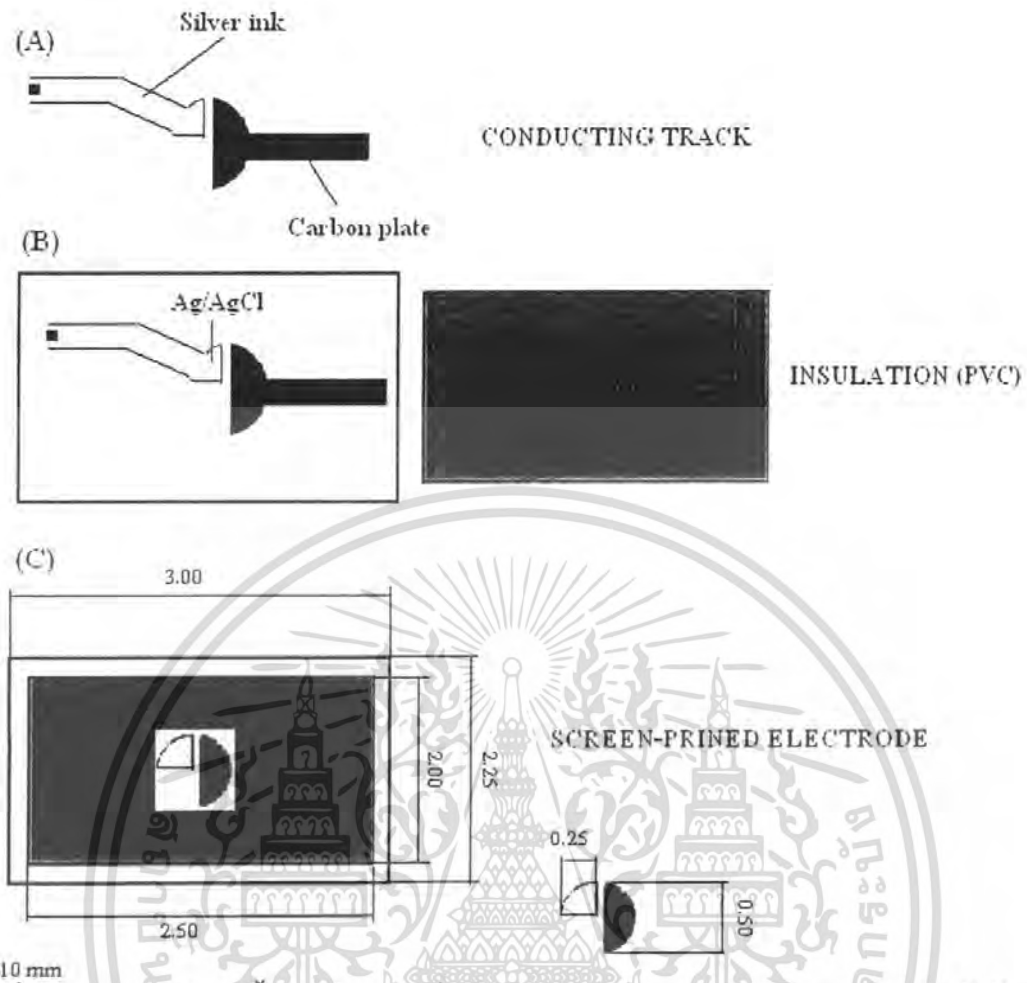
3.2 การเตรียมสกรีน-ปริ้นท์อิเล็กทรอนิกส์

3.2.1 การสร้างขั้วไฟฟ้าสกรีน-ปริ้นท์

ออกแบบลายสกรีน ซึ่งเป็นการกำหนดขนาด ตำแหน่ง และรูปร่างของขั้วไฟฟ้า โดยใช้โปรแกรม Corel Draw Version 12 และ โปรแกรม Adobe Illustrator Creative Suit 2 ซึ่งลายสกรีนจะประกอบด้วยชั้นทั้งหมด 4 ชั้น เรียงลำดับจากชั้นล่างสุด คือ

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

ลายแบบสกรีนทั้ง 4 แบบที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้แสดงดังรูปที่ที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงสกรีน-ปรินต์อิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมได้: (A) การสกรีนลายแถบการนำไฟฟ้าด้วยหมึกซิลเวอร์บนแผ่นพีวีซี, (B) ทำการสกรีนขั้วไฟฟ้าใช้งานด้วยหมึกคาร์บอน และขั้วไฟฟ้าอ้างอิงด้วยหมึกซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์, (C) สกรีนลายฉนวนไฟฟ้าด้วยสีน้ำมัน

- 3.3.1 นำแบบที่ได้ไปเตรียมเฟรมสกรีน โดยพิมพ์แม่พิมพ์โดยวิธีกาอัด จากนั้นจึงผ้าสกรีนที่พิมพ์แม่พิมพ์แล้วลงบนกรอบอลูมิเนียม
- 3.3.2 ทำการสกรีนลายแถบการนำไฟฟ้าด้วยหมึกซิลเวอร์บนแผ่นพีวีซี นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในหมึกซิลเวอร์
- 3.3.3 ทำการสกรีนขั้วไฟฟ้าใช้งาน และจุดตรวจวัดด้วยหมึกคาร์บอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในหมึกคาร์บอน
- 3.3.4 ทำการสกรีนขั้วไฟฟ้าอ้างอิงด้วยหมึกซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในหมึกซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์
- 3.3.5 ทำการสกรีนลายฉนวนไฟฟ้าด้วยสีน้ำมัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อ

ระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในสีน้ำมัน การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การทดสอบขั้วไฟฟ้า

1. ต่อสกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรดที่เตรียมได้เข้ากับตำแหน่งขั้วไฟฟ้าของเครื่องตรวจวัดเพื่อทำการทดสอบ
2. ปิเปตสารละลาย $0.005\text{ M K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ปริมาตร $10\ \mu\text{L}$ หยดลงบนสกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรดตรวจวัดด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี
3. เก็บชิ้นงานที่มีประสิทธิภาพไว้จากนั้นทดสอบชิ้นงานต่อไปตามขั้นตอนที่ 1 และ 2

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การตรึงด้วย AFP และปรับปรุงขั้วบนสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด

- 3.4.1.1 นำแผ่น SPCE สำเร็จรูปที่เตรียมไว้ ล้างด้วย $0.1\text{ M nitric acid acetone}$ และ น้ำกลั่น ปริมาตร $10\ \mu\text{L}$ อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับจากนั้นเป่าให้แห้งด้วย air-dried ที่อุณหภูมิห้อง
- 3.4.1.2 เตรียมเยื่อเมมเบรน โดยผสม anti-AFP (1 ng/mL) ปริมาณ $20\ \mu\text{L}$ และสารละลายไบโอติน $20\ \mu\text{L}$ ที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งไว้ 2 นาที
- 3.4.1.3 ปิเปตสารละลายผสมในข้อ 3.4.1.2 มา $20\ \mu\text{L}$ หยดบนขั้วใช้งานทิ้งไว้ 10 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C แล้วค่อยๆชะสารที่เคลื่อนบนขั้วออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 และเป่าให้แห้งด้วย air-dried
- 3.4.1.4 ปรับปรุงขั้วใช้งานโดยการหยดสารละลาย glutaraldehyde (wt%, 0.3%) ปริมาตร $10\ \mu\text{L}$ ทิ้งไว้ 30 นาที และพักไว้ 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C แล้วเก็บภายใต้สภาวะ PBS pH 7 ก่อนการใช้งาน

3.4.2 การหาสภาวะทางเคมีไฟฟ้าของขั้วที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี

3.4.2.1 การหา pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde (จากข้อ 3.4.1) มาจุ่มลงใน สารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium hexacyanoferate(II)(III) เข้มข้น 0.005 M ปริมาณ 25 mL) จำนวน 25 mL หยดสารละลาย AFP เข้มข้น 10.80 mg/mL ปริมาณ 0.2 mL ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสารละลาย AFP เท่ากับ 85.71 ng/mL ปั่นกวอนสารละลายด้วยเครื่องปั่นกวอน ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้น ทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 1 M ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 5, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ แล้วบันทึกค่าศักย์ไฟฟ้า (mV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde (จากข้อ 3.4.1) มาจุ่มลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมที่มีสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL (จากข้อ 3.4.3.1) ปั่นกวนสารละลายด้วยเครื่องปั่นกวน ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นให้ความร้อนด้วยแท่นให้ความร้อนพร้อมกับปั่นกวน แล้วบันทึกศักย์ไฟฟ้าด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 °C ตามลำดับ

3.4.2.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการอ่านค่าศักย์ไฟฟ้า

เปิดสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมที่มีสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL (ข้อ 3.4.2.1) แล้วเปิดปริมาตร 10 μ L หยดลงบนแผ่นสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า ทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เทคนิคโพเทนชิอเมทรี

ทำซ้ำตั้งแต่ต้น โดยเปลี่ยนแผ่นสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรดใหม่ แล้วหาเวลาที่เหมาะสมในการอ่านค่าศักย์ไฟฟ้า

3.4.3 การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP

3.4.3.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรงของการวัดสารละลาย

หาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 0 – 214.44 ng/mL แล้วเปิดมาจำนวน 10 μ L หยดลงบนแผ่นสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด วัดค่าศักย์ไฟฟ้าด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี ทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้

3.4.3.2 การศึกษาความเที่ยง

ทำการวัด AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม ดังข้อ 3.4.2.1 ในสถานะที่ pH เหมาะสมโดยหยดลงบนแผ่นสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรดปริมาตร 10 μ L แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี 20 ครั้ง แล้วหาค่า %RSD (Percent of Relative Standard Deviation)

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

SD. คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการวัดทั้ง 20 ครั้ง

\bar{X} คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ยที่ได้จากการตรวจวัดทั้ง 20 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3.3 การศึกษาขีดจำกัดในการวิเคราะห์

ทำการวัด AFP เข้มข้น 6.1 – 339.53 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม ดังข้อ 3.4.2.1 ในสถานะที่ pH เหมาะสม แล้ววัดศักย์ไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคโพเทนชิอเมทรี นำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้า กับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 0 – 339.53 ng/mL แล้วคำนวณค่าขีดจำกัดในการวิเคราะห์ โดยการพลอตแบบแกรน (Gran's plot)[16].

3.4.3.4 การหาอายุการใช้งานของขั้ว

ทำการวัด AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม ดังข้อ 3.4.2.1 ในสถานะที่ pH เหมาะสม แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า โดยใช้เทคนิคโพเทนชิอเมทรี บันทึกค่าศักย์ไฟฟ้าทุกวัน โดยไม่ต้องทำความสะอาดผิวหน้าขั้วหลังการวัด (โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และที่สถานะ pH เหมาะสม) วัดจนกระทั่งค่าศักย์ไฟฟ้าลดลงต่ำกว่า 50% ของครั้งแรก จำนวนครั้งที่วัดจนทำให้กระแสลดลงเหลือครึ่งหนึ่งจะเป็นครึ่งชีวิตของขั้วไฟฟ้า

3.4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP

ในการตรวจวัดหา AFP ในตัวอย่างซีรัมมนุษย์ จะใช้แผ่นสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด วัดสารตัวอย่างด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรีที่สถานะการทดลอง pH เท่ากับ 6.5 และสร้างกราฟมาตรฐานโดยพล็อตกราฟ ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้ากับความเข้มข้นมาตรฐาน AFP จากนั้นนำค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากตัวอย่าง ไปเทียบกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้น

3.4.3.5.1 การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

ปิเปต ตัวอย่างซีรัม AFP ที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 10 μ L ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้นปิเปตสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium -hexacyanoferate (III) เข้มข้น 0.005 M ปริมาณ 25 mL pH เหมาะสมที่ 6.5) ปริมาตร 10 μ L ผสมให้เข้ากัน จากนั้น ปิเปต สารตัวอย่าง AFP ในหลอดเก็บตัวอย่าง มา 10 μ L หยดลงบนสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ให้เคลือบคลุมขั้วทั้งหมด แล้วบันทึกศักย์ไฟฟ้าด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี

3.4.3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่าง

นำค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จาก ตัวอย่างซีรัม AFP ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curv) แล้วอ่านค่าความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารตัวอย่าง AFP ที่วัดได้ จากสกรีน-ปรีนท์ อิเล็กโทรดที่สร้างขึ้น กับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผล

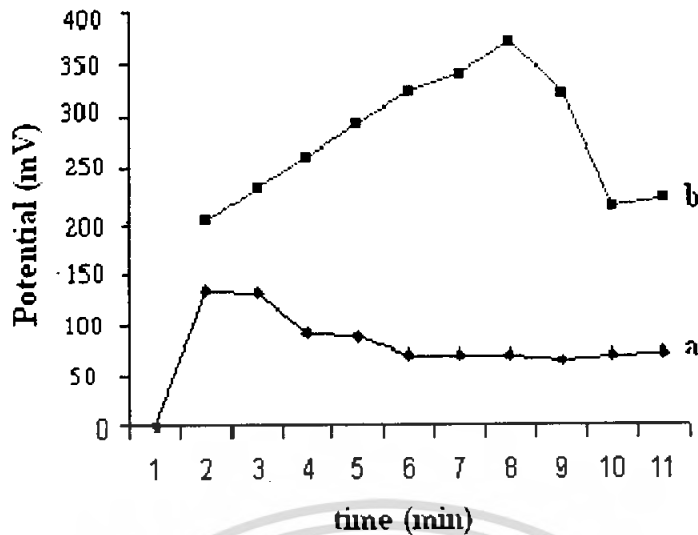
4.1 การสร้างสกรีน-ปรีนต์อิเล็กโทรด โดยการตรึงสาร anti-AFP และ ปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde

4.1.1 กำหนดสภาวะตัวแปรในการทดลองไว้ดังนี้

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

การทดสอบประสิทธิภาพขั้วไฟฟ้า

เปิดสารละลาย 0.005 M $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ ปริมาตร 10 μ L ลงบนสกรีน-ปรีนต์อิเล็กโทรด ให้ครอบคลุมขั้วทั้งหมดแล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตรีได้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดจากสกรีน-ปรีนต์ อิเล็กโทรดที่ตรึงสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde และค่าศักย์ไฟฟ้าของขั้วที่ยังไม่มีการปรับปรุง แสดงดังรูปที่ 4.1



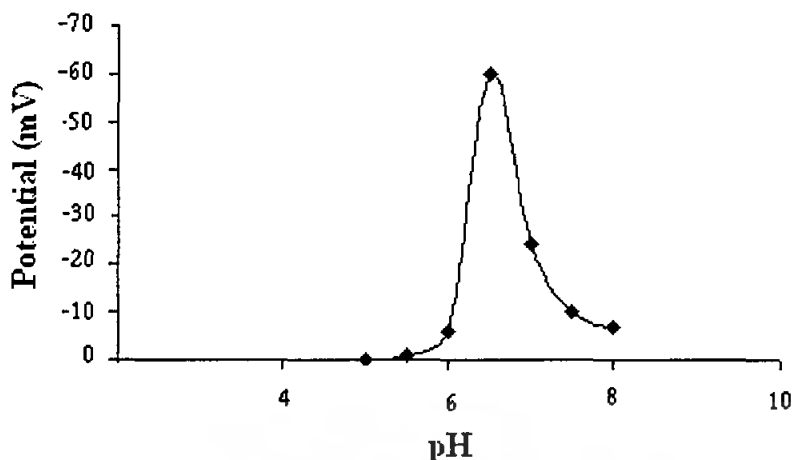
รูปที่ 4.1 ค่าศักย์ไฟฟ้าของละลาย $0.005 \text{ M Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ โดย: (a) ขั้วที่ตรงสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde และ (b) ขั้วที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุง

จากรูปที่ 1.4 จะเห็นว่า ค่าศักย์ไฟฟ้า ที่เกิดจากการวัดสารละลาย $0.005 \text{ M Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ โดยขั้วที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุง จะมีค่าสูงกว่า การวัดโดยขั้วที่ ตรงสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde เนื่องจากสารละลาย Potassium hexacyanoferrate (II)(III) มีการแตกตัวแล้วได้ Fe(CN)_6^{4-} และ Fe(CN)_6^{3-} ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนบริเวณผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรด และขั้วที่ตรงด้วยสาร anti-AFP ถูกปกคลุมด้วยสารดังกล่าวที่ผิวหน้าขั้วใช้งาน จึงทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนได้ลดลง

4.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP

4.2.1 ค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด AFP

จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตรีที่ pH เท่ากับ 5, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ได้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้า กับค่า pH ดังรูปที่ 4.2

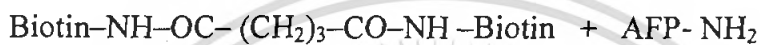
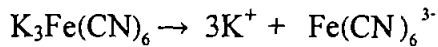
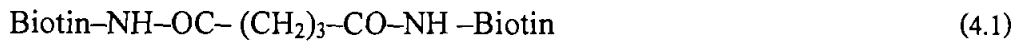
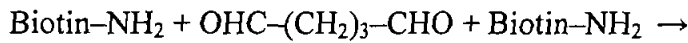


รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมกับค่าความต่างศักย์ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL โดยสกรีน-ปรีนท์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตรี

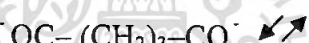
ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด AFP ที่ความเข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม ที่ pH เท่ากับ 6.5 จะได้ค่าศักย์ไฟฟ้าสูงที่สุด แต่จะมีค่าต่ำกว่าการวัดโดยขั้วที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุง (ปราศจาก AFP) (จากรูป 4.1) เนื่องจาก biotinylated ~ anti-AFP ที่เคลือบบนขั้วใช้งานในสกรีน-ปรีนท์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงโดย Glutaraldehyde ซึ่งเป็นสารกลุ่ม bifunctional ที่มีหมู่ -CHO สามารถทำปฏิกิริยา cross linkage กับหมู่ amino ของ anti-AFP ดังสมการที่ 4.1 และเมื่อจุ่มลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม ที่มีสารละลาย $K_4Fe(CN)_6 + K_3Fe(CN)_6$ จะแตกตัวแล้วได้ $Fe(CN)_6^{4-}$ และ $Fe(CN)_6^{3-}$ ตามลำดับ ดังสมการที่ 4.2 ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนบริเวณผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรด[2]. จากนั้นเมื่อหยดสาร AFP สารดังกล่าวจะเข้าจับ anti-AFP ที่เคลือบบนขั้ว เกิด antigen-antibody reaction และเกิดไอออนอิสระของ Glutaraldehyde ดังสมการที่ 4.3 ทั้งนี้การเกิด antigen-antibody reaction จะบดบัง ไอออนที่เกิดขึ้นทั้งหมดบนผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดส่งผลต่อค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดต่ำลง ดังรูปที่ 4.2

จากรูปที่ 4.2 พบว่าที่ pH เท่ากับ 5 ถึง pH เท่ากับ 6 จะมีค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของ $Fe(CN)_6^{4-}$ และ $Fe(CN)_6^{3-}$ และจะมีค่าศักย์ไฟฟ้าสูงที่สุดที่ pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นหรือมีสภาวะที่เป็นเบสเพิ่มมากขึ้น ค่าศักย์ไฟฟ้าจะมีแนวโน้มที่ลดลง เนื่องจาก Fe^{3+} จาก $Fe(CN)_6^{3-}$ แตกตัวจับกับ OH^- เกิดเป็น $Fe(OH)_3$ ดังภาคผนวก ข. ทำให้ปริมาณ $Fe(CN)_6^{3-}$ ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนบริเวณผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดลดลง

จากรูปที่ 4.2 เมื่ออ่านค่าค่าความต่างศักย์ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมที่ pH เท่ากับ 5, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 พบว่า ที่ pH 6.5 ให้ค่าศักย์ไฟฟ้า (-mV) สูงที่สุดคือ -60.43 ± 0.2506 mV (ภาคผนวก ข.)



“antigen-antibody reaction”

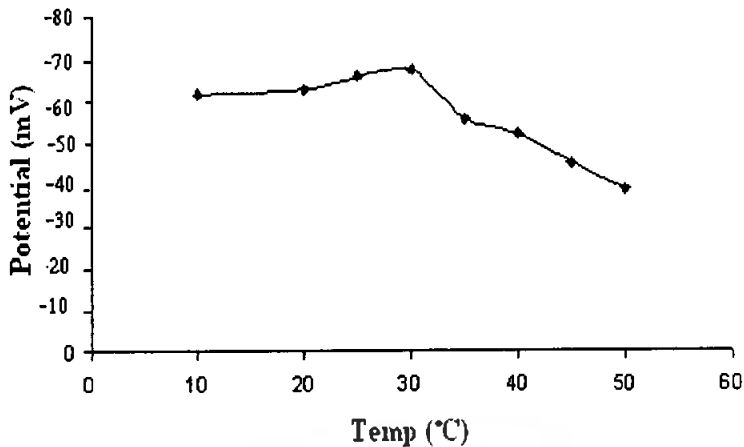


(4.3)

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

4.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 80.71 ng/mL ในสารละลาย อิเล็กโทรไลต์ผสม ที่ pH 6.5 โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตรีพร้อมกัน ให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 °C ได้ค่าศักย์ไฟฟ้าสัมพันธ์กับอุณหภูมิ ดังรูปที่ที่ 4.4

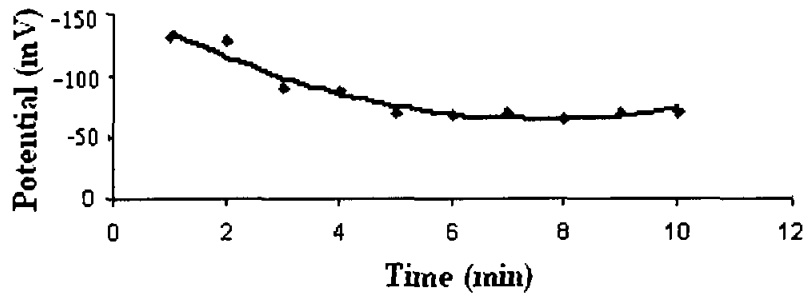


รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้ากับค่าอุณหภูมิต่าง ๆ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL โดย สกริน-ปรินท์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตรี

จากการศึกษา พบว่าอุณหภูมิต่างๆ มีความสำคัญต่อการวิเคราะห์สารด้านชีวโมเลกุล จากผลการวิจัย ความความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้ากับอุณหภูมิต่างๆ ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมโดย สกริน-ปรินท์อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตรี พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 °C ค่าศักย์ไฟฟ้าที่อ่านได้มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากการที่สาร AFP ในสารละลาย และ anti - AFP ที่เคลือบบนขั้วอิเล็กโทรดเสถียรภาพ ส่งผลให้ช่องว่างที่ $Fe(CN)_6^{4-}$ และ $Fe(CN)_6^{3-}$ เข้าทำปฏิกิริยามีขนาดแคบลง ทำให้การตรวจวัดไอออนบริเวณผิวหน้าขั้วดังกล่าวลดลง ดังนั้น จึงต้องรักษา สกริน-ปรินท์อิเล็กโทรดและ สารตัวอย่างในการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิต่ำ ตลอดจนรักษาระดับอุณหภูมิในการทดลอง จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การตรวจวัดสาร AFP โดย สกริน-ปรินท์อิเล็กโทรด สามารถทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิต่ำได้

4.2.3 เวลาที่เหมาะสมในการอ่านค่าศักย์ไฟฟ้า

จากการนำสารละลาย อิเล็กโทรไลต์ผสมที่มีสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL มาหยดบนแผ่นสกริน-ปรินท์อิเล็กโทรดปริมาตร 10 μ L แล้ววัดศักย์ไฟฟ้าทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เทคนิคโพเทนชิอเมตรี ค่าศักย์ไฟฟ้า (mV) ที่อ่านได้ แสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ค่า ศักย์ไฟฟ้า (mV) ของสารละลาย AFP เข้มข้น 10.02 ng/mL ที่แสดงค่า ณ นาทีต่างๆ จากการตรวจวัดโดย แผ่นสกิน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี

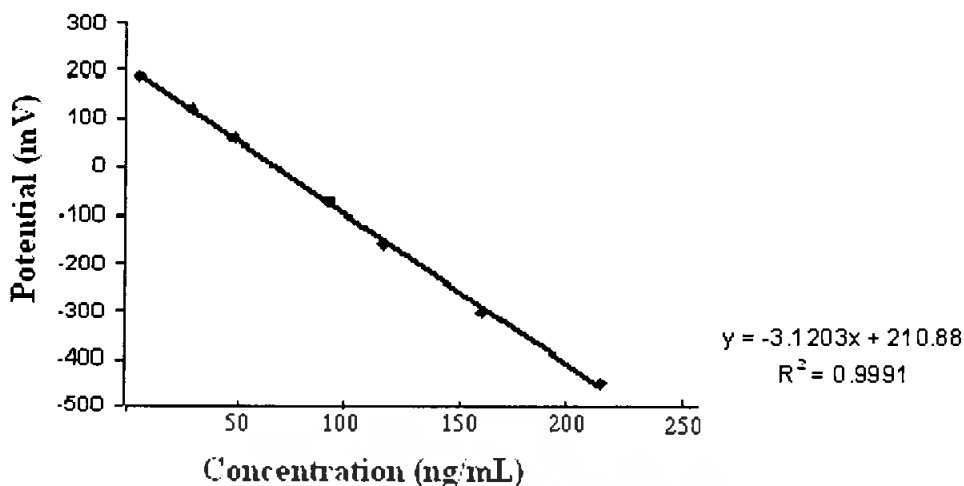
จากการศึกษา พบว่า ค่าศักย์ไฟฟ้า ของสารละลาย AFP จะมีค่าลดลงในนาทีที่ 1 จนถึง นาทีที่ 5 แล้วจะคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที อยู่ในช่วง -60.43 ± 0.2506 mV (ภาคผนวก ข) และ หลังจากนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าไป จากกราฟ (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่อ่าน เมื่อเวลา 5 นาที จะเสถียรที่สุด

4.3 การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP

4.3.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรงของการวัดสารละลาย AFP

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า การตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม บีเปตจำนวน 10 μ L วิเคราะห์โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี ที่ pH 6.5 จะได้ค่าศักย์ไฟฟ้าดีที่สุด เนื่องจากสภาวะที่ pH เท่ากับ 6.5 มีความเหมาะสมในการเกิดแตกตัวของ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ และ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ในสารละลายที่มี $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ บริเวณผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรด แต่เมื่อตรวจวัด สารละลาย AFP ที่มีความเข้มข้นต่างๆ สาร AFP จะเข้าจับกับ anti-AFP ที่เคลือบบนขั้วอิเล็กโทรด เกิด antigen-antibody reaction บดบังไอออนคิงกล่าว บนผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดส่งผลต่อค่า ศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในลักษณะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารละลาย

ดังนั้นจึงการศึกษา สภาพความไวของขั้ว เพื่อหาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น โดย การวัดค่าศักย์ไฟฟ้ากับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 0–214.4 ng/mL แสดงความสัมพันธ์ ดังรูป ที่ 4.6



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

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

4.3.2 การศึกษาความเที่ยง

ผลจากการวัด AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมในสถานะที่ pH 6.5 แล้ววัดศักย์ไฟฟ้าโดยการหยดบนสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ครอบคลุมขั้วไฟฟ้าทำงาน ปริมาตร 10 μL โดยใช้เทคนิคโพเทนชิอเมทรีทั้งหมด 20 ครั้ง ได้ค่าศักย์ไฟฟ้าทั้งหมด 20 ค่า (ภาคผนวก ค.) คำนวณค่า %RSD แสดงได้ดังตารางที่ 4.1

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

SD. คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสที่ได้จากการวัดทั้ง 20 ครั้ง

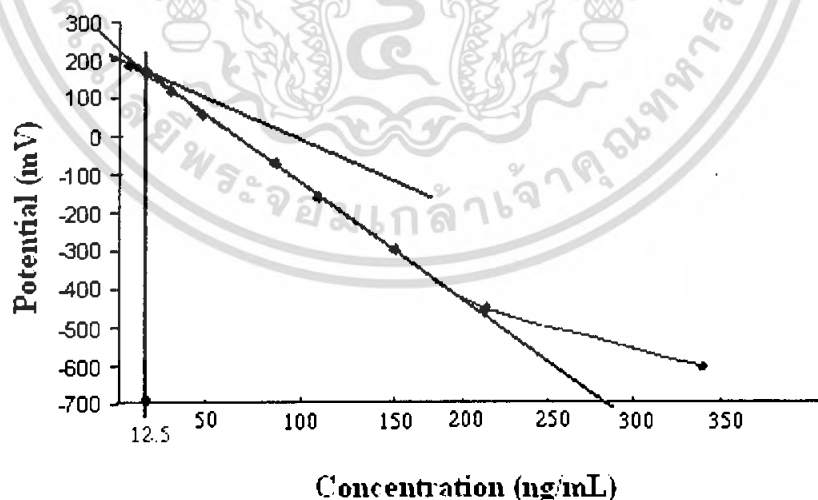
\bar{x} คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ยที่ได้จากการตรวจวัดทั้ง 20 ครั้ง

ตารางที่ 4.1 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ย และ %RSD (Percent of Relative Standard Deviation) จากการวัด AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม โดยหยดบนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี

ค่าที่ได้จากการทดลอง	ขั้วที่ตรึงสาร anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde
ค่าศักย์ไฟฟ้า (mV)	-61.01± 0.2506
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-1.491
%RSD	2.46

4.3.3 การศึกษาขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP

จากการหาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น โดยการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า กับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 6.1 – 339.53 ng/mL แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น (รูปที่ 4.7) และหาขีดจำกัดในการวิเคราะห์ โดยการพล็อตแบบแกรน (Gran's plot)(ภาคผนวก ก) จะได้ขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP เท่ากับ 12.5 ng/mL

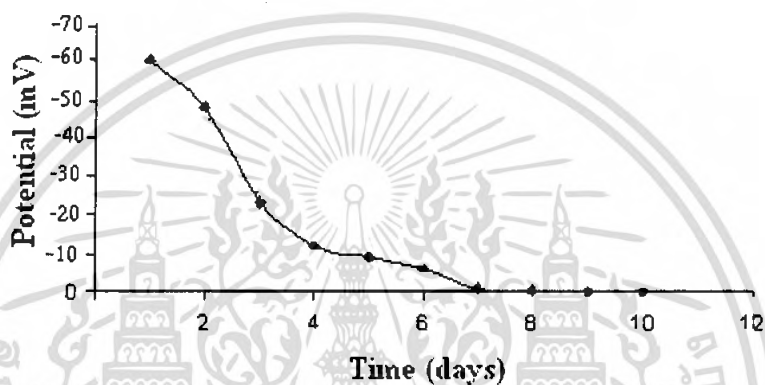


รูปที่ 4.7 แสดงการหาขีดจำกัดในการการตรวจวัด AFP โดยการพล็อตแบบแกรน (Gran's plot)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 อายุการใช้งานของขั้ว

จากการวัด AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมที่ pH 6.5 แล้ววัดศักย์ไฟฟ้า โดยใช้เทคนิคโพเทนชิโอเมตรี ได้ค่าศักย์ไฟฟ้า เท่ากับ -60.13 ± 0.0580 mV ในวันแรกของการทดลอง จากนั้นวัดซ้ำขั้วเดิม โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และที่สภาวะ pH 6.5 พบว่า ค่าศักย์ไฟฟ้ามีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 2 วัดได้ -43.37 ± 0.3055 mV แสดงดังรูปที่ 4.8 ดังนั้น การวัดโดยสกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรด สำหรับสาร AFP ด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมตรี จะเป็นในลักษณะใช้แล้วทิ้ง(disposable)



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงค่า Potentiometric responses (mV) ที่วัดโดยสกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรดสำหรับสาร AFP ด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมตรี ในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่างซีรัมด้วยเทคนิคโพเทนชิอิมมูโนเซนเซอร์

จากการตรวจวัด ตัวอย่างซีรัม 5 ตัวอย่าง เพื่อหาวิเคราะห์ AFP โดยเทคนิค โพเทนชิอิมมูโนเซนเซอร์ โดยใช้สกรีน-ปรีนท์อิเล็กโทรด ได้ค่า potantail ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าศักย์ไฟฟ้าจากการวัดตัวอย่างซีรัม 5 ตัวอย่าง โดยเทคนิค โพเทนชิอิมมูโนเซนเซอร์

Samples	Concentration of AFP by	
	Y= -3.1203X +210.88 (ng/mL)	
1	15.60±0.0863	
2	32.54±0.0529	
3	48.32±0.0300	
4	111.22±0.0505	
5	200.92±0.0682	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดสารAFPกับเทคนิคElectrochemiluminescence-immunoassay (ECLIA)

ผลการเปรียบเทียบ ตัวอย่างซีรัมเพื่อหาค่า AFP จากสกรีน-ปรีนท์ อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้นกับการวัดโดยเทคนิคElectrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวัดสาร AFP ด้วย สกรีน-ปรีนท์ อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้นกับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)(ภาคผนวก ง.)

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

จากการเปรียบเทียบระหว่างการวัดโดยเทคนิค SPCE immunosensor และ เทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) โดยใช้สถิติทดสอบที่เรียกว่า Pair t-test ได้ค่า t เท่ากับ 0.6094 ซึ่งน้อยกว่าค่า t จากตาราง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่ df = 4 มีเท่ากับ 2.78 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร AFP ด้วยสกรีน-ปรินท์อิเล็กโทรด โดยเทคนิค โฟเทนซิอเมทรี อิมมูโนเซนเซอร์ พร้อมทั้งศึกษาถึงสภาวะในการตรวจวัด และศึกษาประสิทธิภาพของการวัด AFP จากสกรีน – ปรินท์อิเล็กโทรดที่สร้างขึ้น เปรียบเทียบกับเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ซึ่งสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

5.1.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP คือ ตรวจวัดสารตัวอย่าง AFP ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม (สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 25 mL และสารละลาย Potassium hexacyanoferrate (III) เข้มข้น 0.005M ปริมาณ 25 mL)

อัตราส่วน สารตัวอย่าง AFP : สารละลายอิเล็กโทรไลต์ [1:1] ดังสภาวะ ที่แสดงในตารางที่ 5.1

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

5.1.3 ผลการเปรียบเทียบ ตัวอย่างซีรัมเพื่อหาค่า AFP จากสกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ที่สร้างขึ้นกับการวัดโดยเทคนิค Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ได้ผลการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับ ดังตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP

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

ตารางที่ 5.2 สมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP แล้วปรับปรุงด้วย Glutaraldehyde

Parameter	ค่าที่ตรวจวัดได้
1.ช่วงความเป็นเส้นตรง	ช่วงความเข้มข้น 6.1-214.4 ng/mL
2.% RSD	2.46
3.Detection Limit (ng/mL)	12.5
4.อายุการใช้งาน (Day)	1

ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบความถูกต้องของการวัดสาร AFP ด้วย SPCE immunosensor เทียบกับเทคนิค ECLIA

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

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 5.2.1 ควรวัดตัวอย่างซีรัมให้หลากหลายความเข้มข้น เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการวิเคราะห์
- 5.2.2 ในการทดสอบตัวอย่างเพื่อทำการวัด ซึ่งมีปริมาณน้อย จะทำให้สารบนผิวหน้าขั้วแห้ง จึงควรมีการศึกษาวิธีการควบคุมขณะทำการวิเคราะห์
- 5.2.3 ควรมีการเปรียบเทียบ ค่าการวัดตัวอย่างซีรัมเพื่อหาค่า AFP ในวิธีวิเคราะห์อื่นๆ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับ มากขึ้น
- 5.2.4 ควรศึกษาปรับปรุงขั้วไฟฟ้า เพื่อให้สามารถวัดช่วงความเข้มข้นที่มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง.

- [1] เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ (2549). เคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
- [2] ชีรนุช วิชญานันท์ (2548). ชีวเคมีขั้นสูง. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง
- [3] โสภา กลิ่นจันทร์. (2546). ไบโอดีเซ็นเซอร์เบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร ศูนย์ผลิตตำราเรียน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
- [4] สถานวิทยามะเร็งศิริราชพยาบาล คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. (2549) มะเร็งตับ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล
- [5] Adamowicz E, and Burstein C, (1987) L-lactate enzyme electrode obtained with immobilized respiratory chain from e. coli and oxygen probe for specific determination of L-lactate in yogurt, wine and blood. Biosensors, 3,27-43.
- [6] Braun, R.D. "Introduction to Instrumental Analysis" Mc.Graw-Hill Book Company, International Edition, Singapore. 1987. 126-150
- [7] "Calomel electrode" (online) Available :
[http://www.answers.com/topic/saturated-calomel-electrode.](http://www.answers.com/topic/saturated-calomel-electrode)
- [8] Giasstone, S. "An Introduction to Electrochemistry" Van Nostrand-Reinhold Princeton, New Jersey, 19-42.
- [9] Greg L, Perkins, Evand D. Skater, Georganne K. sanders, and John G. Pricherd. "Seram Tumor Markers",2003, available at <http://www.aafp.prg/afp>
- [10] Iran.Minh C, and El Yamani H, (1988) enzyme sensors for determination of toxic chemicals in environmental samples, in electrochemical detection techniques in the applies biosciences (ed. GA. Junter) , Vol.2, Ellis Horwood, 131-141
- [11] Paul R, Mathewson, Jonh W. Finley, (1991). "Biosensor Design and Application" Atlanta : American Chemical Society.1988, 189-190
- [12] "Potentiometric" (online) Available :
<http://www.mulinet6.li.mahidol.ac.th>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [13] “Prostate specific antigen” (online) Available :
[http://www.nci.nih.gov/cancertopics/factsheet/Detection/PSA -
 58kduateestingcentre.com/PSA-Kit.htm](http://www.nci.nih.gov/cancertopics/factsheet/Detection/PSA-58kduateestingcentre.com/PSA-Kit.htm)
- [14] Ricci, F. and Palleschi, G. “Sensor and biosensor preparation, optimization and application of Prussian Blue modified electrodes” *Biosensor and Bioelectronics*, Vo. 21, 2005. 25-150
- [15] Thailabonline healthsite. (Online) Available : <http://www.thailabonline.com/tomor.htm>.
- [16] Skoog, D.A. , West, D.M. and Holler, F.J. “Analytical Chemistry: An Introduction” 6 th ed. Saunder College Publishing, U.S.A. 1992, 50-150
- [17] Skaog, D.A., West D.M. and Holler, F.J. “Fundamentals of Analytical Chemistry” 7 th ed. Saunder College Publishing, U.S.A. 1996. 120-150
- [18] Vassors, B.H. and Ewing, G.W. “Electroanalytical Chemistry” John Wiley and Sons, Inc. 1983. 102-140
- [19] Wilson, M.S., 2005. *Anal. Chem.* 77, 1496–1502.
- [20] Wilson, M.S., Nie, W.Y., 2006a. *Anal. Chem.* 78, 2507–2513.
- [21] Wilson, M.S., Nie, W.Y., 2006b. *Anal. Chem.* 78, 6476–6483.
- [22] Yao, H., Halsall, H.B., Heineman, W.R., Jenkins, S.H., 1995. *Clin. Chem.* 41, 591–598.
- [23] Y. Itoh, K. Ichihara, *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 (2001) 1154.
- [24] V. Lopez-Avila, H.H. Hill, *Anal. Chem.* 69 (1997) 289.
- [25] Yu, H., Yan, F., Dai, Z., Ju, H.X., 2004. *Anal. Biochem.* 331, 98–105.

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมี

ก.1 การเตรียมสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 500 mL

ปีเปตกรดฟอสฟอริก (87% w/w ความหนาแน่น 1.695 g/ml) 33 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 mL ที่มีน้ำปราศจากไอออนอยู่ประมาณ 200 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตรสารละลายเป็น 500 mL เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M pH 5.0 ถึง pH 8.0

เทสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 M ที่เตรียมไว้แล้วใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 mL ปริมาตร 70-80 mL นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ใช้สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 1 M ปรับค่า pH ตามที่ต้องการ

ก.3 การเตรียมสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.3 % w/t ปริมาตร 25 mL

ปีเปตกลูตาไรลดีไฮด์ (50% w/w ความหนาแน่น 1.602 g/ml) 0.15 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 25 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตรสารละลายเป็น 25 mL เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชา

ก.4 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอไรต์ (III) ความเข้มข้น 0.005 ปริมาตร 25 mL

ชั่งโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอไรต์ (III) (น้ำหนักโมเลกุล 329.26) 41.1575 mg ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน เทใส่ขวดวัดปริมาตร 25 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตรสารละลายเป็น 25 mL

ก.5 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอไรต์ (II) ความเข้มข้น 0.005 ปริมาตร 25 mL

ชั่งโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอไรต์ (II) (น้ำหนักโมเลกุล 368.36) 46.0450 mg ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน เทใส่ขวดวัดปริมาตร 25 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตรสารละลายเป็น 25 mL

ก.6 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (II)(III) ความเข้มข้น 0.005 ปริมาตร 50 mL

ปีเปตสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (II) และ (III) ตามข้อ ก.5 และ ก.6 ตามลำดับ อย่างละ 25 mL ผสมให้เข้ากันในขวดวัดปริมาตร แล้วเก็บหอกระดาศพรอยที่ขวดวัดปริมาตร หรือเก็บไว้ในขวดสีชา

ก.7 การเตรียมสารละลายกรดไนตริก ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 100 mL

ชั่งกรดไนตริก (น้ำหนักโมเลกุล 63.01) 15.5490 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนเทใส่ขวดวัดปริมาตร 100 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตรสารละลายเป็น 100 mL

ก.8 การเตรียมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 25 mL

ปีเปตกรดอะซิติกเข้มข้น (99.8% w/w ความหนาแน่น 1.05 g/ml) 1.4326 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 25 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตรสารละลายเป็น 25 mL

ก.9 การเตรียมสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมปริมาตร 50 mL pH 6.5

ปีเปตสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (II)(III) จากภาคผนวก ก.7 ปริมาตร 25 mL และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M pH 8 ในบีกเกอร์ขนาด 100 mL นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ใช้สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 1 M จนมีค่า pH 6.5

ก.10 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน AFP ปริมาตร 20 μ l

ปีเปตสารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 6.1, 30.5, 48.9, 91.7 และ 116.1 ng/mL ปริมาตร 10 μ l ปีเปตสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมลงในหลอดเก็บตัวอย่าง จากภาคผนวก ก.7 ปริมาตร 10 μ l เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ก.11 การเตรียมสารละลายตัวอย่างซีรัมในการวิเคราะห์หาค่า AFP

ปีเปตซีรัมตัวอย่าง 10 μ l และ สารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม pH 7 ปริมาตร 10 μ l ผสมกันในหลอดเก็บตัวอย่างแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

ภาคผนวก ข.

ผลการทดลอง

ข.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ AFP

ข.1.1 ค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัด AFP

ตารางที่ ข.1 ค่า pH ต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสม กับค่าความต่าศักย์ ที่ได้จากการตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71ng/mL โดยใช้ สกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ที่ปรับปรุงแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตรี

pH	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	
	Potentiometric responses	Mean
5.0	-0.1	-0.10±0.2646
	-0.0	
	-0.2	
5.5	-1.3	-1.26±0.2003
	-1.5	
	-1.2	
	-6.0	
6.0	-6.0	-6.00±0.1000
	-6.1	
	-5.9	
6.5	-60.4	-60.43±0.22.6
	-60.7	
	-60.2	
	-23.9	
7.0	-24.0	-24.00±0.1000
	-24.1	
	-9.9	
7.5	-9.9	-10.03±0.2845
	-10.2	
	-10.0	
8.0	-7.6	-7.63±0.0550
	-7.6	
	-7.7	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ตารางที่ ข.2 ค่าอุณหภูมิ ต่าง ๆ กับค่าความต่างศักย์ ที่ได้จากการ ตรวจวัดสารละลาย AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมโดย ใช้สกรีน-ปรินท์ อิเล็กโทรด ที่ ปรับปรุงแล้ว ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี

Temp (°C)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	
	Potentiometric responses	Mean
0	-61.4	-61.33±0.1154
	-61.2	
	-61.4	
20	-62.7	-62.67±0.1221
	-62.8	
	-62.5	
25	-65.9	-65.83±0.3055
	-65.5	
	-66.1	
30	-67.4	-67.47±0.1337
	-67.6	
	-67.4	
35	-55.8	-55.80±0.1414
	-55.9	
	-55.7	
40	-52.1	-52.23±0.1155
	-52.3	
	-52.3	
45	-45.0	-45.10±0.1000
	-45.2	
	-45.1	
50	-38.9	-38.90±0.1414
	-39.0	
	-38.8	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1.3 อัตราเร็วที่เหมาะสมในการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า

ตารางที่ ข.3 แสดงค่าศักย์ไฟฟ้า(mV)ในการวัด AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมโดยใช้แผ่นสกิน - ปริ้นท์อิเล็กโทรดที่ ปรับปรุง แล้วที่ เวลาต่างๆ

SPCE	Potential (mV)									
	Time (±min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-1.31.5	-129.0	-91.0	-87.1	-60.3	-61.5	-60.1	-64.7	-69.9	-71.2
2	-215.6	-132.4	-105.6	-63.7	-61.0	-60.8	-61.1	-64.5	-68.1	-78.1
3	-148.7	-142.1	-132.9	-70.5	-60.6	-60.2	-61.9	-63.1	-65.8	-81.9
4	-209.9	-195.4	-137.4	-76.3	-60.1	-60.9	-63.1	-70.9	-73.8	-76.5
5	-132.5	-130.0	-122.1	-68.4	-59.8	-61.4	-64.2	-65.6	-66.0	-70.9

*** ที่ AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมได้ค่า Potentail เท่ากับ

-60.43 ± 0.2506 mV



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

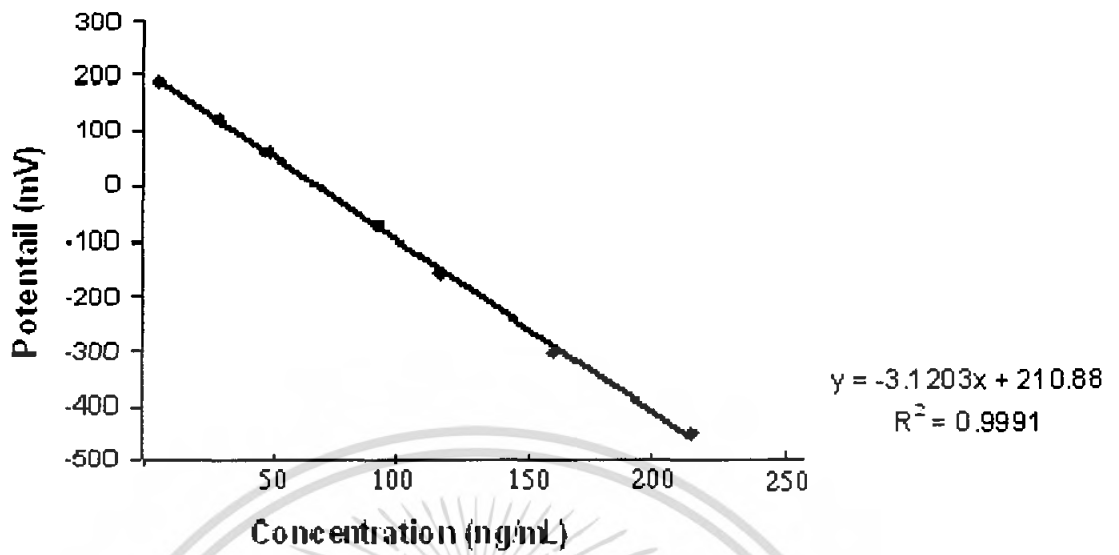
ข.2 การศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วย anti-AFP

ข.2.1 การศึกษาสภาพไวของขั้ว

ตารางที่ ข.4 การหาการศึกษาสภาพความไวของขั้ว เพื่อหาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น โดยการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า กับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 0 – 214.4 ng/mL

Concentration (ng/mL)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	
	Potentiometric responses	Mean
6.1	191.1	191.13±0.1528
	191.3	
	191.0	
30.5	120.5	120.20±0.2646
	120.1	
	120.0	
48.9	60.5	60.43±0.0221
	60.4	
	60.4	
91.1	-71.5	-71.67±0.1528
	-71.7	
	-71.8	
116.1	-160.1	-160.17±0.0946
	-160.3	
	-160.1	
160.8	-300.9	-300.93±0.0579
	-300.9	
	-301.0	
214.4	-450.3	-450.33±0.1528
	-450.5	
	-450.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ค่า ศักย์ไฟฟ้า กับค่าความเข้มข้นของ AFP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2.2 การศึกษาความเที่ยง

Percent of Relative Standard Deviation

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

ตารางที่ ข.5 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ย และ %RSD (Percent of Relative-Standard Deviation) จากการวัด AFP เข้มข้น 85.71 ng/mL ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ผสมโดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยglutaraldehydeด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตรี

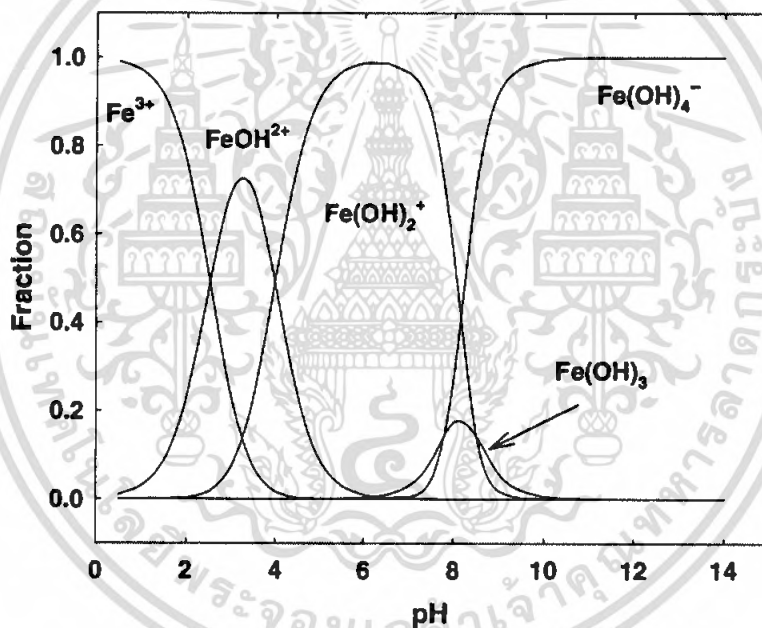
ครั้งที่ (n)	ค่าศักย์ไฟฟ้า (mV) (Xi)	(Xi - \bar{X})	(Xi - \bar{X}) ²
1	-60.1	0.91	0.8281
2	-62.1	-0.09	1.1881
3	-62.2	-1.19	1.4161
4	-60.3	0.71	0.5041
5	-61.9	-0.89	0.7921
6	-61.3	-0.29	0.0841
7	-60.9	0.11	0.0121
8	-62.8	-1.79	3.2041
9	-63.1	-2.09	4.3681
10	-59.1	2.01	4.0401
11	-59.9	1.11	1.2321
12	-63.1	-2.09	4.3681
13	-62.0	-0.99	0.9801
14	-59.1	1.91	3.6481
15	-59.8	1.21	1.4641
16	-60.1	0.91	0.8281
17	-62.7	-1.69	2.8561
18	-58.2	2.81	7.8961
19	-59.7	1.31	1.7161
20	-61.9	-0.89	0.7921
	$\bar{X} = -61.01$		$\Sigma(Xi - \bar{X})^2 = 42.218$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ**Percent of Relative Standard Deviation**

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

1. SD = -1.490637
2. \bar{X} = -61.01
3. %RSD = $(SD./\bar{X}) \times 100$
 $= (-1.491/-61.01) \times 100$
 $= 2.46$



รูปที่ ข.2 The speciation of Fe(III) in 0.7 m NaCl at 25 °C

Millero *Geochemical Transactions* 2001 2:57 doi:10.1186/1467-4866-2-57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2.3 อายุการใช้งานของขั้ว

ตารางที่ ข.6 The lifetime of the immunosensor to 85.71 ng/mL AFP

Time (days)	ศักย์ไฟฟ้า(mV)	
	Potentiometric responses	Mean
1	-60.1	-60.13±0.0580
	-60.2	
	-60.1	
2	-43.3	-43.37±0.3055
	-43.7	
	-43.1	
3	-21.7	-21.53±0.1528
	-21.4	
	-21.5	
4	-12.5	-12.37±0.1528
	-12.2	
	-12.4	
5	-8.9	-8.8±0.1000
	-8.7	
	-8.8	
6	-5.1	-5.03±0.0580
	-5.0	
	-5.0	
7	-0.8	-0.73±0.0820
	-0.7	
	-0.7	
8	-1.0	-0.03±0.0580
	0.0	
	0.0	
9	0.0	0.00±0.0000
	0.0	
	0.0	
10	0.0	0.00±0.0000
	0.0	
	0.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

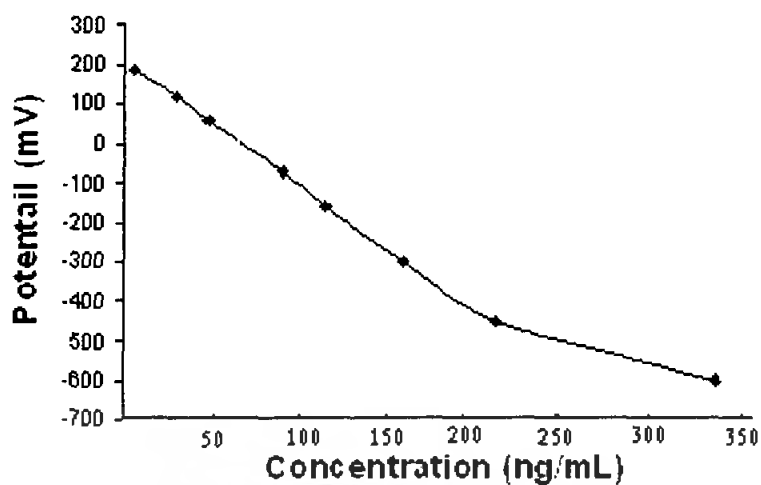
การคำนวณขีดจำกัดในการวิเคราะห์

การหาความชันของการตอบสนองเชิงเส้น โดยการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า กับสารละลายมาตรฐาน AFP เข้มข้น 6.1 – 339.53 ng/mL แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น นำความสัมพันธ์ดังกล่าวไปคำนวณขีดจำกัดในการวิเคราะห์ โดยการพลอตแบบแกรน (Gran's plot)

ตารางที่ ก.1 แสดงค่า ศักย์ไฟฟ้า ของสารละลายมาตรฐาน AFP ที่ความเข้มข้น 6.1 – 353.5ng/mL

Concentration (ng/mL)	ศักย์ไฟฟ้า(mV)	
		Potentiometric responses
		Mean
6.1	191.1	191.13±0.1528
	191.3	
	191.	
30.5	120.5	120.20±0.2646
	120.1	
	120.0	
48.9	60.5	60.43±0.0221
	60.4	
	60.4	
91.1	-71.5	-71.67±0.1528
	-71.7	
	-71.8	
116.1	-16.1	-160.17±0.0946
	-160.3	
	-160.1	
160.8	-300.9	-300.93±0.0579
	-300.9	
	-301.0	
214.4	-450.3	-450.33±0.1528
	-450.5	
	-450.2	
335.3	-600.5	-600.00±0.2082
	-600.8	
	-600.4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



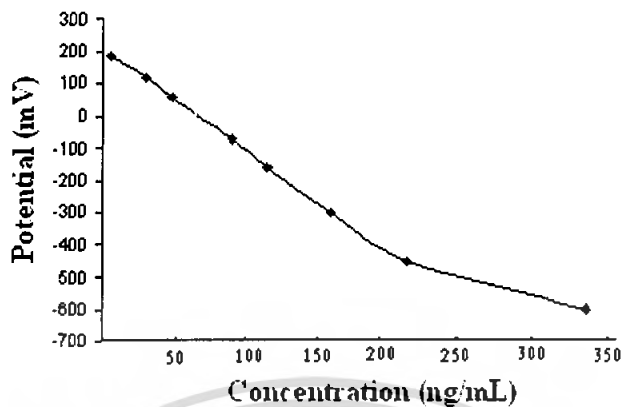
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานแสดงค่า ของสารละลาย AFP ที่ความเข้มข้น 6.1 – 353.5 ng/mL



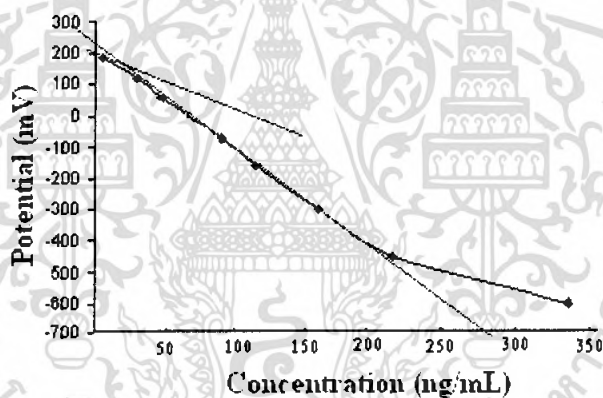
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gran's plot

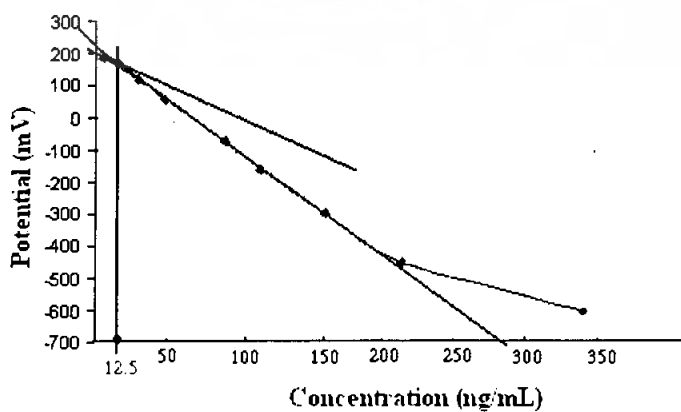
ขั้นที่ 1



ขั้นที่ 2



ขั้นที่ 3



รูปที่ ค.2 แสดงขั้นตอนการหาขีดจำกัดในการวิเคราะห์ โดยการพลอตแบบแกรน (Gran's plot)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้ได้เห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่างซีรัม

การวิเคราะห์หาปริมาณ AFP ในตัวอย่าง ด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์

ตารางที่ ง.1 แสดงค่า ศักย์ไฟฟ้า ของสารละลายมาตรฐาน AFP ที่ความเข้มข้นต่างๆ

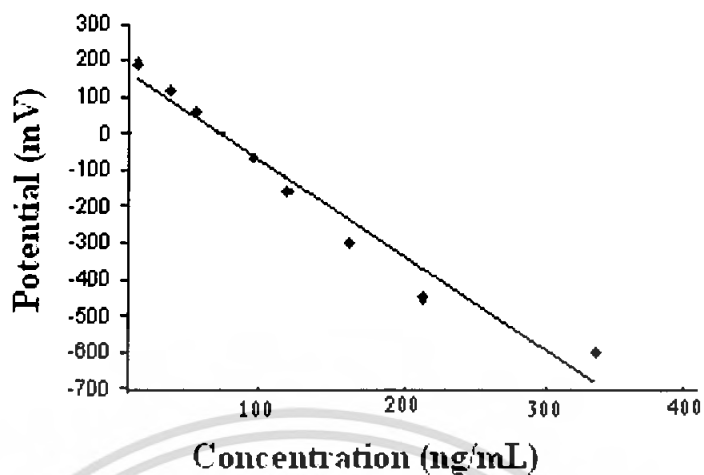
Concentration (ng/mL)	ศักย์ไฟฟ้า(mV)	
	Potentiometric responses	Mean
61.	191.1	191.13±0.1528
	191.3	
	191.	
30.5	120.5	120.20±0.2646
	120.1	
	120.0	
	120.0	
48.9	60.5	60.43±0.0221
	60.4	
	60.4	
	60.4	
91.1	-71.5	-71.67±0.1528
	-71.7	
	-71.8	
	-71.8	
116.1	-16.1	-160.17±0.0946
	-160.3	
	-160.1	
	-160.1	
160.8	-300.9	-300.93±0.0579
	-300.9	
	-301.0	
	-301.0	
214.4	-450.3	-450.33±0.1528
	-450.5	
	-450.2	
	-450.2	
335.3	-600.5	-600.00±0.2082
	-600.8	
	-600.8	
	-600.4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 แสดงค่าการวัดตัวอย่างซีรัม AFP

Sample	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	Contentation (ng/mL)	Mean
1.	162.0	15.67	15.60±0.0863
	162.5	15.50	
	162.3	15.60	
2.	10.95	32.50	32.54±0.0529
	109.4	32.52	
	109.2	32.60	
3.	60.1	48.32	48.32±0.0300
	60.2	48.29	
	60.0	48.35	
4.	-136.3	111.26	111.22±0.0505
	-136.0	111.17	
	-136.2	111.23	
5.	-416.3	201.00	200.92±0.0682
	-416.0	200.90	
	-415.9	200.87	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 Calibration curve of the potentiometric immunosensor obtained using AFP standard solution.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.3 The determination result of AFP by SPCE immunosensor and ECLIA method

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

สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า ศักย์ไฟฟ้า (mV) กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน AFP ด้วยขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย glutaraldehyde โดยเทคนิคโพเทนชิอเมทรี เป็นเส้นตรงในช่วง 6.1 - 214.4 ng/mL โดยมีสมการความสัมพันธ์

$$y = -3.1203 x + 210.88$$

แทนค่า y = ค่า ศักย์ไฟฟ้า (mV) ที่วัดได้จากตัวอย่าง

*** เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (%Agreement)**

- ค่าความถูกต้อง (Accuracy) หมายถึง ความใกล้เคียงระหว่างค่าที่ยอมรับได้กับค่าที่อ่านได้จากเครื่องวัด เขียนเป็นสมการดังนี้

$$A = 1 - \frac{X_n - Y_n}{X_n}$$

และ เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (Accuracy) = A X 100 %

โดยที่ Y_n = The determination result of AFP by SPCE immunosensor

X_n = The determination result of AFP by ECLIA method

ตารางที่ ๓.4 การหา t-test โดยใช้สถิติทดสอบ Pair t-test

Sample	By SPCE immunosensor (ng/mL)	By ECLIA (ng/mL)	D_i	$(D_i - \bar{D})$	$(D_i - \bar{D})^2$
1.	15.60	15.00	0.06	-0.832	0.6922
2.	32.54	32.50	0.04	-0.852	0.7259
3.	48.32	48.30	0.02	-0.872	0.7604
4.	111.22	107.80	3.42	2.528	6.3908
5.	200.92	200.00	0.62	0.028	0.0008
				$\bar{D} = 0.8920$	$\sum (D_i - \bar{D})^2 = 8.5701$

สถิติทดสอบ Pair t-test

1. $t = \bar{D}/SD$

2. $SD = 1.4627$

3. $t = 0.8920 / 1.4637$
 $= 0.6094$

ตารางที่ ๓.5 ตาราง t-test สำหรับสถิติทดสอบ

df	95%	99%
1	12.71	63.66
2	4.30	9.93
3	3.18	5.84
4	2.78	4.60
5	2.52	4.03
10	2.23	3.17
15	2.13	2.95
20	2.03	2.85
30	2.04	2.75
120	1.98	2.62
α	1.96	2.58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้