การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน และการประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตเมทรี

SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES AND ITS APPLICATION TO DETERMINATION OF CYSTEINE BY UV-VUSIBLE SPECTROPHOTOMETRY

กนกภรณ์ ไชยคำภา

ชฎาพร โตศิริ

กรวิชญ์ ตรังค์วชิราชัย

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2557

การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน และการประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตเมทรี

SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES AND ITS APPLICATION TO DETERMINATION OF CYSTEINE BY UV-VUSIBLE SPECTROPHOTOMETRY

กนกภรณ์ ไชยคำภา

ชฎาพร โตศิริ

กรวิชญ์ ตรังค์วชิราชัย

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน และการประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตเมทรี Synthesis of Gold Nanoparticles and Its Appication to Determination of Cysteine by UV-visible Spectrophotometry
ชื่อนักศึกษา	กนกภรณ์ ไชยคำภา รหัสนักศึกษา 54050115 ชฎาพร โตศิริ รหัสนักศึกษา 54050154 กรวิชญ์ ตรังค์วชิราชัย รหัสนักศึกษา 54051039
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2557
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี สาขาเคมีอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.เสาวภาคย์ ธีราทรง ประธานกรรมการ	
ดร.เอกรัฐ เดชศรี กรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน และการประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตเมทรี		
ชื่อนักศึกษา	นางสาว กนกภรณ์	ไชยคำภา	รหัสนักศึกษา 54050115
	นางสาว ชฎาพร	โตศิริ	รหัสนักศึกษา 54050154
	นาย กรวิชญ์	ตรังค์วชิราชัย	รหัสนักศึกษา 54051039
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2557		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น		

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ศึกษาการหาปริมาณซีสเทอีนด้วยหลักการสเปคโทรโฟโตเมทรี หลักการตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาระหว่างซีสเทอีนกับอนุภาคทองระดับนาโน ขั้นตอนการทดลองเริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนด้วยวิธีเทอร์คีวิช ผลการทดลองพบว่า สารละลายอนุภาคทองระดับนาโนที่สังเคราะห์ได้มีสีแดงไวน์และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 527 นาโนเมตร เมื่อเติมซีส-เทอีนลงไปในสารละลายอนุภาคทองระดับนาโน สารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีแดงไวน์ไปเป็นสีม่วงมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานพล็อตระหว่างอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีน อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1 – 500 ไมโครโมลาร์ ($y = 0.0016x + 0.1788$) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9844 มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 6.49 ได้ประยุกต์วิธีนี้เพื่อหาปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่างเม็ดยา พบว่าค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 71 ถึง 113 จึงกล่าวได้ว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูงและความแม่นอยู่ในระดับที่ยอมรับได้

คำสำคัญ : อนุภาคทองระดับนาโน, ซีสเทอีน, การวิเคราะห์หาปริมาณ, สเปคโทรโฟโตเมทรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Synthesis of gold nanoparticles and its application to determination of cysteine by UV-Visible spectrophotometry		
Student	Miss Kanokporn	Chaikhampha	Student ID 54050115
	Miss Chadaporn	Tosiri	Student ID 54050154
	Mr. Korawich	Trangwachirachai	Student ID 54051039
Degree	Bachelor of Science (Industrial Chemistry)		
Department	Chemistry		
Academic Year	2014		
Advisor	Dr. Nathawut Choengchan		

Abstract

In this work, the method for spectrophotometric determination of cysteine was studied. The method is based on a colorimetric reaction between cysteine and gold nanoparticles (AuNPs). The AuNPs was synthesized accordingly to Turkevich method. The maximum absorption peak of the AuNPs solution was observed at 527 nm. In the presence of cysteine, the color of the AuNPs solution was changed from red-wine to purple. Another maximum absorption peak was found at 650 nm. This was because of aggregation of the AuNPs by cysteine. Increasing in the cysteine concentration resulted in increasing in degree of aggregation. Calibration was plotted of absorbance ratio ($A_{650/527}$) against the concentration of standard cysteine. Working range was observed from 1 to 500 μM ($y = 0.0016x + 0.1788$) with good linearity ($R^2 = 0.9844$). The RSD of 6.49 % was achieved. The method was applied to cysteine-supplemented tablet. Recovery was found from 71 to 113 %. This implied that the method gave high precision and acceptable accuracy.

Keywords : Gold nanoparticles, Cysteine, Determination, Spectrophotometry

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษ เรื่อง การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนและการประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนสำเร็จไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากหลายฝ่ายที่เกี่ยวข้อง ทางคณะผู้จัดทำโครงงานพิเศษ ขอขอบพระคุณ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ทั้งเอกสารประกอบการดำเนินงานโครงงานพิเศษ ชี้แจงขั้นตอนให้ความรู้ ตลอดจนปรับปรุง ตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ดร.เสาวภาคย์ ธีราทรง และ ดร.เอกรัฐ เดชศรี เป็นอย่างสูง ที่สละเวลาเป็นคณะกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะ เพื่อให้โครงงานพิเศษนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณอาจณรงค์ เมธาวีสรรเสริญ และคุณอรฉัตร เลิศอิทธิพร รวมถึงนักศึกษาระดับปริญญาโทและเอกทุกท่านในหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ที่คอยให้คำปรึกษา ให้ความรู้ข้อมูลต่างๆ ติดตามความก้าวหน้าของโครงงานพิเศษมาตลอด จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ ที่ให้ความสะดวก เอื้อเฟื้อสถานที่และสาธารณูปโภค รวมถึงเครื่องมือ และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ ต่อการทำโครงงานพิเศษเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำโครงงานพิเศษ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่สนับสนุน ให้กำลังใจในการศึกษาตลอดมา รวมถึงทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้องจนทำให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

นางสาว กนกภรณ์ ไชยคำภา

นางสาว ชฎาพร โตศิริ

นาย กรวิชญ์ ตรังค์วชิราชัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 วิธีการดำเนินงาน 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ซีสเทอีน 3

2.1.1 ข้อมูลทั่วไป 3

2.1.2 คุณลักษณะ 3

2.1.3 แหล่งที่พบ 4

2.1.4 ประโยชน์ 4

2.2 อนุภาคทองระดับนาโน 5

2.2.1 อนุภาคระดับนาโน 5

2.2.2 สมบัติทางแสง 5

2.2.3 อนุภาคทองระดับนาโน 6

2.2.4 การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน 7

2.2.5 การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคทองระดับนาโน 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.6 การประยุกต์ใช้อนุภาคทองระดับนาโนสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี 9
2.3 ยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ 11
2.4 หลักการตรวจวัดที่ใช้ 17
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 23
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ 23
3.1.1 สารเคมี 23
3.1.2 อุปกรณ์ 24
3.2 การเตรียมสารละลาย 25
3.2.1 การเตรียมสารละลายกรดเตตระคลอโรออริคเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 25
3.2.2 การเตรียมสารละลายไตรโซเดียมซิเตรตเข้มข้น 38.8 มิลลิโมลาร์ 25
3.2.3 การเตรียมสารละลายอนุภาคทองระดับนาโน 25
3.2.4 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ 25
3.2.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีสเทอีน 26
3.2.6 การเตรียมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4 26
3.2.7 การเตรียมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5 26
3.2.8 การเตรียมสารละลายตัวอย่างซีสเทอีนจากเม็ดยา 26
3.2.9 วิธีเตรียม spiked sample 27
3.3 วิธีการทดลอง 27
3.3.1 การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองระดับนาโน 27
3.3.2 การตรวจวัดซีสเทอีนด้วยอนุภาคทองระดับนาโน 27
3.3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง 28
3.3.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม
ในการตรวจวัดซีสเทอีน 28
3.3.3.2 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.3.3 การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการตรวจวัดซีสเทอีน 29

3.3.4 การตรวจวัดซีสเทอีนในตัวอย่างอาหารเสริมเม็ดยา 29

3.3.5 การหาค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ 29

3.3.6 การหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุด
ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 30

3.3.7 การหาความเที่ยง 30

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 31

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน 31

4.2 ศึกษากลไกการตรวจวัดซีสเทอีนด้วยอนุภาคทองระดับนาโน 32

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง 33

4.3.1 ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการตรวจวัดซีสเทอีน 33

4.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม
ในการตรวจวัดซีสเทอีน 34

4.3.3 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการตรวจวัด 37

4.4 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีน 39

4.5 การนำวิธีวิเคราะห์มาประยุกต์ใช้ 40

4.5.1 การหาปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่างเม็ดยา 40

4.5.2 ศึกษาค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ 42

4.5.3 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุด
ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 42

4.5.4 การหาความเที่ยงของวิธี 43

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 44

5.1 สรุปผลการวิจัย 44

5.2 ข้อเสนอแนะ 45

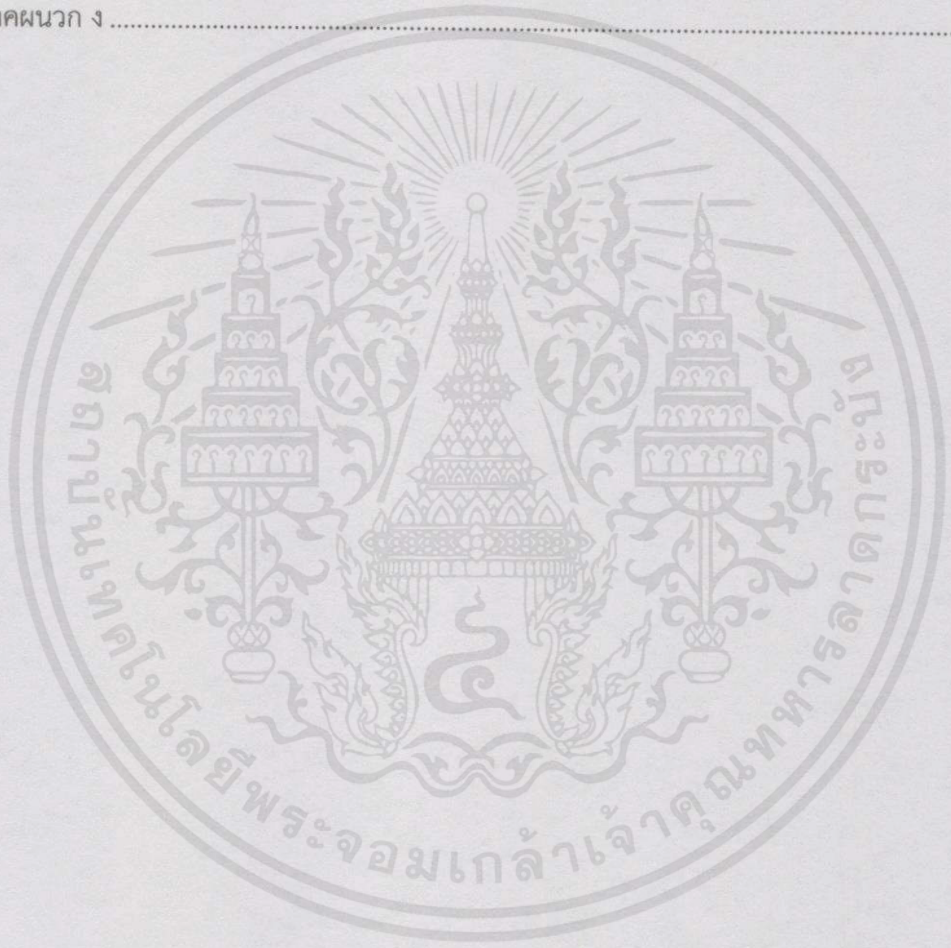
เอกสารอ้างอิง 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก 49
ภาคผนวก ก 50
ภาคผนวก ข 51
ภาคผนวก ค 52
ภาคผนวก ง 53



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ตารางแสดงปริมาณซีสเทอีนในอาหารชนิดต่างๆ 4

2.2 ตารางสรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีน โดยใช้อนุภาคทองนาโน 22

4.1 ตารางสรุปปัจจัยที่ศึกษาและสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง..... 38

4.2 ตารางแสดงอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง ความเข้มข้นของซีสเทอีน
และปริมาณซีสเทอีนในสารตัวอย่างโน 41

4.3 ตารางแสดงค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับของสารละลายตัวอย่างเม็ดยา..... 42

4.4 ตารางแสดงค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 42

4.5 ตารางแสดงค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของซีสเทอีนความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์
และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างของซีสเทอีน 3

2.2 กระบวนการสั่นของพลาสมอน (plasmon oscillation) สำหรับอนุภาคทรงกลม 6

2.3 การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนโดยวิธี Top-down และ Bottom-up 7

2.4 อนุภาคทองระดับนาโนที่มีขนาดอนุภาคต่างกัน 8

2.5 TEM image of gold colloid 9

2.6 UV-Visible spectrum 12

2.7 หลอดดิวทีเรียม และหลอดทังสเตน 12

2.8 เกรตติงใช้แยกความยาวคลื่นที่ต้องการ 13

2.9 ตัวอย่าง Cuvette แบบต่างๆ 13

2.10 ลักษณะหลอด PMT ในสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ 14

2.11 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ 15

2.12 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว 16

2.13 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ 16

2.14 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ 17

2.15 แสดงการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโนกับซีสเทอีน 18

4.1 แสดงสเปคตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองระดับนาโน
และแสดงรูปถ่ายสารละลายอนุภาคทองระดับนาโน 31

4.2 แสดงการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโนกับซีสเทอีน 32

4.3 แสดงสเปคตรัมการดูดกลืนแสงของแบลงค์และซีสเทอีนความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์
และแสดงรูปถ่ายสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนที่สังเคราะห์ได้มีสีแดงและเมื่อเติมซีสเทอีน
ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์จะมีสีม่วง 33

4.4 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงที่สารละลายอนุภาคทองระดับนาโนพีเอชต่างๆ 34

4.5 แสดงการรวมตัวกันเองของอนุภาคทองระดับนาโนที่พีเอชต่างๆ 34

4.6 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อขนาดของอนุภาคทองระดับนาโน 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.7 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตรวจวัดซีสเทอีน ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ 35

4.8 แสดงการเกิดแรงดึงดูดระหว่างไอออนลบของซิเตรทกับไอออนบวกของโซเดียม 36

4.9 แสดงผลต่างของความเข้ม LSPR ที่เวลาต่างๆ 37

4.10 แสดงอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของซีสเทอีนความเข้มข้น 1, 200 และ 500 ไมโครโมลาร์ ณ เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 2 – 20 นาที 38

4.11 แสดงสเปคตรัมการดูดกลืนแสงของซีสเทอีนความเข้มข้นต่างๆ 39

4.12 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีน 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

AuNPs (Gold nanoparticle)	อนุภาคทองระดับนาโน
Cys	ซีสเทอีน
HSAB	ทฤษฎี Hard-Soft Acid-Base
LSPR	Localized surface plasmon resonance
kV	กิโลโวลท์
R^2	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Relative coefficient)
mL	มิลลิลิตร
µL	ไมโครลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
µM	ไมโครโมลาร์
nm	นาโนเมตร
cm^3	ลูกบาศก์เซนติเมตร
g	กรัม
M	โมลาร์
hr	ชั่วโมง
LOD	ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด
LOQ	ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
RSD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ซีสเทอีนหรือแอล-ซีสเทอีน เป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็นชนิดหนึ่งในร่างกายที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ร่างกายสามารถสังเคราะห์ได้เองจากการรับประทานอาหารประเภทที่มีโปรตีนสูง เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ นม ชีส เป็นต้น ประโยชน์ที่สำคัญของซีสเทอีนคือ ช่วยป้องกันผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยยาคีโมและการฉายรังสี ช่วยเสริมความแข็งแรงของโครงสร้างโปรตีนเคราติน (Keratin) ที่ใช้ในการสร้างผิว ผม เล็บ ช่วยให้รากผมแข็งแรงไม่หลุดร่วงง่าย ช่วยกำจัดสารพิษโดยการสร้างพันธะกับไกลซีนและกรดกลูตามิก เกิดเป็นกลูตาไธโอนที่ช่วยกำจัดพิษออกจากร่างกายโดยเปลี่ยนสารพิษชนิดที่ไม่ละลายน้ำเช่น โลหะหนัก สารระเหย ยาฆ่าแมลง ให้เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นและง่ายต่อการกำจัดออกจากร่างกาย ช่วยป้องกันไม่ให้ตับถูกทำลายโดยแอลกอฮอล์และสารพิษจากบุหรี่ ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทซิเนส (Tysinase) ไม่ให้เปลี่ยนเป็นโดปาควิโนน (Dopaquinone) ซึ่งมีผลทำให้ร่างกายสร้างเม็ดสีน้อยลงจึงทำให้ผิวขาวขึ้น [1-3] ในปัจจุบันได้มีการเติมซีสเทอีนลงในอาหารเสริมในรูปแบบของแคปซูลและเครื่องดื่ม จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนในอาหารเสริมและเครื่องดื่มเหล่านี้เพื่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้ตรงตามที่ระบุไว้ในฉลาก

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนส่วนใหญ่ใช้หลักการทางสเปคโทรโฟโตเมทรี เช่น ใช้อนุภาคเงินระดับนาโนเป็นรีเอเจนต์แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายที่เกิดจากการรวมตัวกัน (Aggregation) กับซีสเทอีน แต่อนุภาคเงินระดับนาโนจะใช้เวลานานในการเปลี่ยนสี [4] จึงมีการพัฒนาโดยการเปลี่ยนมาใช้อนุภาคทองระดับนาโนเป็นรีเอเจนต์ซึ่งใช้เวลาในการเปลี่ยนสีน้อยกว่า [5,6]

ในงานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีน โดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนในการวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนและติดตามด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตเมทรี เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนโดยใช้วิธีเทอร์คีวิช
2) เพื่อศึกษาวิธีการหาปริมาณซีสเทอีนโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคทองระดับนาโนและซีสเทอีนเป็นหลักการตรวจวัด
3) เพื่อประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างอาหารเสริมซีสเทอีน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เริ่มจากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนและการประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนที่ใช้เทคนิคการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปค-โทรโฟโตมิเตอร์จากนั้นทำการศึกษาหลักการตรวจวัดซึ่งอาศัยปฏิกิริยาระหว่างซีสเทอีนและอนุภาคทองระดับนาโน แล้วทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ จากนั้นสรุปผลการทดลองและนำมาอภิปรายผล

1.4 วิธีการดำเนินงาน

1) ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยของอนุภาคทองระดับนาโน
2) ทำการทดลองโดยแบ่งขั้นตอนดังนี้
   2.1) สังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนโดยใช้วิธีเทอร์คีวิช
   2.2) ศึกษาหลักการตรวจวัดซีสเทอีนโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์
   2.3) ประเมินคุณลักษณะและทดสอบความถูกต้องของวิธี
   2.4) ประยุกต์ใช้กับยาเม็ดซีสเทอีน
   2.5) เผยแพร่ผลงานวิจัย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ทราบถึงวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนโดยใช้วิธีเทอร์คีวิช
2) ได้ทราบถึงวิธีการตรวจวัดซีสเทอีนโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคทองระดับนาโนและซีสเทอีน
3) ได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างยาเม็ดซีสเทอีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

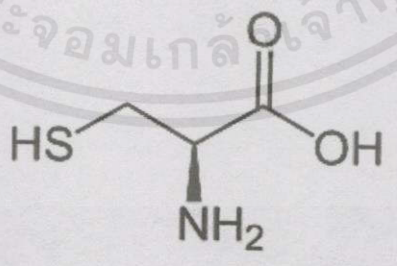
2.1 ซีสเทอีน [7-10]

2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

ซีสเทอีนหรือแอล-ซีสเทอีน (Cysteine / L-Cysteine, Cys) เป็นกรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็นตัวหนึ่งในร่างกายที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบซึ่งร่างกายสามารถสังเคราะห์เองได้ เป็นสารตั้งต้นในการสร้างกลูตาไธโอนโดยการเกิดปฏิกิริยากับไกลซีน (Glycine, Gly) และกรดกลูตามิก (Glutamic Acid, Glu) ซีสเทอีนเป็นสารอาหารสำคัญสำหรับการชะลอวัย และเมื่อถูกเผาผลาญแล้วจะเกิดเป็นกรดซัลฟูริกซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ช่วยในการขับสารพิษออกจากร่างกาย และยังป้องกันโลหะหนักตกค้างในร่างกายและช่วยกำจัดอนุมูลอิสระ

2.1.2 คุณลักษณะ

ซีสเทอีนมีลักษณะเป็นผงสีขาว สูตรโมเลกุลคือ $HO_2CCH(NH_2)CH_2SH$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 121.16 กรัมต่อโมล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 240°C สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก แอมโมเนีย และน้ำ ซีสเทอีนมีหมู่ฟังก์ชัน 3 หมู่ คือ หมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) หมู่อะมิโน (NH_2) และหมู่ไธออล (SH) จึงมีค่าการแตกตัวของกรด (pKa) 3 ค่า คือ pKa_1 ของหมู่คาร์บอกซิลิก = 1.71 pKa_2 ของหมู่อะมิโน = 10.78 และ pKa_3 ของหมู่ไธออล = 8.33 ตามลำดับ และมีค่า pI = 5.02



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของซีสเทอีน [8]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 แหล่งที่พบ

ซีสเทอีนสามารถพบได้ในอาหารที่มีโปรตีนสูง เช่น เนื้อสัตว์ นม ไข่ ชีส กระเทียม หัวหอม บรอคโคลี พริกแดง เป็นต้น ปริมาณซีสเทอีนที่แนะนำต่อวันเท่ากับ 4.1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผู้บริโภค (กิโลกรัม) อาหารแต่ละชนิดจะมีปริมาณซีสเทอีนไม่เท่ากันดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงปริมาณซีสเทอีนในอาหารชนิดต่างๆ [10]

อาหาร	ปริมาณซีสเทอีน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)
ถั่วเหลือง	638
เนื้อวัว	460
เนื้อไก่	423
เนื้อหมูสันใน	388
ข้าวโอ๊ต	408
เมล็ดดอกทานตะวัน	451
เมล็ดถั่ว	127
ธัญพืช	120
ไข่ต้ม	292

2.1.4 ประโยชน์

ประโยชน์ที่สำคัญของซีสเทอีนคือ ช่วยป้องกันผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยยาคีโมและการฉายรังสี ช่วยเสริมความแข็งแรงของโครงสร้างโปรตีนเคราติน (Keratin) ที่ใช้ในการสร้างผิว ผม เล็บ ช่วยให้รากผมแข็งแรงไม่หลุดร่วงง่าย ช่วยกำจัดสารพิษโดยการสร้างพันธะกับไกลซีนและกรดกลูตามิก เกิดเป็นกลูตาไธโอนที่ช่วยกำจัดพิษออกจากร่างกายโดยเปลี่ยนสารพิษชนิดที่ไม่ละลายน้ำเช่น โลหะหนัก สาระเหย ยาฆ่าแมลง ให้เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นและง่ายต่อการกำจัดออกจากร่างกาย ช่วยป้องกันไม่ให้ตับถูกทำลายโดยแอลกอฮอล์และสารพิษจากบุหรี่ ช่วยยับยั้งการทำงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไทซิเนส (Tysinase) ไม่ให้เปลี่ยนเป็นโดปาควิโนน (Dopaquinone) ซึ่งมีผลทำให้ร่างกายสร้างเม็ดสีน้อยลงจึงทำให้ผิวขาวขึ้น

2.2 อนุภาคทองระดับนาโน (Gold nanoparticles) [12-15]

2.2.1 อนุภาคระดับนาโน (Nanoparticles)

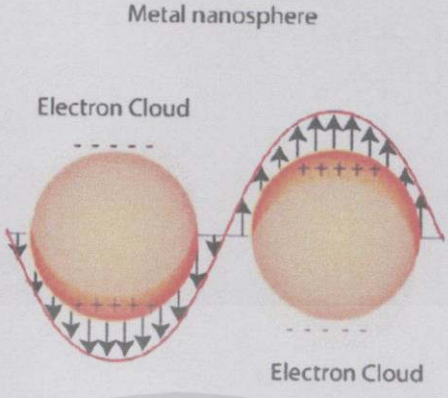
อนุภาคระดับนาโน คืออนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร อนุภาคโลหะระดับนาโนมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีแตกต่างไปจากโลหะขนาดใหญ่ เช่น จุดหลอมเหลวต่ำลง พื้นที่ผิวสัมผัสสูงขึ้น สมบัติทางแสง สมบัติทางแม่เหล็ก เป็นต้น ซึ่งสมบัติต่างๆเหล่านี้เป็นที่น่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย

2.2.2 สมบัติทางแสง

สมบัติทางแสงของอนุภาคทองระดับนาโน จะอธิบายได้ด้วยปรากฏการณ์เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) ซึ่งเป็นคลื่นความหนาแน่นของประจุที่เกิดจากการสั่นของอิเล็กตรอนอิสระ ที่มีลักษณะการสั่นพร้อมเพรียงกัน เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยผิวต่อของโลหะกับสารไดเล็กทริก เช่น ระหว่างทองคำหรือกับอากาศหรือสารละลาย โดยที่ขนาด ยอดคลื่น และความกว้าง ของสเปคตรัมพลาสมอนเรโซแนนต์ของวัสดุต่างๆ จะขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง ประเภทของวัสดุ และสภาพแวดล้อมรอบๆวัสดุนั้น อนุภาคนาโนของทองจะมีสีแดงแทนที่จะเป็นสีเหลืองวาวอย่างที่พบได้ทั่วไป โลหะชนิดอื่นที่นอกเหนือไปจากทองก็สามารถแสดงปรากฏการณ์เชิงแสงในลักษณะเดียวกันนี้ได้เช่นกัน เช่น อนุภาคนาโนของเงินจะมีสีเหลืองเข้มแทนที่จะเป็นสีเงินวาว จะมีความถี่เรโซแนนซ์อยู่ในช่วงใกล้รังสียูวีซึ่งอยู่นอกสเปกตรัมของช่วงแสงที่มองเห็น

เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ หรือสมบัติทางแสงของอนุภาคทองระดับนาโนสามารถเกิดขึ้นเนื่องจากอันตรกิริยาของแสงซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ตัวอย่างเช่น แสงกับอิเล็กตรอนอิสระที่ผิวของอนุภาคนาโนของโลหะ ดังรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 กระบวนการสั่นของพลาสมอน (plasmon oscillation) สำหรับอนุภาคทรงกลม [12]

รูปที่ 2.2 แสดงกระบวนการสั่นของพลาสมอน แสดงให้เห็นการกระจัดของกลุ่มประจุอิเล็กตรอน (conduction electron charge cloud) สัมพัทธ์กับนิวเคลียสเมื่อได้รับแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ดังนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนอิสระจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสั่นพ้อง โดยความถี่ของการสั่นนี้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของอิเล็กตรอน (electron density) มวลสัมพัทธ์อิเล็กตรอน (effective electron mass) ขนาด รูปร่างของการกระจายของประจุ (charge distribution) สำหรับการสั่นของอิเล็กตรอนสำหรับอนุภาคขนาดเล็ก เรียกว่า ไดโพล พลาสมอน เรโซแนนซ์ (dipole plasmon resonance)

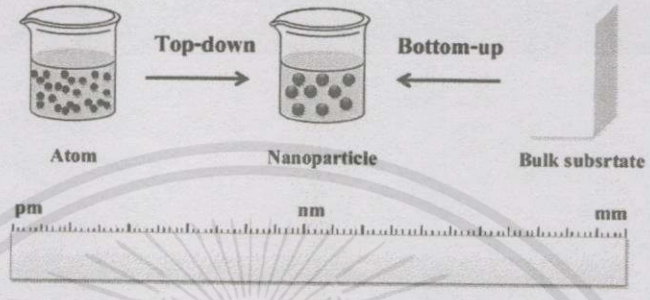
2.2.3 อนุภาคทองระดับนาโน

อนุภาคทองระดับนาโนเป็นอนุภาคทองที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากโลหะทองให้มีขนาดเล็กลงในระดับนาโนเมตร ทำให้อนุภาคทองระดับนาโนมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างไปจากทองปกติ เช่น มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไฟฟ้าได้ดี และมีสีที่เปลี่ยนตามขนาดของอนุภาค จากข้อดีต่างๆของอนุภาคทองระดับนาโนทำให้สามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อวิเคราะห์หาสารที่สนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน

การสังเคราะหอนุภาคทองระดับนาโนมี 2 วิธี คือวิธี Top-down และ Bottom-up (รูปที่ 2.3)

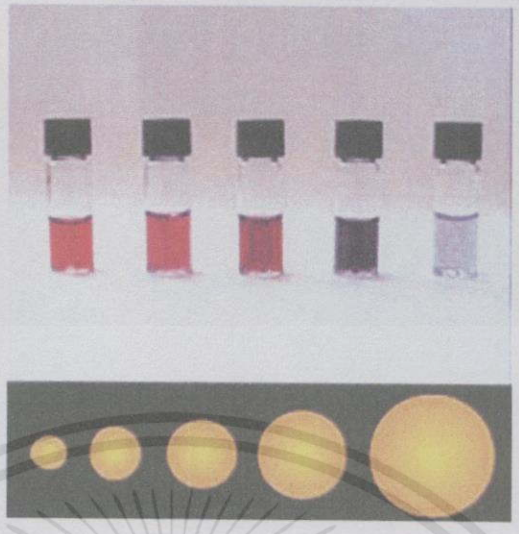


รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนโดยวิธี Top-down และ Bottom-up [13]

วิธี Top-down เป็นการสังเคราะห์จากขนาดใหญ่ให้เป็นขนาดเล็กโดยการตัดแบ่งวัตถุขนาดใหญ่ให้เล็กลงจนถึงระดับนาโนเมตรด้วยแรงภายนอกโดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น LASER ablation หรือ ion irradiation แต่พบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดกัดคือควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคได้ยาก

สำหรับวิธี Bottom-up เป็นการสังเคราะหโดยเริ่มต้นจากการเรียงอะตอมแต่ละอะตอมประกอบขึ้นเป็นอนุภาค จนมีขนาดเป็นระดับนาโนเมตรด้วยวิธีต่างๆทางเคมี เช่น อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารละลาย Tetrachloroauric Acid ($HAuCl_4$; Au^{3+}) โดยใช้สารลดขนาด เช่น Sodium borohydride หรือ Trisodium citrate เพื่อเปลี่ยนไอออนของทอง (Au^{3+}) ให้เป็นอะตอมของทอง (Au^0) จากนั้นอะตอมทองรวมตัวกันหลายๆอะตอมจนกลายเป็นอนุภาคทองที่มีขนาดระดับนาโนเมตรซึ่งมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ ที่มีของแข็งขนาดนาโนเมตรแขวนลอยอยู่ในสารละลาย (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 อนุภาคทองระดับนาโนที่มีขนาดอนุภาคต่างกัน

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Colloidal_gold

ปัจจุบันการสังเคราะหแบบ Bottom-up นิยมใช้ในการสังเคราะหอนุภาคทองระดับนาโนมากกว่าแบบ Top-down เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคได้ง่าย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนในรูปแบบสารละลาย ซึ่งจะมีโครงสร้างเป็นแบบทรงกลม โดยรูปร่างแบบนี้จะมีพื้นที่ผิวน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับรูปร่างแบบ อื่นๆ (เมื่อมีปริมาตรเท่ากัน) โดยใช้วิธีการเตรียมแบบเทอร์คีวิช (Turkevich method) [5] โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชันของกรดเตตระคลอโรออริก ($HAuCl_4$) ด้วยไตรโซเดียมซิเตรตในน้ำ ซึ่งในวิธีการนี้ซิเตรตไอออนจะทำหน้าที่เป็นสารลดขนาดและรักษาเสถียรภาพของทองไว้ อนุภาคที่ได้จะมีขนาดประมาณ 15 นาโนเมตรและมีขนาดใกล้เคียงกันโดยปฏิกิริยาเกิดดังนี้

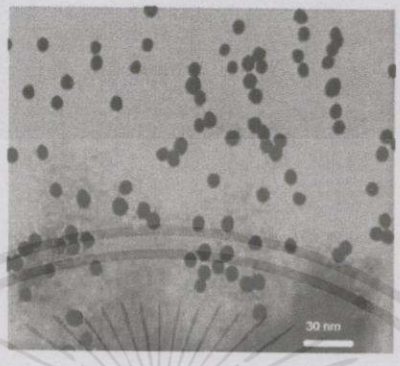
$$6(AuCl_4)^- + C_6H_8O_7 + 5H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 24Cl^- + 6Au^0 + 18H^+$$

2.2.5 การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคทองระดับนาโน

เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดระดับนาโนเมตรไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจึงต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopes) ที่มีกำลังขยายสูง เช่น กล้องจุลทรรศน์แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) รูปที่ 2.5 แสดงอนุภาคทองระดับนาโนขนาดเฉลี่ย 6 นาโนเมตรที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านกำลังขยาย 200 kV



รูปที่ 2.5 TEM image of gold colloid

ที่มา: Wang *et al*

การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคทองระดับนาโนนอกจากจะใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านแล้ว ยังสามารถตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคทองระดับนาโนได้ด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโต-มิเตอร์ ทองคำเมื่ออยู่ในรูปก้อนขนาดใหญ่จะมีสีเหลืองเนื่องมาจากทองคำดูดกลืนแสงสีน้ำเงินทำให้เห็นทองคำเป็นสีเหลือง แต่ถ้าทองถูกทำให้มีขนาดเล็กลงไปเรื่อยๆจนมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่มาตกกระทบมากๆทำให้อนุภาคทองระดับนาโนเปลี่ยนความยาวคลื่นที่ดูดกลืนไปเป็นดูดกลืนแสงสีเขียวที่ความยาวคลื่นประมาณ 500 นาโนเมตร ทำให้เห็นอนุภาคทองระดับนาโนเป็นสีแดง ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงขึ้นกับขนาดของอนุภาคทองระดับนาโน ทั้งนี้เพราะอนุภาคทองระดับนาโนขนาดต่างกันจะให้สีที่ต่างกัน อนุภาคทองระดับนาโนขนาดเล็กจะดูดกลืนความยาวคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่นสั้นทำให้เห็นอนุภาคทองระดับนาโนเป็นสีแดงเข้ม แต่เมื่ออนุภาคทองระดับนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้น อนุภาคทองระดับนาโนจะดูดกลืนความยาวคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่นยาวขึ้น สีที่เห็นจึงเปลี่ยนเป็นสีม่วงและน้ำเงินตามขนาดของอนุภาคทองระดับนาโนที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ

2.2.6 การประยุกต์ใช้อนุภาคทองระดับนาโนสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

การที่อนุภาคทองมีขนาดระดับนาโนเมตรทำให้มีข้อดีคือ มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง เปลี่ยนสีตามขนาดของอนุภาคและช่วยเร่งปฏิกิริยาเคมี จากข้อดีดังกล่าวทำให้ในปัจจุบันได้มีการนำอนุภาค

ทองระดับนาโนมาประยุกต์สำหรับงานด้านเคมีวิเคราะห์เพื่อวิเคราะห์หาสารต่างๆ ทั้งด้านสิ่งแวดล้อม อาหารและการแพทย์ โดยสามารถแจกแจงรายละเอียดได้ดังหัวข้อต่อไปนี้

ด้านสิ่งแวดล้อม

มีรายงาน [16] การประยุกต์ใช้อนุภาคทองระดับนาโนเพื่อวิเคราะห์หาปรอทโดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (Fluorescence spectrophotometer) โดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนขนาด 13 นาโนเมตร ปรับปรุงผิวอนุภาคทองระดับนาโนด้วย Rhodamine B (RB), Mercaptopropionic acid (MPA) และ 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDCA) เมื่อให้พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ถ้าในสารละลายไม่มีปรอทจะไม่สามารถเกิดการเรืองแสง (Fluorescence) แต่ถ้ามีปรอทอยู่ในสารละลายก็จะเกิดการเรืองแสงขึ้น เพราะปรอทเป็นตัวช่วยทำให้เกิดการเรืองแสงได้ ดังนั้น เมื่อความเข้มข้นของปรอทเพิ่มขึ้นก็จะทำให้เกิดการเรืองแสงได้มากขึ้น จึงใช้หลักการนี้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณปรอทในตัวอย่างที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้

ด้านอาหาร

มีงานวิจัย [17] ที่เกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนขึ้นโดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนโดยอาศัยหลักการปรับผิวของอนุภาคทองระดับนาโนด้วยสาร 18-crown-6-thiol การเกิดสารเชิงซ้อนดังกล่าวทำให้อนุภาคทองระดับนาโนสามารถรวมตัวกันเป็นกลุ่มใหญ่ขึ้น ส่งผลให้สีของอนุภาคทองระดับนาโนเปลี่ยนไปจากเดิม เมื่อความเข้มข้นของเมลามีนสูงขึ้นอนุภาคทองระดับนาโนสามารถรวมตัวกันเป็นกลุ่มใหญ่ขึ้น สีจึงเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วงและสีน้ำเงินตามลำดับตามขนาดของอนุภาคทองระดับนาโนที่เพิ่มขึ้น จึงใช้ความสัมพันธ์ดังกล่าวหาปริมาณเมลามีนในนมผง

อนุภาคทองระดับนาโนยังสามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์หายาปฏิชีวนะกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ (β-agonists) เป็นยาที่ช่วยในการขยายหลอดลม แก้อาการหอบหืดในมนุษย์ แต่ในปัจจุบันเกษตรกรได้นำยากลุ่มเบตาอะโกนิสต์ไปใช้ผิดวัตถุประสงค์ เช่น ใช้เพื่อลดไขมันและเพิ่มปริมาณเนื้อแดงในสุกร จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์หาปริมาณยาที่ตกค้างในเนื้อสัตว์เพื่อควบคุมไม่ให้เกินมาตรฐานอาหารที่กำหนดไว้ ช่วยป้องกันอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์โดยใช้อนุภาคทองระดับนาโน สารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์เป็นสารประกอบฟีนิลเอธาโนลามีน (Phenylethanolamines) ที่มีหมู่แทนที่ต่างๆในตำแหน่งวงเบนซีนและที่หมู่อะมีโน สารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์สามารถเปลี่ยน $HAuCl_4$ เป็น Au^0 ทำให้ได้อนุภาคทองระดับนาโน วัดความยาวคลื่นของอนุภาคทองระดับนาโนที่ได้ที่ 528 นาโนเมตร ถ้าความเข้มข้นของสารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์มากก็จะทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ได้อนุภาคทองระดับนาโนเกิดขึ้นมากด้วย วิธีนี้มีความไวในการวิเคราะห์สูง ใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 10 นาทีต่อตัวอย่าง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหายากลุ่มเบตาอะโกนิสต์ในตัวอย่างจริงได้โดยไม่มีผลรบกวนจำน้ำตาลกลูโคสและยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ

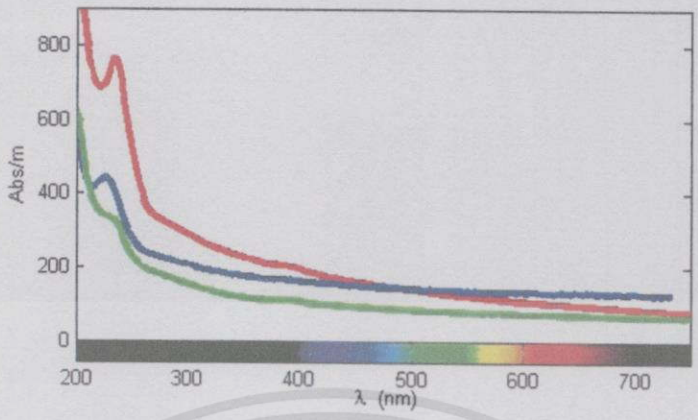
ด้านการแพทย์

อนุภาคทองระดับนาโนยังมีสมบัติเด่นทางด้านไฟฟ้า จึงได้มีงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้อนุภาคทองระดับนาโนสำหรับวิเคราะห์หาสารต่างๆโดยใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาอีโนเลส (α-Enolase; ENO1) ซึ่งเป็นแอนติเจนใช้เป็นสารบ่งชี้มะเร็งปอด อาศัยหลักการอิม-มูโนเซนเซอร์แอสเสย์แบบแซนวิช (Sandwichimmunoassay) ซึ่งวิธีนี้ให้ขีดจำกัดต่ำสุดถึง 2.38 pg/mL และใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 2.5 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง ในขณะที่วิธีทั่วไปที่ใช้ในโรงพยาบาลใช้เวลาวิเคราะห์ถึง 5 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง วิธีวิเคราะห์ที่ดีในทางการแพทย์นอกจากจะต้องมีความถูกต้องสูงแล้วยังต้องคำนึงถึงการใช้งานอีกด้วย ผู้ป่วยควรที่จะสามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวเองในเบื้องต้น เพื่อควบคุมและติดตามอาการของโรคได้ทันท่วงที

2.3 ยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ [19,20]

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วง Ultra violet (UV) และ Visible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190 -1000 นาโนเมตร สารที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน หรือสารอนินทรีย์ ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารแต่ละชนิดจะดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกันและปริมาณการดูดกลืนรังสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสารนั้นๆ จึงสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นเทคนิคที่ให้สภาพไวที่ดีและใช้กันอย่างแพร่หลาย ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่าความยาวคลื่น (Wavelength) ซึ่งเรียกว่า สเปคตรัม (Spectrum) ตัวอย่างของยูวี-วิสิเบิลสเปคตรัมแสดงดังรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

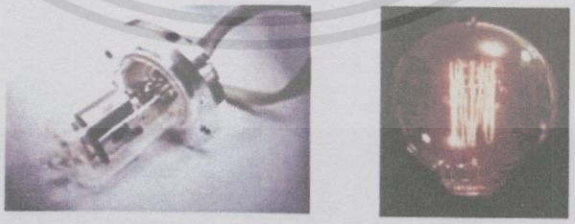


รูปที่ 2.6 UV-Visible spectrum

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/File:UVVIS_spectrum_of_bisulphide_in_sewage.jpg

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ประกอบไปด้วย

1. Light source แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลารวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอ สำหรับความยาวคลื่นในช่วงอัลตราไวโอเลตจะใช้หลอดดิวทีเรียม (Deuterium lamp) เป็นแหล่งกำเนิดแสงซึ่งให้แสงในช่วง 185-375 นาโนเมตร หลักการคือทำให้อะตอมดิวทีเรียมที่อยู่ในสภาวะเร้าคายพลังงานออกมา ส่วนหลอดทังสเตน (Tungsten filament lamp) จะให้ความยาวคลื่นครอบคลุมช่วงแสงที่มองเห็นได้ คือตั้งแต่ 320-2500 นาโนเมตร หลักการจะคล้ายกับหลอดไฟทังสเตนธรรมดาคือ ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปจนกระทั่งลวดทังสเตนร้อนและเปล่งรังสีออกมา โดยปกติจะเปิดเครื่องทิ้งไว้ก่อนใช้งานประมาณ 30 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าหลอดดิวทีเรียมหรือหลอดทังสเตนให้แสงที่มีความเข้มสม่ำเสมอ

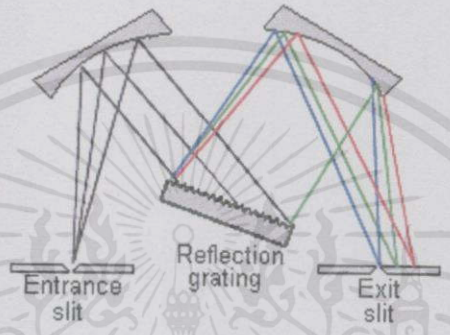


ก) ข)

รูปที่ 2.7 ก) หลอดดิวทีเรียม ข) หลอดทังสเตน [19]

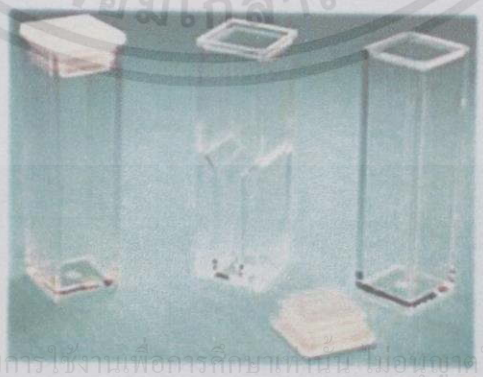
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Monochromator เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสง โดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติกให้เป็นแสงโมโนโครเมติกซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆหรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์ปริซึมหรือเกรตติง มีลักษณะเป็นร่องเล็กๆขนานกันจำนวนมาก แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะตกกระทบลงบนผิวหน้าของร่องแล้วสะท้อนออกมาที่มุมต่างๆ เฉพาะความยาวคลื่นที่ต้องการเท่านั้นจึงจะผ่านช่องแสงออก (Exit slit) ไปสู่สารตัวอย่าง



รูปที่ 2.8 เกรตติงใช้แยกความยาวคลื่นที่ต้องการ [19]

3. Cell sample ภาชนะใส่สารตัวอย่าง สำหรับสเปคโทรโฟโตมิเตอร์จะเรียกว่า เซลล์ หรือ คิวเวทท์ (Cuvette) มีหลายแบบหลายขนาดด้วยกันขึ้นกับการใช้งาน หลักสำคัญในการเลือกใช้คือ การวัดในช่วงแสงอัลตราไวโอเลต จะต้องใช้เซลล์ที่ทำจากควอตซ์ (Quartz) เท่านั้น เนื่องจากแก้วสามารถดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตได้ ส่วนเซลล์ที่ทำจากแก้วจะใช้วัดในช่วงแสงที่ตามองเห็นได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.9 ตัวอย่าง Cuvette แบบต่างๆ [19]

4. Detector ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้า เครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูงคือ แม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อยก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ ปัจจุบันเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ส่วนใหญ่นิยมใช้ตัวตรวจจับสัญญาณ 2 ชนิดคือ

4.1 หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (Photomultiplier tube, PMT)

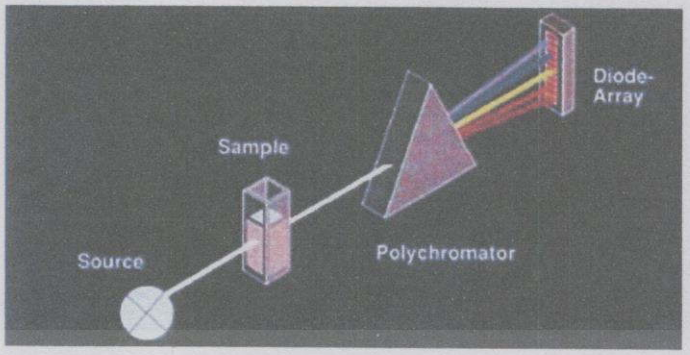
หลอด PMT ประกอบไปด้วยแคโทด (Cathode) ที่ฉาบผิวด้วยสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้เมื่อถูกแสงจำนวน 9 ชุด เรียกว่า ไดโนด (Dynode) แต่ละไดโนดจะมีศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อแสงตกกระทบกับไดโนดตัวที่หนึ่งสารที่ฉาบผิวจะเกิดอิเล็กตรอนขึ้น แล้ววิ่งไปกระทบไดโนดที่สอง สาม สี่ จนครบทั้งเก้าตัว ดังนั้นปริมาณอิเล็กตรอนจะเพิ่มขึ้นถึง 10^6-10^7 เท่า แล้วจึงชนแอโนดให้กระแสไฟฟ้าออกมาเข้าเครื่องขยายสัญญาณต่อไป

รูปที่ 2.10 ลักษณะหลอด PMT ในสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ [19]

4.2 โฟโตไดโอดอาร์เรย์ (Photodiode arrays; PDA)

ตัวตรวจจับสัญญาณชนิดนี้สามารถจับสัญญาณได้ครอบคลุมทั้งสเปคตรัมโดยใช้ไดโอดนี้ มาเรียงต่อกันเป็นแถว ซึ่งสามารถวัดครอบคลุมสเปคตรัมได้ตั้งแต่ 200-1100 nm ตัวตรวจจับสัญญาณนี้ประกอบไปด้วยโฟโตไดโอดและตัวเก็บประจุ (capacitor) ประมาณ 200- 4000 ตัวเรียงต่อกันเป็นแถว หลักการเริ่มต้นด้วยการให้ประจุผ่านผิวหน้าไดโอด ซึ่งไดโอดก็จะเก็บประจุไว้ที่ตัวเก็บประจุ เมื่อแสงตกลงบนไดโอดจะทำให้เกิดประจุไฟฟ้าไปทำลายประจุที่เก็บไว้ที่ตัวเก็บประจุ ทำให้ต้องใส่ประจุเพิ่มเข้าไปใหม่ซึ่งเป็นช่วงของการสแกนแต่ละครั้งนั่นเอง ปริมาณของประจุที่ต้องใส่เข้าไปใหม่ จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มแสงที่วัดได้ของแต่ละไดโอด ดังนั้นจากการวัดปริมาณแสงที่แตกต่างกันตลอดช่วงความยาวคลื่นจะได้เป็นสเปคตรัมการดูดกลืนของสารนั้นออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ [19]

5. Recorder and processor **ส่วนบันทึกและแปรผลสัญญาณ** ทำหน้าที่ขยายสัญญาณและแปรผลสัญญาณให้ออกมาในมาตราส่วนแบบล็อก (Log scale)

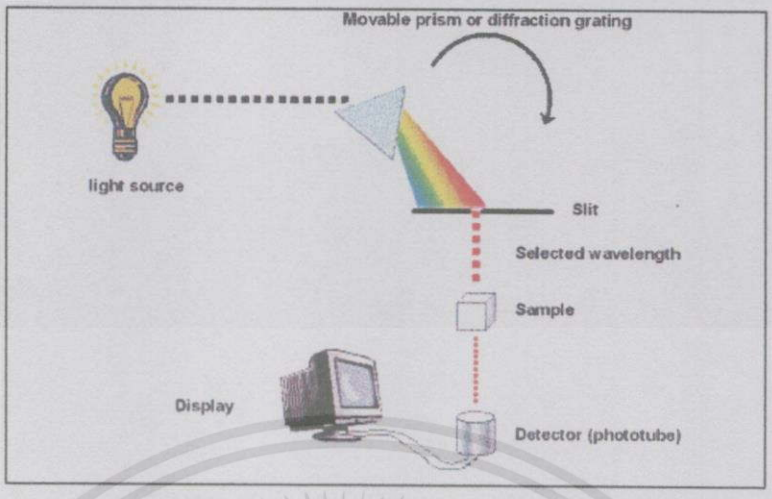
รูปแบบของเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (Types of Spectrophotometer)

1. สเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว (Single beam spectrophotometer) หลักการของสเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยวนั้น เมื่อแสงออกจากแหล่งกำเนิดแสงแล้ว จะผ่านโมโนโครเมเตอร์ที่เป็นเกรตติง และสารตัวอย่างตามลำดับ แล้วจึงเข้าสู่ตัวตรวจจับสัญญาณ ตลอดเส้นทางของลำแสงนี้มีลำแสงเดียว จึงเรียกสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ประเภทนี้ว่าแบบลำแสงเดี่ยว เนื่องจากสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ประเภทนี้ใช้ลำแสงเพียงลำเดียวผ่านจากโมโนโครเมเตอร์ไปสู่สารละลายที่ต้องการวัดและเข้าสู่ตัวตรวจจับสัญญาณเลย ดังนั้นการวัดจึงต้องวัด 2 ครั้งดังนี้

- ครั้งแรกเซลล์บรรจุแบลงค์ (Blank) ซึ่งเป็นตัวทำละลายของตัวอย่างที่เราต้องการวัด เมื่อลำแสงผ่านเซลล์ ปรับเครื่องให้อยู่ในตำแหน่ง “ศูนย์” (Set zero)

- ส่วนครั้งหลังบรรจุสารละลายที่ต้องการวัด (Sample) แล้วจึงให้ลำแสงผ่านเซลล์ ความแตกต่างระหว่างการดูดกลืนแสงของทั้ง 2 ครั้งจะปรากฏบนหน้าปัดมิเตอร์จากนั้นก็สามารถวัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นอื่นๆต่อไปได้เลย โดยไม่ต้องกลับไปวัดแบลงค์อีก

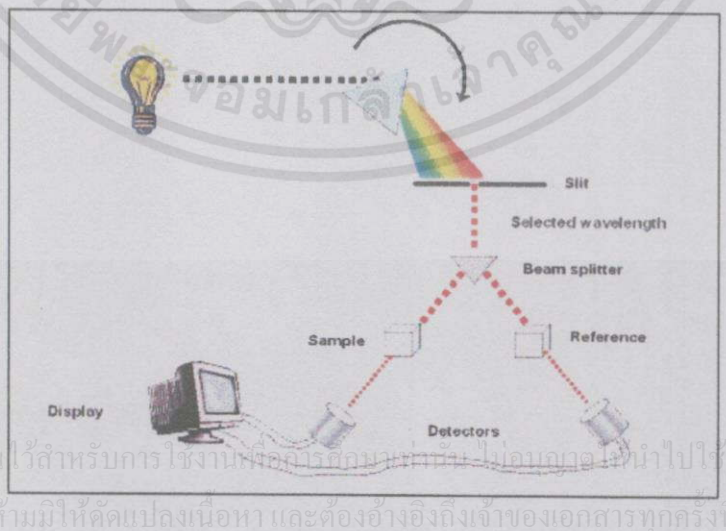
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว [19]

2. สเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ (Double beam spectrophotometer)

สำหรับสเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ เมื่อลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสงออกจากช่องแสงออกแล้วลำแสงจะไปสู่อุปกรณ์ตัดลำแสง (Beam chopper) ซึ่งจะทำหน้าที่สะท้อนลำแสงไปผ่านสารตัวอย่าง (Sample) ในขณะต่อมาจะสะท้อนลำแสงไปผ่านสารอ้างอิง (Reference) ซึ่งก็คือแบลงค์นั่นเอง โดยที่ลำแสงทั้งสองจะมีความเข้มแสงเท่ากันก่อนที่จะผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิง เมื่อลำแสงทั้งสองนี้ไปตกกระทบบนตัวตรวจจับสัญญาณ ความแตกต่างของความเข้มแสงหลังจากผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิงจะกลายเป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

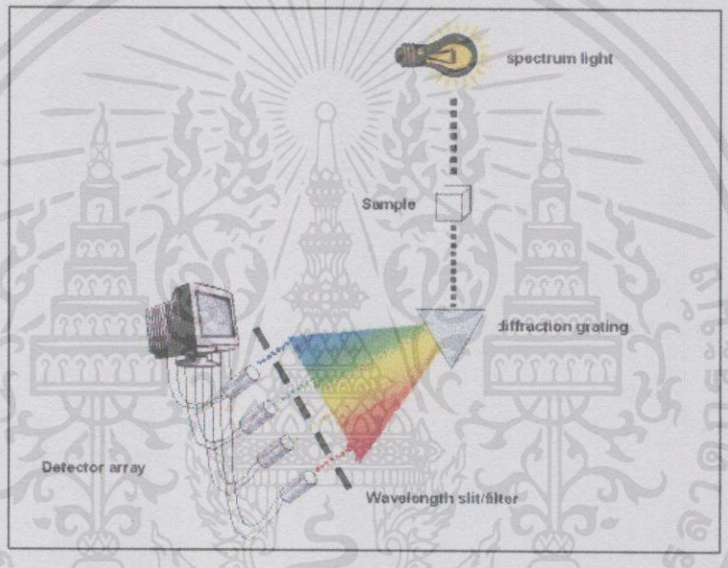


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.13 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ [19]

3. สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญา (Spectrophotometer : Diode array detector)

Diode array detector เป็นการตรวจจับสัญญาณ โดยวัดการดูดกลืนของแสงเช่นเดียวกับสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ทั่วไป เพียงแต่การเก็บข้อมูลมิใช่การเก็บเพียง 1 หรือ 2 ความยาวคลื่นเท่านั้น แต่สามารถเก็บข้อมูลได้เป็นช่วงของความยาวคลื่นที่ผู้วิเคราะห์สามารถเลือกได้โดยใช้เวลาเพียงนิดเดียว เนื่องจากสามารถวัดทุกความยาวคลื่นได้ในเวลาเดียวกัน เหมาะสำหรับการเก็บข้อมูลที่เป็นสเปคตรัม หรือต้องการติดตามการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนของสารที่หลายความยาวคลื่นพร้อมๆกัน

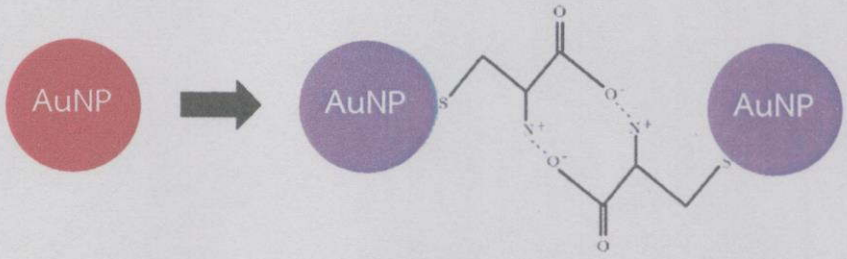


รูปที่ 2.14 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ [19]

2.4 หลักการตรวจวัดที่ใช้

อันตรกิริยาระหว่างอนุภาคทองระดับนาโนกับซีสเทอีนเป็นไปตามทฤษฎี Hard-Soft Acid-Base (HSAB) โดยที่หมู่ไธออล (-SH) ของซีสเทอีนจะเกิดอันตรกิริยากับพื้นผิวของอนุภาคทองระดับนาโน และการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวกันของซีสเทอีนแต่ละโมเลกุลเป็นการดึงดูดกันด้วยแรงไฟฟ้าสถิตซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.15 แสดงการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโนกับซีสเทอีน [5]

หลักการของทฤษฎี HSAB คือ กรดลิวอิสแก่จะเกิดอันตรกิริยากับเบสลิวอิสแก่ได้ดีเพื่อที่จะสร้างพันธะไอออนิก และกรดลิวอิสอ่อนจะเกิดอันตรกิริยากับเบสลิวอิสอ่อนได้ดีเพื่อสร้างพันธะโควาเลนต์ ซึ่งอนุภาคทองระดับนาโนเป็นอะตอมของโลหะซึ่งจัดอยู่ในหมวดกรดลิวอิสอ่อน และหมู่ไธออลของซีสเทอีนจัดอยู่ในหมวดเบสลิวอิสอ่อน [20] จึงสามารถใช้ทฤษฎี HSAB อธิบายการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคทองระดับนาโนกับซีสเทอีนได้ และซีสเทอีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งจึงมีคุณสมบัติที่จะเป็น zwitterion หรือมีสองประจุในโมเลกุลเดียวภายใต้พีเอชที่เหมาะสม เมื่อประจุต่างกันอยู่ใกล้กันก็จะเกิดแรงดึงดูดเข้าหากัน ดังนั้นการเกิดอันตรกิริยาระหว่างซีสเทอีนสองโมเลกุลจึงสามารถอธิบายได้โดยแรงทางไฟฟ้าสถิต

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

K. Farhadi และคณะ [4] ได้ทำการตรวจวัดซีสเทอีนในตัวอย่างยาด้วยวิธี colorimetric method โดยใช้อนุภาคโลหะคู่ของเงิน/พาลาเดียมระดับนาโนเป็นรีเอเจนต์ โดยสารละลายมีสีเหลืองและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เมื่อทำการตรวจวัดซีสเทอีนและเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 7 โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 5 นาที พบว่าเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคโลหะ ซึ่งสังเกตได้จากสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นสีเขียวและเกิดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10 – 172 นาโนโมลาร์ โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 3.3 นาโนโมลาร์ และมีค่า R^2 = 0.9912 ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือมีความไวสูง และสามารถตรวจวัดซีสเทอีนในตัวอย่างยาได้อย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือการเตรียมอนุภาคโลหะคู่ระดับนาโนมีความยุ่งยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

X. Wei และคณะ [21] ได้ทำการตรวจวัดซีสเทอีนในปัสสาวะด้วยวิธี colorimetric method โดยใช้ carboxymethyl cellulose-functionalized gold nanoparticles (CMC-

AuNPs) เป็นรีเอเจนต์ อนุภาคทองระดับนาโนสังเคราะห์โดยใช้ carboxymethyl cellulose เพื่อป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโนจากเกลือ พบว่าเมื่อใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคทอง ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของสารละลายและสเปคตรัมการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10.0-100.0 ไมโครโมลาร์ และค่า R^2 = 0.997 วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความไวสูง และเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการตรวจวัดหาซีสเทอีนในตัวอย่างชีวภาพ

Q. Qian และคณะ [22] ได้ทำการตรวจวัดซีสเทอีนในสมองหนูด้วยวิธี colorimetric method โดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนเป็นรีเอเจนต์ เริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนโดยใช้ซิเตรทเป็นสเตบิไลเซอร์ ได้สารละลายทองที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 13 นาโนเมตรและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าการเติมซีสเทอีนหรือกรดแอสปาติกปริมาตร 20 ไมโครลิตรเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งลงในสารละลายทอง 200 ไมโครลิตรไม่เกิดการรวมตัวกัน ในขณะที่การเติมซีสเทอีนลงในสารละลายทองที่มีกรดแอสปาติก 1.8 มิลลิโมลาร์กระจายอยู่และทำปฏิกิริยา 10 นาที เกิดการรวมตัวกันซึ่งสังเกตได้จากสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงิน ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.166 – 1.670 ไมโครโมลาร์ โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ 100 นาโนโมลาร์

S. Jongjinakool และคณะ [23] ได้ทำการตรวจวัดซีสเทอีนด้วยวิธี colorimetric method โดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนที่ไม่ได้ทำการปรับปรุงใดๆเป็นรีเอเจนต์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาขนาดของอนุภาคทองและพีเอชที่เหมาะสมในการตรวจวัดซึ่งพบว่าอนุภาคทองขนาด 10.8 นาโนเมตรและที่พีเอช 4 เหมาะสำหรับการตรวจวัดซีสเทอีน เมื่อเติมซีสเทอีนลงในสารละลายทองและทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 นาที ผลปรากฏว่าสารละลายเปลี่ยนสีจากสีแดงไปเป็นสีน้ำเงินเนื่องจากซีสเทอีนเหนี่ยวนำให้อนุภาคทองระดับนาโนเกิดการรวมตัวกัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้สามารถตรวจวัดซีสเทอีนได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.1 - 0.6 ppm โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด 0.01 ppm และมีค่า R^2 = 0.998

W. Xueji และคณะ [24] ได้ทำการตรวจวัดซีสเทอีนโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันทางไฟฟ้าเคมีโดยใช้ขั้วฟิล์มที่ดัดแปลงด้วยฟลูออโรคาร์บอนพอลิเมอร์ที่มีอนุภาคทองระดับนาโนกระจายอยู่ ทำการตรวจวัดซีสเทอีนที่พีเอช 2.0 และ 7.0 พบว่า ที่พีเอช 2 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 3.0 – 50.0 ไมโครโมลาร์และมีค่า R^2 = 0.998 ในขณะที่พีเอช 7.0 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2.0 – 80.0 ไมโครโมลาร์และมีค่า R^2 = 0.999 โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดอยู่ที่ 1.0 ไมโครโมลาร์ ทั้งสองพีเอช และที่พีเอช 7.0 ไม่มีการรบกวนจากกรดแอสคอร์บิคและกรดยูริค

เอกสารนี้เป็น... ไม่ว่ากรณี...

J. Wang และคณะ [25] ได้ทำการตรวจวัดซีสเทอีนโดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนที่สังเคราะห์โดยวิธี seed-mediated และทำการปกคลุมผิวอนุภาคทองด้วย cetyltrimethyl-ammonium bromide หรือ CTAB ทำการตรวจวัดสัญญาณ plasmon resonance light scattering (PRLS) ของซีสเทอีนที่ความยาวคลื่น 566 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายพีเอช 4.2 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.1 โมลาร์และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 25 นาที พบว่าเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโนขึ้นและค่าความเข้ม PRLS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซีสเทอีน ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01 – 0.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 2.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและไม่มีการรบกวนจากกรดอะมิโนชนิดอื่น และเมื่อทำการเปรียบเทียบการตรวจวัดโดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนที่มีซิเตรทเคลือบผิวอนุภาคทอง พบว่าในสารละลายที่มีความเข้มข้นเกลือสูง อนุภาคทองที่ปกคลุมด้วย CTAB จะเกิดการรวมตัวกันก็ต่อเมื่อมีซีสเทอีนและเกลือ แต่สำหรับอนุภาคทองที่เคลือบด้วยซิเตรทสามารถเกิดการรวมตัวกันได้โดยปราศจากซีสเทอีน

L. Li และ B. Li [26] ได้ทำการตรวจวัดซีสเทอีนด้วยวิธี colorimetric method โดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนโดยอาศัยสมบัติทางแสงของอนุภาคทองระดับนาโน การรวมตัวกันของซีสเทอีนที่อยู่บนผิวของอนุภาคทองระดับนาโนและอันตรกิริยาระหว่างซีสเทอีนกับ Cu^{2+} ในอัตราส่วน 2:1 การตรวจวัดทำโดยการเติมสารละลายซีสเทอีน 50 ไมโครลิตรลงในสารละลายทอง 350 ไมโครลิตร แล้วทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Cu^{2+} 50 ไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำจนมีปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตรและทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 9 นาที ผลปรากฏว่าเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโนซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน ความเข้มข้นของซีสเทอีนสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 10 นาโนโมลาร์

Z. Chen และคณะ [27] ได้ทำการตรวจวัดซีสเทอีนโดยใช้อนุภาคทองระดับนาโนที่มี ssDNA เป็นสเตบิไลเซอร์ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียร สามารถป้องกันการเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคทองจากเกลือได้และจะหลุดออกเมื่อมีการเติมซีสเทอีน ในการทดลองนี้ได้ใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์และใช้เวลา 2 นาทีในการทำปฏิกิริยา ผลการทดลองพบว่าสารละลายเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินหลังจากการเติมโซเดียมคลอไรด์ เมื่อทำการพลอตอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 ต่อ 520 นาโนเมตร (A_{640}/A_{520}) ได้เส้นตรงที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซีสเทอีนในช่วง 0.1 – 5.0 ไมโครโมลาร์โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด 0.1 โม-

เอกสารนี้เป็น... ไม่ว่ากรณีใด... ที่มีลิขสิทธิ์...

ลาร์ นอกจากนี้กรดอะมิโนชนิดอื่นที่ไม่มีหมู่ไธออล (-SH) ไม่ทำให้สารละลายทองเกิดการเปลี่ยนสี เพราะไม่เกิดปฏิกิริยากับอนุภาคทองระดับนาโน วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง

M.R. Hormozi-Nezhad และคณะ [28] ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดซีสเทอีนและกลูตาไธโอนที่มีความไวสูงโดยอาศัยหลักการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโนที่มีซิเตรทล้อมอยู่ หมู่ไธออลของกรดอะมิโนสามารถแทนที่ซิเตรทบนพื้นผิวของทองได้ ส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคทองผ่านแรงไฟฟ้าสถิตหรือพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล จากการทดลองโดยใช้สารละลายอนุภาคทองระดับนาโน 2 มิลลิลิตร น้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 0.1 มิลลิลิตร และซีสเทอีนหรือกลูตาไธโอนความเข้มข้นต่างๆ 0.1 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 3 นาที พบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีน้ำเงิน เมื่อทำการพลอตอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 ต่อ 521 นาโนเมตรและที่ 650 ต่อ 521 นาโนเมตรสำหรับซีสเทอีนและกลูตาไธโอนตามลำดับ พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของซีสเทอีนอยู่ในช่วง 1 – 100 ไมโครโมลาร์ R^2 = 0.989 และของกลูตาไธโอนอยู่ในช่วง 5 – 200 ไมโครโมลาร์ R^2 = 0.990 โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดอยู่ที่ 2.1 ไมโครโมลาร์ และ 3.3 ไมโครโมลาร์สำหรับซีสเทอีนและกลูตาไธโอนตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีน โดยใช้อนุภาคทองนาโน

Techniques	Reagent	Analytes and working range	LOD	References
Spectrophoto-metry	Silver nanoparticles	Cysteine in pharmaceutical products (10 – 172 nM)	3.3 nM	Sensor and Actuators B 202 (2014) p.993-1001
Spectrophoto-metry	Gold Nanoparticles	Cysteine in urine (10 – 100 μM)	-	Analytica Chimica Acta 671 (2010) 80–84
Spectrophoto-metry	Gold nanoparticles	Cysteine in rat brain (0.166 – 1.670 μM)	100 nM	Anal. Chem. (2012) 84 p.9579-9584
Electrochemical	Gold nanoparticles	Cysteine on Au/Nafion/GC electrode (2 – 80 μM)	1 μM	Science china Chemistry (2011) p. 521-525
Spectrophoto-metry	Gold nanoparticles	Cysteine (0.01 – 0.40 μg/mL)	2.9 ng/g	Analytica chimica acta 626 (2008) 37–43
Spectrophoto-metry	Gold nanoparticles	Cysteine	10 nM	Analyst, 2009, 134, 1361–1365
Spectrophoto-metry	Gold nanoparticles	Cysteine (0.1 – 5.0 μM)	0.1 M	Anal Bioanal Chem (2009) 395:489–494
Spectrophoto-metry	Gold nanoparticles	cysteine and glutathione (1 – 100 μM)	2.1 μM	Scientia Iranica F (2012) 19 (3), 958–963

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ยี่ห้อและประเทศผู้ผลิต
กรดเตตระคลอโรออริก (Tetrachloroauric (III) acid)	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	Sigma-Aldrich, USA
โซเดียมซิเตรท ไดไฮเดรต (Sodium citrate tribasic dihydrate or Trisodium citratedihydrate)	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich, USA
แอลซีสเทอีน (L-Cysteine)	$C_3H_7NO_2S$	Himedia,India
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	NaCl	Sigma-Aldrich, USA
สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)	HCl	Carlo Erba Reagents, Spaim
สารละลายโซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate)	$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	Carlo Erba Reagents, Spaim
สารละลายกรดแอซิติก (Acetic acid)	CH_3COOH	Carlo Erba Reagents, Spaim

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องตรวจวัด

1. บีกเกอร์	ขนาด	600	cm3	1	ใบ
	ขนาด	100	cm^3	1	ใบ
	ขนาด	50	cm^3	2	ใบ
	ขนาด	25	cm^3	5	ใบ
2. ขวดวัดปริมาตร	ขนาด	100	cm^3	1	ใบ
	ขนาด	50	cm^3	2	ใบ
	ขนาด	25	cm^3	2	ใบ
3. ขวดรูปชมพู่	ขนาด	250	cm^3	1	ใบ
	ขนาด	100	cm^3	1	ใบ
4. ปิเปต	ขนาด	10	cm^3	1	อัน
5. ไมโครปิเปต	ขนาด	5	mL	1	อัน
	ขนาด	1000	µL	1	อัน
	ขนาด	200	µL	1	อัน
6. ขวดขนาดเล็กมีฝาปิด	10	ใบ			
7. แท่งแก้วคนสาร	2	อัน			
8. เทอร์โมมิเตอร์	1	อัน			
9. จุกยาง	1	อัน			
10. ช้อนตักสาร	4	อัน			
11. นาฬิกาจับเวลา	1	อัน			

12. หลอดหยด
13. แท่งแม่เหล็ก
14. แผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์
15. กระดาษวัดพีเอช
16. เครื่องชั่งสาร - Suimadzu Aux 220, Japan
17. เครื่องให้ความร้อน - IKA® C-MAG HS 7
18. เครื่องเขย่าสาร - Vortex Genie 2, USA
19. เครื่องวัด pH-Metrohm® 827 pH Lab meter, USA
20. เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ - Jasco V630, USA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเตรียมสารละลาย

สารละลายทุกตัวเตรียมจากน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ได้จากเครื่อง ZENEER UP 900 (ยี่ห้อ human corporation) และสารเคมีทุกตัวเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade)

3.2.1 การเตรียมสารละลายกรดเตตระคลอโรออริคเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ละลายเตตระคลอโรออริค 0.0394 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อยใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน จะได้สารละลายกรดเตตระคลอโรออริคเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

3.2.2 การเตรียมสารละลายไตรโซเดียมซิเตรตเข้มข้น 38.8 มิลลิโมลาร์

ละลายไตรโซเดียมซิเตรต 0.5705 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อยใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน จะได้สารละลายไตรโซเดียมซิเตรทเข้มข้น 38.8 มิลลิโมลาร์

3.2.3 การเตรียมสารละลายอนุภาคทองระดับนาโน

เทสารละลายกรดเตตระคลอโรออริคเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ต้มจนเดือดพร้อมปั่นกวนด้วยความเร็วสูง เมื่อสารละลายเดือดเติมไตรโซเดียมซิเตรตเข้มข้น 38.8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 7.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว ให้ความร้อนต่อเป็นเวลา 15 นาที สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงไวน์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส จะได้สารละลายอนุภาคทองระดับนาโนที่มีความเข้มข้น 15 นาโนโมลาร์

3.2.4 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 7.3125 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อย ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์

นำสารละลายโซดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.7, 1, 10 มิลลิโมลาร์ และ 0.1, 0.5, 1, 2, 3 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีสเทอีน

ละลายซีสเทอีน 0.0454 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจำนวนเล็กน้อย ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายซีสเทอีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์

ปิเปตสารละลายซีสเทอีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ด้วยไมโครปิเปตมา 0.100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาดเล็กมีฝาปิด ปรับปริมาตรให้ครบ 3 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายซีส-เทอีนที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์

ปิเปตสารละลายซีสเทอีน 500 ไมโครโมลาร์ด้วยไมโครปิเปตมา 0.006, 0.120, 0.240, 0.360, 0.600, 1.200, 1.800 และ 2.400 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 3 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้ซีสเทอีนความเข้มข้น 1, 20, 40, 60, 100, 255, 300 และ 400 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ

3.2.6 การเตรียมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4

ปิเปตสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 41 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน จะได้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4

3.2.7 การเตรียมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5

ปิเปตสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 14.8 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 35.2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน จะได้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5

3.2.8 การเตรียมสารละลายตัวอย่างซีสเทอีนจากเม็ดยา

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างยาแต่ละเม็ด (ข้างฉลากระบุปริมาณซีสเทอีน 500 มิลลิกรัมต่อเม็ด) บันทึกน้ำหนักไว้และนำไปบดให้ละเอียด นำไปละลายน้ำและกรองผ่านกระดาษกรองใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของซีสเทอีน 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือเท่ากับ 0.165 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำไปดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้

นำสารละลายตัวอย่างประมาณ 2 มิลลิลิตร มากรองอีกครั้งผ่าน syringe membrane จากนั้นปิเปตสารละลายที่ผ่านการกรองครั้งที่ 2 มา 0.025 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของซีสเทอีนเท่ากับ 165.0 ไมโครโมลาร์ โดยจะทำการเตรียมสารตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่าง

3.2.9 การเตรียม spiked sample

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 ที่ผ่านการกรองครั้งที่ 2 มา 0.025 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานซีสเทอีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ มา 0.166 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดวัดปริมาตรเดิม ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลาย spiked sample ที่มีความเข้มข้น 265 ไมโครโมลาร์โดยประมาณ

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ 4, 5 และ 6 ที่ผ่านการกรองครั้งที่ 2 มา 0.025 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานซีสเทอีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ มา 0.333 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดวัดปริมาตรเดิม ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลาย spiked sample ที่มีความเข้มข้น 365 ไมโครโมลาร์โดยประมาณ

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองระดับนาโน

ปิเปตสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 8.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโต-มิเตอร์

3.3.2 การตรวจวัดซีสเทอีนด้วยอนุภาคทองระดับนาโน

ทำการตรวจวัดแบลงค์ โดยปิเปตสารละลายอนุภาคทองระดับนาโน 2 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 8.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาดเล็กมีฝาปิดเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปตสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ปิเปตซีสเทอีนเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ในขวดขนาดเล็กมีฝาปิด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยจับเวลาต่อจากขั้นตอนการเขย่าสาร แล้วกดตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่นาทีที่ 2

สำหรับซีสเทอีนที่ความเข้มข้นอื่นๆ (20, 40, 60, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครโมลาร์) ให้ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกัน

สร้างกราฟมาตรฐานจากข้อมูลที่ได้ โดยใช้ค่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง (A_{650}/A_{527}) พลอตเป็นแกน y ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน พลอตเป็นแกน x โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel พร้อมทั้งหาสมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2)

3.3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

3.3.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการตรวจวัดซีสเทอีน

ปิเปตสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 8.1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ปิเปตโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ในขวดขนาดเล็กมีฝาปิด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยจับเวลาต่อจากขั้นตอนการเขย่าสารแล้วกดตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่นาทีที่ 2

สำหรับโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 0.4, 0.7, 1, 10 มิลลิโมลาร์ และ 0.1, 0.5, 1, 2, 3โมลาร์) ให้ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกัน

3.3.3.2 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

จะทำการศึกษาที่ความเข้มข้นซีสเทอีนที่ความเข้มข้น 1 , 200 และ 500 ไมโครโมลาร์ โดยทำการปิเปตสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ปิเปตซีสเทอีนเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาดเล็กมีฝาปิด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดย

เอกสารนี้เป็น... ไม่ว่ากรณีใด...

จับเวลาต่อจากขั้นตอนการเขย่าสาร แล้วกดตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่นาทีที่ 2 , 3 , 4 , 6 , 8 , 10 , 12 , 14 , 16 , 18 และ 20

สำหรับซีสเทอีนที่ความเข้มข้น 200 และ 500 ไมโครโมลาร์ ให้ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกัน

3.3.3.3 การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการตรวจวัดซีสเทอีน

ทำการตรวจวัดค่าพีเอชของสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนด้วยพีเอชมิเตอร์ ปรับพีเอชของสารลายอนุภาคทองระดับนาโนให้มีค่าพีเอช 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตรด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4 จะได้สารละลายอนุภาคทองระดับนาโนมีค่าพีเอช 4 จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.2

ทำการตรวจวัดค่าพีเอชของสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนด้วยพีเอชมิเตอร์ ปรับพีเอชของสารลายอนุภาคทองระดับนาโนให้มีค่าพีเอช 5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตรด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5 จะได้สารละลายอนุภาคทองระดับนาโนมีค่าพีเอช 5 จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.2

3.3.4 การตรวจวัดซีสเทอีนในตัวอย่างอาหารเสริมเม็ดยา

ปิเปตสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ปิเปตตัวอย่างซีสเทอีนจากเม็ดยา ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาดเล็กมีฝาปิด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยจับเวลาต่อจากขั้นตอนการเขย่าสาร แล้วกดตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่นาทีที่ 2 หลังจากนั้นนำอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาความเข้มข้นและปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่าง

3.3.5 การหาค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ

ปิเปตสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ปิเปต spiked sample ขวดที่ 1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาดเล็กมีฝาปิด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... การค้า

เวลา 1 นาที แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยจับเวลาต่อจากขั้นตอนการเขย่าสาร แล้วกดตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่นาทีที่ 2 หลังจากนั้นนำอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาความเข้มข้น และนำไปคำนวณค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับโดยเทียบกับตัวอย่างที่ 1

สำหรับ spiked sample ขวดที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ให้ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกัน

3.3.6 การหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ดำเนินการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง และนำไปคำนวณหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

3.3.7 การหาความเที่ยง

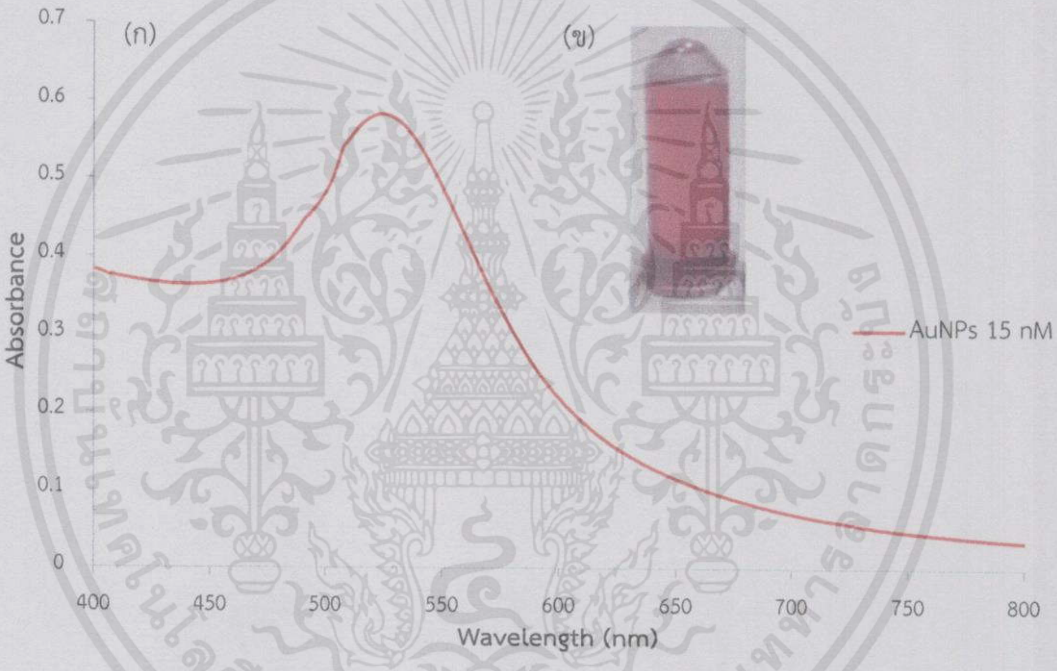
ดำเนินการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานซีสเทอีนความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ จำนวน 10 ครั้ง จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน

ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400 – 800 นาโนเมตร ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1



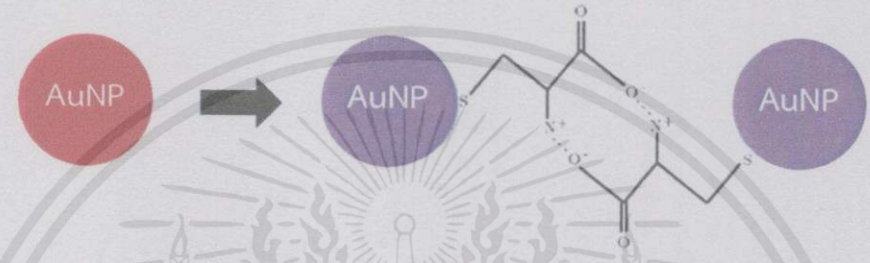
รูปที่ 4.1 (ก) แสดงสเปคตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองระดับนาโน และ (ข) แสดงรูปถ่ายสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนที่สังเคราะห์ได้

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 พบว่าสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนที่สังเคราะห์ได้มีสีแดงและเมื่อทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 นาโนเมตร อนุภาคทองระดับนาโนสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นบริเวณ 527 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษากลไกการตรวจวัดซีสเทอีนด้วยอนุภาคทองระดับนาโน

อันตรกิริยาระหว่างอนุภาคทองระดับนาโนกับซีสเทอีนเป็นไปตามทฤษฎี Hard-Soft Acid-Base (HSAB) โดยที่หมู่ไธออล (-SH) ของซีสเทอีนจะเกิดอันตรกิริยากับพื้นผิวของอนุภาคทองระดับนาโน และการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวกันของซีสเทอีนแต่ละโมเลกุลเป็นการดึงดูดกันด้วยแรงไฟฟ้าสถิตซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.2

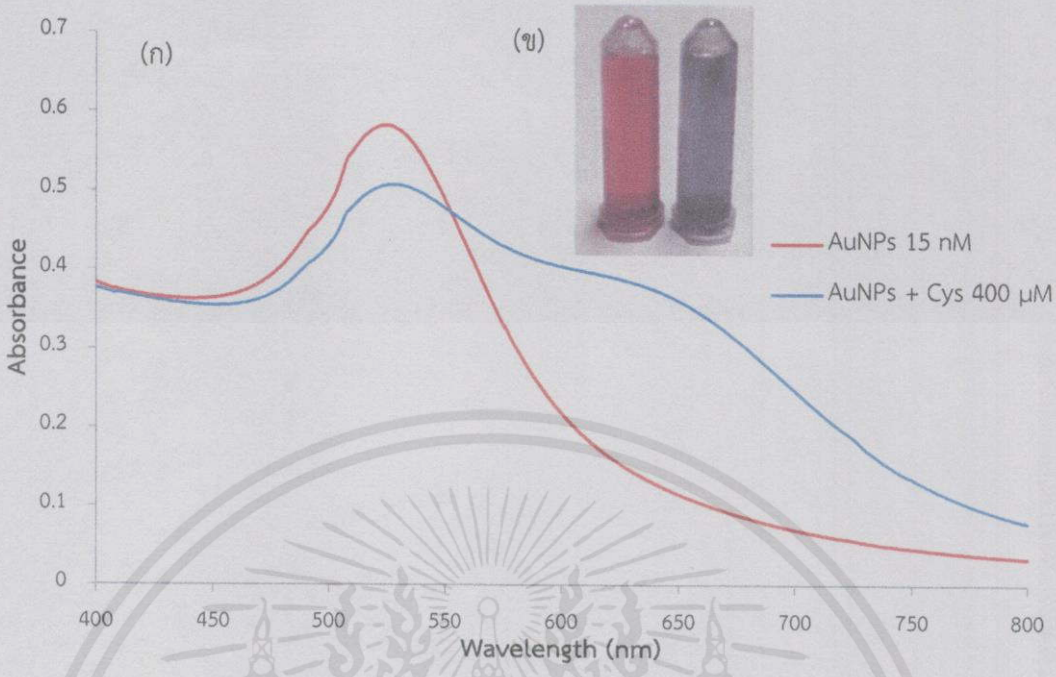


รูปที่ 4.2 แสดงการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโนกับซีสเทอีน [5]

เมื่อเกิดการรวมตัวกันสารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีแดงไปเป็นสีม่วง และเมื่อทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 – 800 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.3

จากรูปที่ 4.3 จะพบว่าเมื่อมีการเติมซีสเทอีนความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ลงไปในสารละลายอนุภาคทองระดับนาโน ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 527 นาโนเมตรมีค่าน้อยลงและค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นเนื่องจากขนาดของอนุภาคทองระดับนาโนที่ใหญ่ขึ้นทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนไปจึงส่งผลให้ช่วงความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้ [5]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 (ก) แสดงสเปคตรัมการดูดกลืนแสงของแบลงค์และซีสเทอีนความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ และ (ข) แสดงรูปถ่ายสารละลายอนุภาคทองระดับนาโนที่สังเคราะห์ได้มีสีแดงและเมื่อเติมซีสเทอีนความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์จะมีสีม่วง

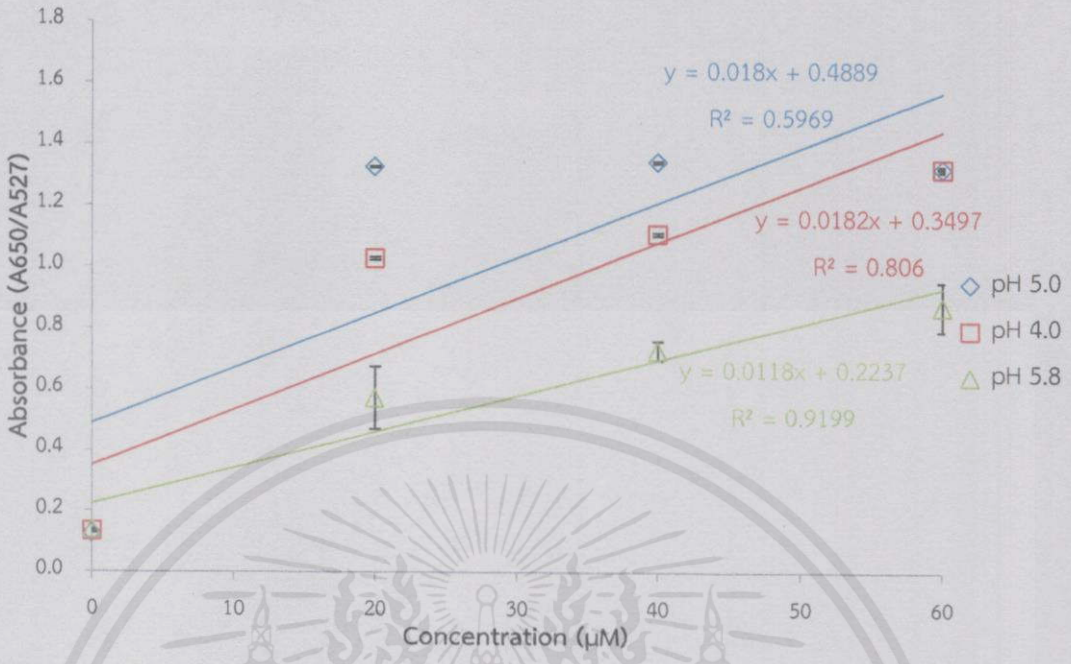
4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

4.3.1 ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการตรวจวัดซีสเทอีน

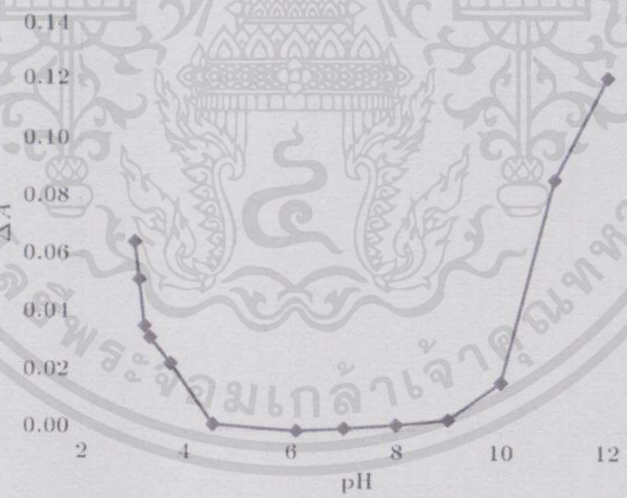
ได้ทำการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการตรวจวัดซีสเทอีนที่พีเอช 4, 5 และ 5.8 ตามลำดับซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.4

จากผลการทดลองรูปที่ 4.4 จะเห็นว่า เมื่อทำการตรวจวัดซีสเทอีนที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 60 ไมโครโมลาร์ ที่สารละลายอนุภาคทองระดับนาโนพีเอช 4, 5 และ 5.8 ตามลำดับ พบว่าที่สารละลายอนุภาคทองระดับนาโนพีเอช 5.8 ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงสูงที่สุด และเนื่องจากที่พีเอชต่ำกว่า 5 อนุภาคทองระดับนาโนจะเกิดการรวมตัวกันเองขึ้นซึ่งส่งผลต่อการตรวจวัดซีสเทอีน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานไว้ดังรูปที่ 4.5 ดังนั้นที่พีเอช 5.8 จึงเป็นพีเอชที่เหมาะสมในการตรวจวัดซีสเทอีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงที่สารละลายอนุภาคทองระดับนาโนพีเอชต่างๆ

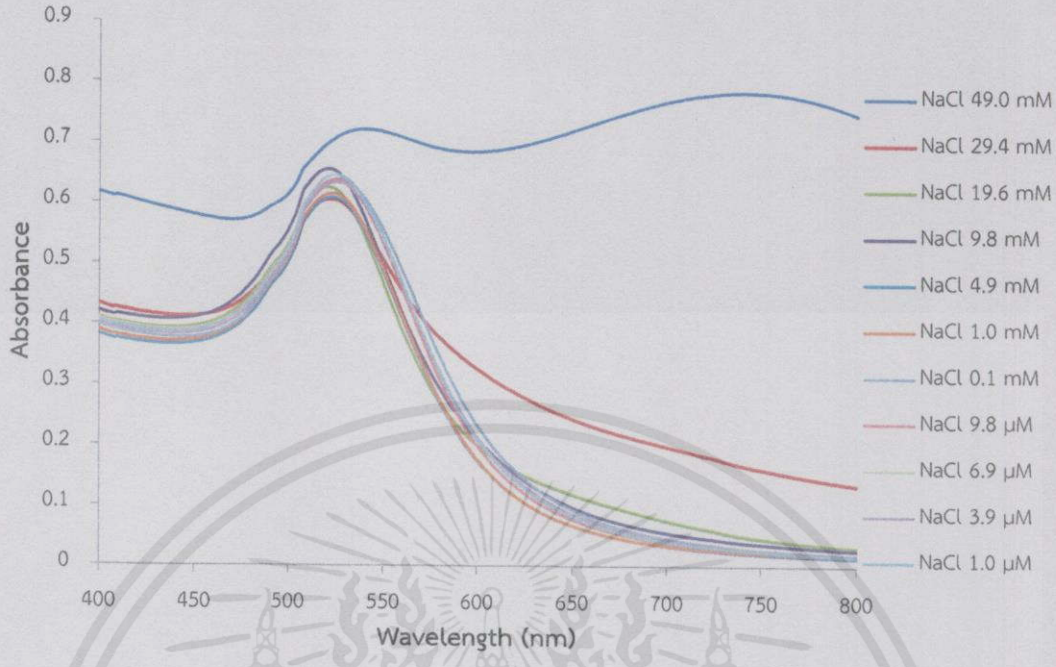


รูปที่ 4.5 แสดงการรวมตัวกันเองของอนุภาคทองระดับนาโนที่พีเอชต่างๆ [5]

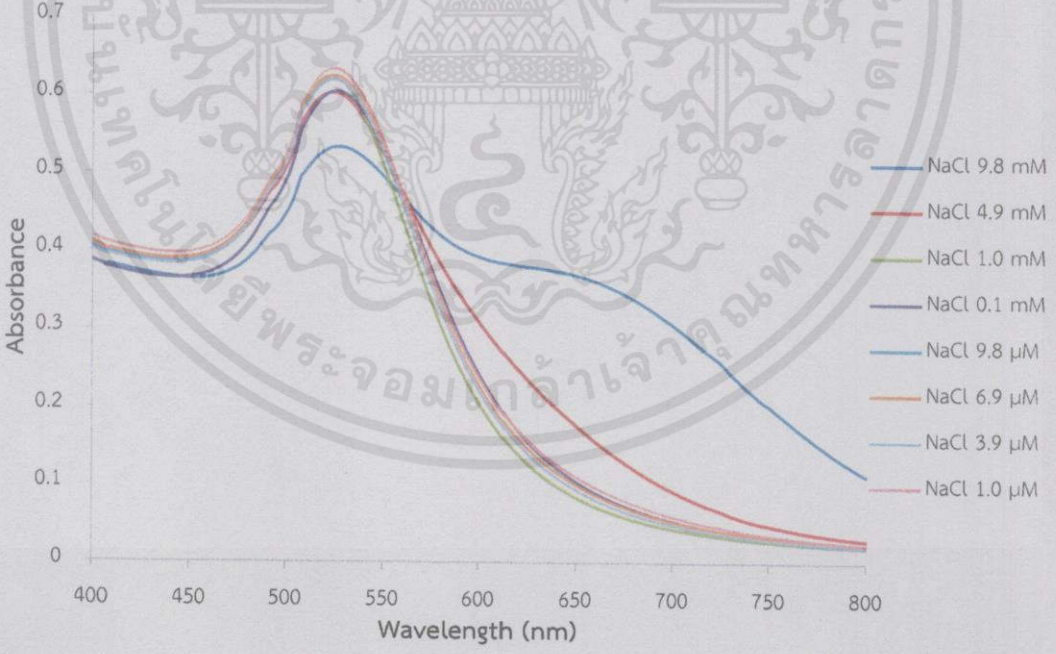
4.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการตรวจวัดซีสเทอีน

ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อขนาดของอนุภาคทองระดับนาโน และการตรวจวัดซีสเทอีนซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6 และ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อขนาดของอนุภาคทองระดับนาโน



รูปที่ 4.7 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการตรวจวัดซีสเทอีนที่ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

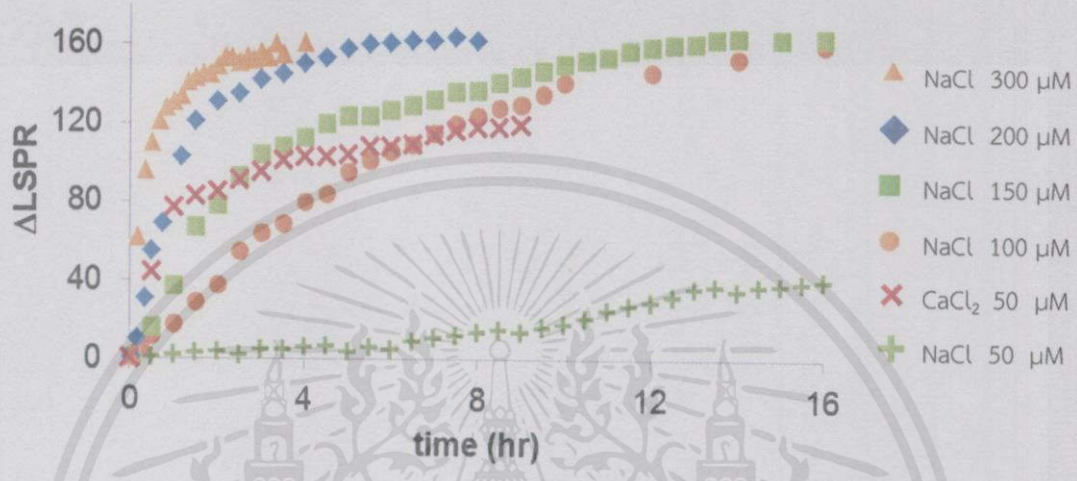
จากผลการทดลองรูปที่ 4.6 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1.0 ไมโครโมลาร์ ถึง 9.8 มิลลิโมลาร์ พบว่า ไม่เกิดการรวมตัวกันเองของอนุภาคทองระดับนาโน สังเกตจากสเปคตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นบริเวณ 650 นาโนเมตรซึ่งไม่พบการดูดกลืนแสง แต่ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 19.6 – 49.0 มิลลิโมลาร์พบว่า อนุภาคทองระดับนาโนเกิดการรวมตัวกันเองโดยปราศจากซีสเทอีน สังเกตจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นบริเวณ 650 นาโนเมตร มีค่าสูงขึ้น และจากผลการทดลองรูปที่ 4.7 พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1.0 ไมโครโมลาร์ ถึง 4.9 มิลลิโมลาร์ ไม่เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคทองระดับนาโน จึงเลือกใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ เนื่องจากไม่ทำให้อนุภาคทองระดับนาโนเกิดการรวมตัวกันเองและสามารถเหนี่ยวนำอนุภาคทองระดับนาโนและซีสเทอีนให้เกิดการรวมตัวกันได้

สาเหตุที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงๆทำให้เกิดการรวมตัวกันเองทองอนุภาคทอง เนื่องจากพื้นผิวของอนุภาคทองระดับนาโนมีไอออนของซิเตรทซึ่งเป็นประจุลบล้อมรอบอยู่ เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงๆลงไปในสารละลายจะเกิดแรงดึงดูดระหว่างไอออนลบของซิเตรทกับไอออนบวกของโซเดียมหรือเรียกว่าเกิดประจุไฟฟ้าสองชั้น (Electrical Double Layer) ดังรูปที่ 4.8 ส่งผลให้ประจุรวมบนพื้นผิวของอนุภาคทองระดับนาโนเป็นศูนย์ซึ่งเปรียบเสมือนเป็นกลางทางไฟฟ้าจึงสามารถเกิดการรวมตัวกับอนุภาคทองระดับนาโนอื่นๆได้โดยปราศจากซีสเทอีน

รูปที่ 4.8 แสดงการเกิดแรงดึงดูดระหว่างไอออนลบของซิเตรทกับไอออนบวกของโซเดียม หรือ เรียกว่า เกิดประจุไฟฟ้าสองชั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีงานวิจัย [29] ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาอิทธิพลของชนิดของเกลือโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ต่อการเกิดการรวมตัวกันเองของอนุภาคทองระดับนาโนแบบแท่ง โดยตรวจวัดผลต่างของความเข้ม LSPR ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.9



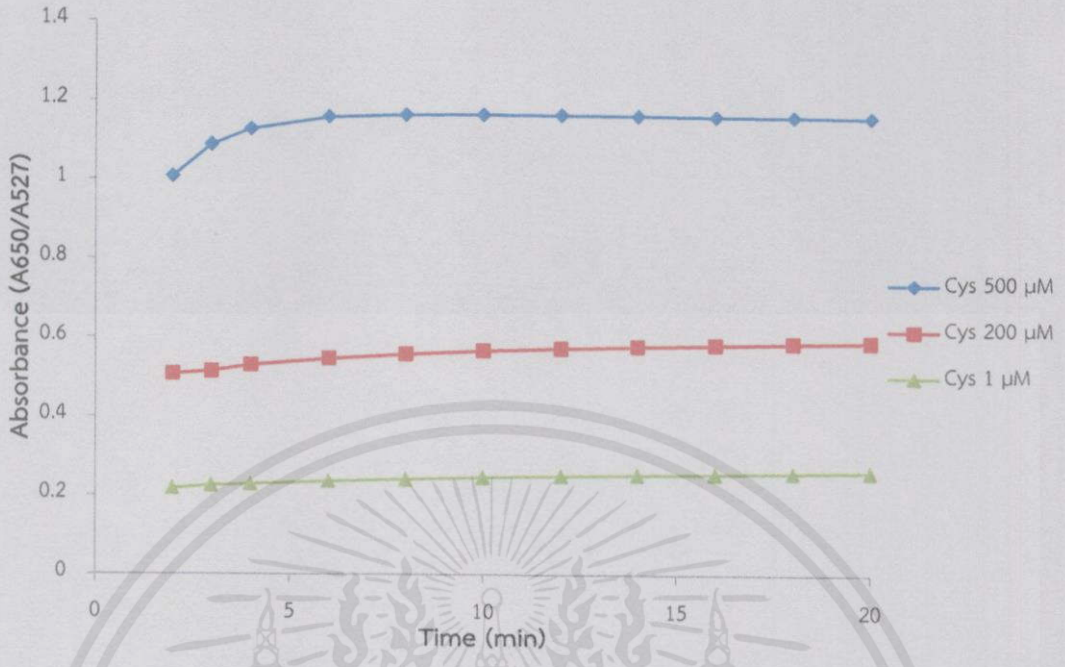
รูปที่ 4.9 แสดงผลต่างของความเข้ม LSPR ที่เวลาต่างๆ

จากผลการทดลองรูปที่ 4.9 จะเห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไปที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ไม่เกิดความแตกต่างของความเข้ม LSPR มากนัก แสดงว่าอนุภาคทองระดับนาโนแบบแท่งไม่เกิดการรวมตัวกันเองหรือเกิดน้อยมาก เมื่อเทียบกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์เท่ากัน จะเห็นความแตกต่างของความเข้ม LSPR ชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไปไม่นาน แสดงว่าอนุภาคทองระดับนาโนแบบแท่งเกิดการรวมตัวกันเอง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของเกลือเท่ากัน เกลือประจุ 2+ สามารถเหนี่ยวนำอนุภาคทองระดับนาโนให้เกิดการรวมตัวกันเองได้มากกว่าเกลือประจุ 1+

4.3.3 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการตรวจวัด

ได้ทำการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดตั้งแต่ 2 – 20 นาที โดยใช้สภาวะพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของซีสเทอีนความเข้มข้น 1, 200 และ 500 ไมโครโมลาร์ ณ เวลาต่างๆตั้งแต่ 2 – 20 นาที

จากผลการทดลองรูปที่ 4.10 พบว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 200 ไมโครโมลาร์ อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง ณ เวลาต่างๆมีค่าไม่แตกต่างกันมาก แต่ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงขึ้นจนเริ่มคงที่ที่เวลา 5 นาที ซึ่งอาจเกิดจากการที่ซีสเทอีนความเข้มข้นสูงมากๆต้องใช้เวลาในการรวมตัวกันนานขึ้น ดังนั้นที่เวลา 2 นาทีจึงรวมตัวกันยังไม่หมด แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 2 นาที และ 5 นาทีไม่แตกต่างกันมากนัก จึงเลือกที่เวลา 2 นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัด

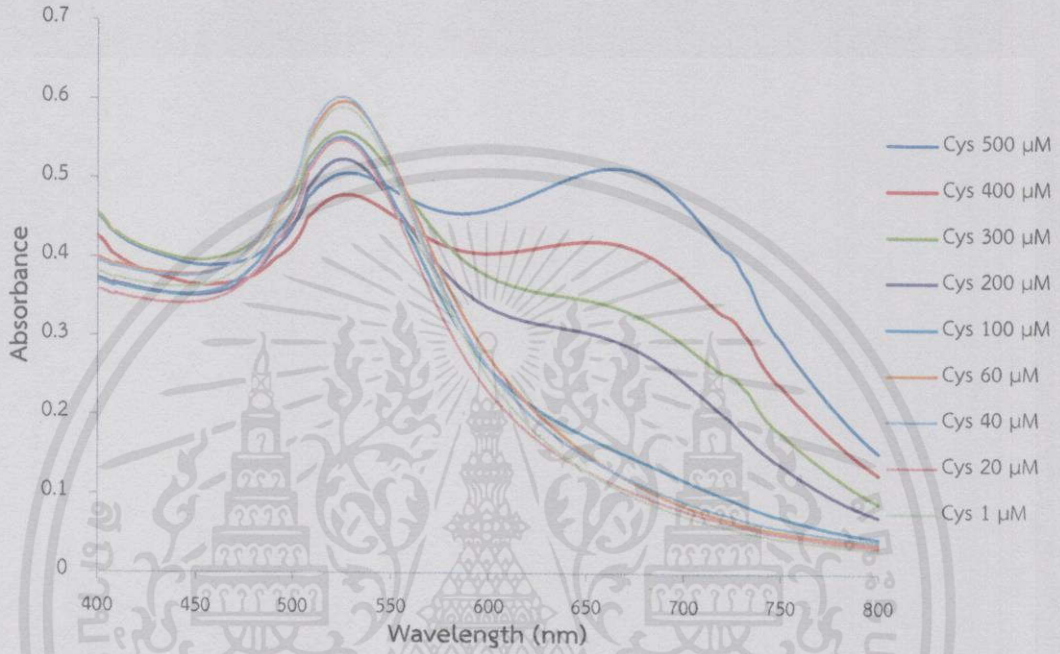
ตารางที่ 4.1 สรุปปัจจัยที่ศึกษาและสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

ปัจจัยที่ศึกษา	ช่วงที่ศึกษา	ค่าที่เลือก
พีเอช	4.0 – 5.8	5.8
ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	1 µM – 49 mM	9.8 mM
เวลา	2 – 20 min	2 min

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีน

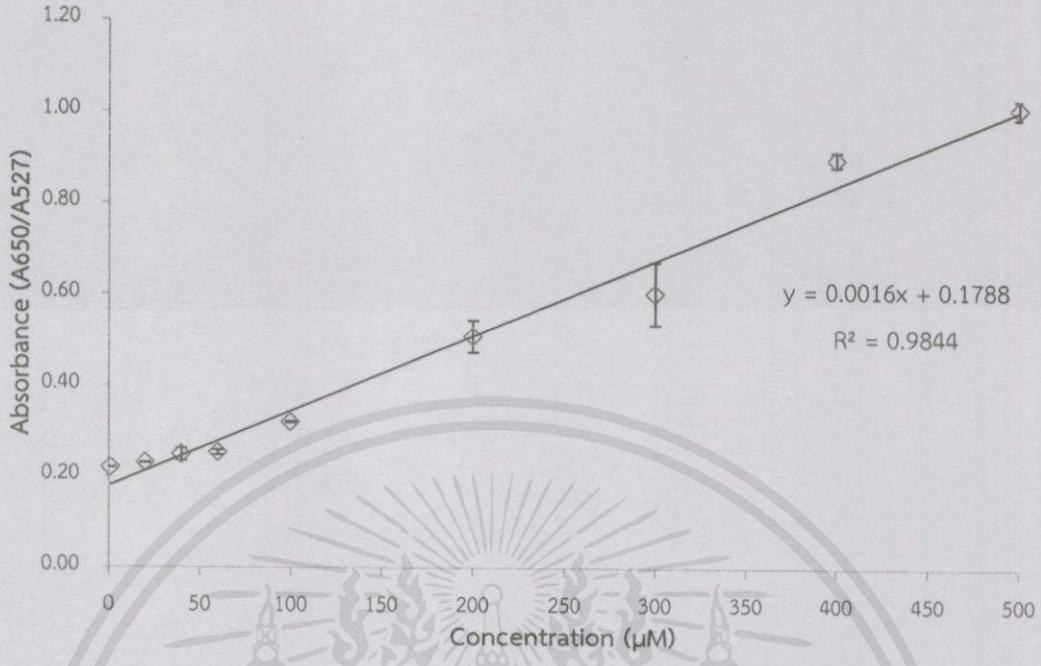
ได้ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีนภายใต้สภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงสเปคตรัมการดูดกลืนแสงของซีสเทอีนความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดลองรูปที่ 4.11 เมื่อทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของซีสเทอีนภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรมีค่าสูงขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของซีสเทอีน จากนั้นจึงนำอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 ต่อ 527 นาโนเมตร ($A_{650/527}$) และความเข้มข้นของซีสเทอีนมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีน

จากผลการทดลองรูปที่ 4.12 พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีนอยู่ในช่วง 1 – 500 ไมโครโมลาร์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9844 จึงจัดว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

4.5 การนำวิธีวิเคราะห์มาประยุกต์ใช้

4.5.1 การหาปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่างเม็ดยา

ได้ทำการประยุกต์ใช้วิธีเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่างเม็ดยา โดยทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกับการตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง ความเข้มข้นของซีสเทอีน และปริมาณซีสเทอีนในสารตัวอย่าง

ตัวอย่าง	อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง					
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ความเข้มข้นของซีสเทอีนในตัวอย่าง (μM)	ปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่าง (mg)
เม็ดยา 1	0.4996	0.3888	0.4622	0.4502	169.62	513.77
เม็ดยา 2	0.4621	0.3638	0.4472	0.4244	153.49	464.91
เม็ดยา 3	0.4256	0.4290	0.4243	0.4263	154.69	468.57
เม็ดยา 4	0.5744	0.5114	0.5918	0.5592	237.73	720.07
เม็ดยา 5	0.4921	0.5307	0.5287	0.5172	211.49	640.60
เม็ดยา 6	0.5162	0.4777	0.4390	0.4776	186.76	565.71

จากตารางที่ 4.2 ได้ทำการหาปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่าง โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำไปหาค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงทั้ง 3 ครั้งและนำไปแทนค่าในตัวแปร y ของสมการเส้นตรง และทำการหาค่า x จึงได้ความเข้มข้นของซีสเทอีนในตัวอย่าง จากนั้นนำไปคำนวณกลับเพื่อคิดเป็นปริมาณซีสเทอีนในหน่วยมิลลิกรัมต่อเม็ด ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่ 1,2,3 และ 6 มีปริมาณซีสเทอีนใกล้เคียงกับที่ระบุไว้ในฉลากซึ่งเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อเม็ด แต่ตัวอย่างที่ 4 และ 5 มีค่าสูงเกินจากฉลากไปมาก ซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนจากการเตรียมตัวอย่างหรืออาจมีการรบกวนจากองค์ประกอบอื่นๆในสารตัวอย่าง จึงได้ทำการศึกษาค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ เพื่อดูว่าองค์ประกอบอื่นๆมีการรบกวนการวิเคราะห์หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 ศึกษาค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับของสารละลายตัวอย่างเม็ดยา

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นของตัวอย่าง (μM)	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป (μM)	ความเข้มข้นของ spiked sample (μM)	ค่าการคืนกลับ (%)
เม็ดยา 1	169.62	100.00	240.88	71.26
เม็ดยา 2	153.69	100.00	240.19	86.70
เม็ดยา 3	156.69	100.00	245.01	90.32
เม็ดยา 4	237.73	200.00	427.12	94.70
เม็ดยา 5	211.69	200.00	425.51	107.01
เม็ดยา 6	186.76	200.00	414.24	113.74

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่าค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับที่คำนวณได้มีค่าใกล้เคียง 100.00 (ยกเว้นตัวอย่างเม็ดยา 1 และ 6) แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบอื่นๆในสารละลายตัวอย่างนอกจากซีส-เทอีนไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีน ดังนั้นวิธีการตรวจวัดซีสเทอีนในตัวอย่างเม็ดยานี้จึงเป็นวิธีที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนวิธีนี้ยังเป็นวิธีใหม่ที่ยังต้องมีการศึกษาในส่วนของการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้สามารถวิเคราะห์ค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับให้ดีขึ้นต่อไป

4.5.3 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ได้ทำการคำนวณขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้สมการ $\text{LOD} = \frac{3\ \text{SD of Blank}}{\text{Slope}}$ และ $\text{LOQ} = \frac{10\ \text{SD of blank}}{\text{Slope}}$ ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

	อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง			SD	LOD (μM)	LOQ (μM)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
Blank	0.1875	0.1872	0.1874	0.0001	0.20	0.66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากสารละลายแบลงค์มีสัญญาณจึงใช้สมการข้างต้นในการคำนวณหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ จากตารางที่ 4.4 พบว่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.20 ไมโครโมลาร์ และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณเท่ากับ 0.66 ไมโครโมลาร์

4.5.4 การหาความเที่ยงของวิธี

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของซีสเทอีนความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

ตารางแสดงการศึกษาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)											
ครั้งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	RSD
A650/ A527	0.55	0.56	0.51	0.58	0.60	0.61	0.52	0.53	0.51	0.56	6.49

จากตารางที่ 4.5 ได้ทำการศึกษาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของวิธีการตรวจวัด เมื่อทำการตรวจวัดซีสเทอีนที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์จำนวน 10 ครั้ง และทำการหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันเท่ากับร้อยละ 6.49 ซึ่งมีค่าไม่สูงมาก จึงจัดว่าวิธีวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถยอมรับได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการตรวจวัดซีสเทอีนโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับอนุภาคทองระดับนาโนด้วยวิธี colorimetric method โดยเริ่มจากทำการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนด้วยวิธีเทอร์คีวิช (Turkevich method) โดยใช้ไตรโซเดียมซิเตรทเป็นสารลดขนาดและรักษาเสถียรภาพของอนุภาคทองให้อยู่ในระดับนาโนเมตร และได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดซีสเทอีนคือ ค่าพีเอชของอนุภาคทองระดับนาโน ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ เวลาที่ใช้ในการตรวจวัด และช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีน

จากการสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนได้สารละลายสีไวน์แดง เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 - 800 นาโนเมตรพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่นบริเวณ 527 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของการตรวจวัดซีสเทอีนอยู่ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

สภาวะในการทดลองที่เหมาะสมคือ พีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5.8 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 2 นาทีจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วทำการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 และ 527 นาโนเมตร (A_{650}/A_{527}) กับความเข้มข้นของซีสเทอีน ผลปรากฏว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดซีสเทอีนอยู่ในช่วง 1 – 500 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9844 มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 6.49 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณเท่ากับ 0.20 และ 0.66 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ เมื่อนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่างเม็ดยา พบว่าค่าการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 71 – 113 และให้ความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ดีพอสมควร วิธีการตรวจวัดซีสเทอีนวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถตรวจวัดได้รวดเร็วและการเตรียมสารละลายต่างๆไม่ยุ่งยากเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นวิธีนี้จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาต่อยอดให้เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณซีสเทอีนที่มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองควรมีการควบคุมเวลาในแต่ละขั้นตอน เช่น การสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโน เวลาในการทำปฏิกิริยา

2. ควรวัดค่าพีเอชของน้ำปราศจากไอออนทุกครั้งที่ทำการทดลองและของอนุภาคทองระดับนาโนทุกครั้งหลังจากสังเคราะห์เสร็จและเก็บไว้ในตู้เย็นก่อนที่จะนำมาใช้ หรืออาจจะสังเคราะห์อนุภาคทองระดับนาโนคราวละมากๆเพื่อที่การทำการทดลองครั้งต่อไปเพื่อไม่เป็นการเสียเวลาในการสังเคราะห์ใหม่และสามารถลดความคลาดเคลื่อนจากการสังเคราะห์แต่ละครั้งได้อีกด้วย

3. ก่อนทำการทดลองควรนำสารเคมีมาวางทิ้งไว้ให้อยู่ในอุณหภูมิห้องทุกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] Greenclinic. 2014. **Cysteine.** [online].
Avalabile : http://www.greenclinic.in.th/cystine.html

[2] Lolikiss. 2014. **L-Cysteine.** [online].
Avalabile : http://www.lolikiss.com/index.php/product/item/9-l-cystein

[3] Sugarcane. 2012. **L-Cysteine.** [online].
Avalabile : http://healthbeauty-sugarcane.blogspot.com/2012/11/l-cyteine.html

[4] Khalil Farhadi, Mehrdad Forough, Atfeh Pourhossein, Rahim Molaei. **"Highly sensitive and selective colorimetric probe for determination of L-cysteine in aqueous media based on Ag/Pd bimetallic nanoparticles."** Sensor and Actuators B 2014 : 993-1001

[5] M.R. Hormozi-Nezhad, E. Seyedhosseini, H. Robatjazi. **"Spectrophotpmetric determination of glutathione and cysteine base on aggregation of colloidal gold nanoparticles."** Scientia Iranica 19(3) : 993-1001

[6] Qin Qin, Jingjing Deng, Dalei Wang, Lifen Yang, Ping Yu, Lanqun Mao. **"Aspartic Acid-Promoted Highly Selective and Sensitive Colorimetric Sensing of Cysteine in Rat Brin."** Anal. Chem. 2012 : 9579-9584

[7] Greenclinic. 2014. **Cysteine.** [online].
Avalabile : http://www.greenclinic.in.th/cystine.html

[8] wikipedia. 2015. **Cysteine.** [online].
Avalabile : http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine

[9] pubchem. 2015. **L-Cysteine.** [online].
Avalabile : http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lcysteine#section=Depositor-Supplied-Synonyms

[10] healthalicious 2012. **Top 10 Foods Highest in Cysteine.** [online].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Avalabile : http://www.healthaliciousness.com/articles/high-cysteine-foods.php

[11] healthalicious 2012. **healthalicious.** [online]. Avalabile : http://www.wiley-vch.de/books/sample/3527331972_c01.pdf

[12] อภิวัฒน์ ชมภูสอ. **"โครงสร้างระดับนาโนของทอง การสังเคราะห์และการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง."** ว.วิทยา. มข. 2556 41(4) : 859-872

[13] ศิริวรรณ ตี้ภู่. **"อนุภาคนาโนทอง การสังเคราะห์และการประยุกต์สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี."** J Sci Technol MSU. 2013 41(4) : 237-245

[14] อภิวัฒน์ ชมภูสอ. **"โครงสร้างระดับนาโนของทอง การสังเคราะห์และการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง."** ว.วิทยา. มข. 2556 41(4) : 859-872

[15] บทความ 2012. **นาโนเทคโนโลยี.** [online]. Avalabile : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2552/aphys0852pp_ch2.pdf

[16] มหาวิทยาลัยขอนแก่น. **"การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในดินด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอพชันสเปคโทรสโกปี."** [online]. Avalabile : https://app.enit.kku.ac.th/mis/administrator/doc_upload/ 20100309150144.pdf

[17] ยุพา ชาญวิกรัย, ดร.นพ. ประสงค์ เทียนบุญ. **"เมลามีน (Melamine)."** Thai Journal of Clinical Nutrition (TJCN) 2010 : 4(2)

[18] สถาบันนวัตกรรมพัฒนากระบวนการเรียนรู้ 2558. **เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์.** [online]. Avalabile : http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_3.html

[19] จินดา บถญวัฒนา 2558. **UV-Visible spectrophotometer.** [online]. Avalabile : http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/component/k2/item/140-uv-visible-spectrophotometer.html

[20] Suriyapha Jongjinakool, Khwankhao Palasak, Natvara Bousod, Siriwan Teepoo. **"Gold nanoparticle-based colorimetric sensor for cysteine detection."** Energy Procedia 2014 : 10 – 18

[21] Xiaoyi Wei, Li Qi, Junjun Tan, Ruigang Liu, Fuyi Wang. **"A colorimetric sensor for determination of cysteine by carboxymethyl cellulose-functionalized gold nanoparticles."** Analytica Chimica Acta 2010 : 80–84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[22] Qin Qin, Jingjing Deng, Dalei Wang, Lifen Yang, Ping Yu, Lanqun Mao. **"Aspartic Acid-Promoted Highly Selective and Sensitive Colorimetric Sensing of Cysteine in Rat Brin."** Anal. Chem. 2012 : 9579-9584

[23] Suriyapha Jongjinakool, Khwankhao Palasak, Natvara Bousod, Siriwan Teepoo. **"Gold nanoparticles-based colorimetric sensor for cysteine detection."** Energy Procedia 56 (2014) 10 – 18

[24] WANG Xueji, ZHANG LiLi, MIAO LiXiao, KN MeiXiu, KONG LinLin&ZHANG HuiMin. **"Oxidation and detection of L-cysteine using a modified Au/Nafion/glass carbon electrode."** Sci China Chem 2011 : 521-525

[25] Jian Wang, Yuan Fang Li, Cheng Zhi Huang, Tong Wu. **"Rapid and selective detection of cysteine based on its induce aggregates of cetylmethylammonium bromide capped gold nanoparticles."** Analytica Chimica Acta 2008 : 37–43

[26] Li Li and Baoxin Li. **"Sensitive and selective detection of cysteine using gold nanoparticles as colorimetric probes."** Analyst 2009 : 134, 1361–1365

[27] Zhang Chen, Shenglian Luo, Chengbin Liu, Qingyun Cai. **"Simple and sensitive colorimetric detection of cysteine based on ssDNA-stabilized gold nanoparticles."** Anal Bioanal Chem 2009 : 489–494

[28] M.R. Hormozi-Nezhad, E. Seyedhosseini, H. Robatjazi. **"Spectrophotpmetric determination of glutathione and cysteine base on aggregation of colloidal gold nanoparticles."** Scientia Iranica 19(3) : 993-1001

[29] Kun Liu, Cristina Resetco, and Eugenia Kumacheva. **"Salt-Mediated Kinetics of the Self-Assembly of Gold Nanorods End-Tethered with Polymer Ligands."** Electronic Supplementary Material 2012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานซีสเทอีนที่พีเอช 4

[Cys] (μM)	A527			A650			A650/A527			SD
	1st	2nd	avg.	1st	2nd	avg.	1st	2nd	avg.	
Blank	0.5042	0.5042	0.5042	0.0649	0.0649	0.0649	0.1287	0.1287	0.1287	0.0000
20	0.2392	0.2134	0.2263	0.3255	0.2912	0.3084	1.3608	1.3646	1.3627	0.0027
40	0.2072	0.2190	0.2131	0.2819	0.2992	0.2906	1.3605	1.3662	1.3634	0.0040
60	0.2039	0.2147	0.2093	0.2789	0.2908	0.2849	1.3678	1.3544	1.3611	0.0095

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานซีสเทอีนที่พีเอช 5

[Cys] (μM)	A527			A650			A650/A527			SD
	1st	2nd	avg.	1st	2nd	avg.	1st	2nd	avg.	
Blank	0.5847	0.5847	0.5847	0.0743	0.0743	0.0743	0.1271	0.1271	0.1271	0.0000
20	0.4030	0.3968	0.3999	0.5363	0.5256	0.5310	1.3308	1.3246	1.3277	0.0044
40	0.4117	0.4112	0.4115	0.5488	0.5514	0.5501	1.3330	1.3410	1.3370	0.0056
60	0.3730	0.4221	0.3976	0.4932	0.5572	0.5252	1.3223	1.3201	1.3212	0.0015

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานซีสเทอีนที่พีเอช 5.8

[Cys] (μM)	A527			A650			A650/A527			SD
	1st	2nd	avg.	1st	2nd	avg.	1st	2nd	avg.	
Blank	0.6525	0.6525	0.6525	0.0905	0.0905	0.0905	0.1387	0.1387	0.1387	0.0000
20	0.5370	0.5490	0.5430	0.3838	0.3132	0.3485	0.7147	0.5705	0.6426	0.1020
40	0.5456	0.5440	0.5448	0.4198	0.3948	0.4073	0.7694	0.7257	0.7476	0.0309
60	0.5035	0.5005	0.5020	0.4951	0.4359	0.4655	0.9833	0.8709	0.9271	0.0795

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานซีสเทอีนเข้มข้น 1, 200 และ 500 ไมโครโมลาร์ที่เวลาต่างๆ

[Cys]	Time (min)										
(μM)	2	3	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1	0.2180	0.2255	0.2293	0.2367	0.2417	0.2463	0.2503	0.2532	0.2556	0.2587	0.2612
200	0.5080	0.5144	0.5304	0.5468	0.5584	0.5671	0.5733	0.5785	0.5826	0.5865	0.5895
500	1.007	1.088	1.127	1.1581	1.1639	1.1646	1.1633	1.1622	1.1599	1.159	1.1571

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานซีสเทอีน

[Cys]	A527				A650				A650/A527				SD
(μM)	1st	2nd	3rd	avg.	1st	2nd	3rd	avg.	1st	2nd	3rd	avg.	
Blank	0.5964	0.5960	0.5962	0.5962	0.1118	0.1116	0.1117	0.1117	0.1875	0.1872	0.1874	0.1874	0.0001
1	0.5887	0.5818	0.5912	0.5872	0.1291	0.1278	0.1289	0.1286	0.2193	0.2197	0.2180	0.2190	0.0009
20	0.5463	0.5946	0.5871	0.5760	0.1296	0.1417	0.1255	0.1323	0.2372	0.2383	0.2138	0.2298	0.0139
40	0.6016	0.6021	0.5820	0.5952	0.1478	0.1532	0.1419	0.1476	0.2457	0.2544	0.2438	0.2480	0.0057
60	0.5962	0.5859	0.5718	0.5846	0.1513	0.1491	0.1435	0.1480	0.2538	0.2545	0.2510	0.2531	0.0019
100	0.5502	0.5491	0.5327	0.5440	0.1730	0.1958	0.1531	0.1740	0.3144	0.3566	0.2874	0.3195	0.0349
200	0.5230	0.5304	0.5149	0.5228	0.3049	0.2370	0.2544	0.2654	0.5830	0.4468	0.4941	0.5080	0.0691
300	0.5576	0.5538	0.5631	0.5582	0.3458	0.3316	0.3317	0.3364	0.6202	0.5988	0.5891	0.6027	0.0159
400	0.4784	0.4790	0.4679	0.4751	0.4203	0.4272	0.4296	0.4257	0.8786	0.8919	0.9181	0.8962	0.0201
500	0.5057	0.4924	0.4926	0.4969	0.5076	0.4992	0.4947	0.5005	1.0038	1.0138	1.0043	1.0073	0.0057

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างและ spiked sample

	A527				A650				A650/A527				SD
	1st	2nd	3rd	avg.	1st	2nd	3rd	avg.	1st	2nd	3rd	avg.	
sample1	0.5691	0.5414	0.5251	0.5452	0.2843	0.2105	0.2427	0.2458	0.4996	0.3888	0.4622	0.4502	0.0563
sample2	0.5717	0.5783	0.5613	0.5704	0.2642	0.2104	0.2510	0.2419	0.4621	0.3638	0.4472	0.4244	0.0530
sample3	0.5059	0.5030	0.5517	0.5202	0.2153	0.2158	0.2341	0.2217	0.4256	0.4290	0.4243	0.4263	0.0024
sample4	0.5131	0.5108	0.5061	0.5100	0.2947	0.2612	0.2995	0.2851	0.5744	0.5114	0.5918	0.5592	0.0423
sample5	0.5371	0.5630	0.5638	0.5546	0.2643	0.2988	0.2981	0.2871	0.4921	0.5307	0.5287	0.5172	0.0218
sample6	0.5411	0.5430	0.5449	0.5430	0.2793	0.2594	0.2392	0.2593	0.5162	0.4777	0.4390	0.4776	0.0386
spiked1	0.5279	0.5066	0.5005	0.5117	0.2623	0.2924	0.3096	0.2881	0.4969	0.5772	0.6186	0.5642	0.0619
spiked2	0.5150	0.5088	0.5388	0.5209	0.2985	0.2901	0.2907	0.2931	0.5796	0.5702	0.5395	0.5631	0.0210
spiked3	0.5432	0.5386	0.5594	0.5471	0.2876	0.3255	0.3237	0.3123	0.5295	0.6043	0.5787	0.5708	0.0381
spiked4	0.4524	0.4638	0.4826	0.4663	0.4149	0.4016	0.3878	0.4014	0.9171	0.8659	0.8036	0.8622	0.0569
spiked5	0.4558	0.4803	0.4592	0.4651	0.3775	0.4144	0.4077	0.3999	0.8282	0.8628	0.8878	0.8596	0.0299
spiked6	0.4980	0.4866	0.4712	0.4853	0.4068	0.4245	0.3937	0.4083	0.8169	0.8724	0.8355	0.8416	0.0282

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

จาก $\frac{g}{MW} = \frac{CV}{1000}$

ฉลากระบุปริมาณซีสเทอีน 500.00 มิลลิกรัม หรือเท่ากับ 0.5 กรัม แทนในตัวแปร g

น้ำหนักโมเลกุลของซีสเทอีนเท่ากับ 121.16 กรัมต่อโมล แทนในตัวแปร MW

ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเท่ากับ 25 มิลลิลิตร แทนในตัวแปร V

จะได้ $\frac{0.5}{121.16} = \frac{C \times (25)}{1000}$

C = 0.165 โมลาร์ หรือเท่ากับ 165,000.00 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณซีสเทอีนในตัวอย่าง

$$\text{จาก } \frac{g}{MW} = \frac{CV}{1000}$$

ความเข้มข้นของซีสเทอีนในตัวอย่างที่ 1 เท่ากับ 169.62 ไมโครโมลาร์

สารตัวอย่างเจือจาง 1000 เท่า ดังนั้นความเข้มข้นของซีสเทอีนในตัวอย่างเท่ากับ 169,620.00 ไมโครโมลาร์ หรือเท่ากับ 0.16962 โมลาร์ แทนในตัวแปร C

ปริมาตรของสารตัวอย่างเท่ากับ 25 มิลลิลิตร แทนในตัวแปร V

น้ำหนักโมเลกุลของซีสเทอีนเท่ากับ 121.16 กรัมต่อโมล แทนในตัวแปร MW

$$\text{จะได้ } \frac{g}{121.16} = \frac{(0.16962) \times (25)}{1000}$$

g = 0.51377 กรัม หรือเท่ากับ 513.77 มิลลิกรัม

ตัวอย่างการคำนวณค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ

$$\text{จาก \% Recovery} = \frac{[\text{Spiked}] - [\text{Sample}]}{[\text{Standard}]} \times 100$$

ความเข้มข้นของซีสเทอีกในตัวอย่างที่ 1 เท่ากับ 169.62 ไมโครโมลาร์ แทนในตัวแปร [Sample]

ความเข้มข้นของ spiked sample ขวดที่ 1 เท่ากับ 240.88 ไมโครโมลาร์ แทนในตัวแปร [Spiked]

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซีสเทอีนที่เติมลงไปเท่ากับ 100.00 ไมโครโมลาร์

แทนในตัวแปร [Standard]

$$\text{จะได้ \% Recovery} = \frac{240.88 - 169.62}{100.00} \times 100$$

% Recovery = 71.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Scientia Iranica F (2012) 19 (3), 958–963

SCIENTIA IRANICA

Sharif University of Technology

Scientia Iranica

Transactions F: Nanotechnology

www.sciencedirect.com

Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles

M.R. Hormozi-Nezhad [a,b,*], E. Seyedhosseini [a], H. Robatjazi [a]

[a] *Department of Chemistry, Sharif University of Technology, Tehran, 11155-9516, Iran*

[b] *Institute for Nanoscience and Nanotechnology, Sharif University of Technology, Tehran, Iran*

Received 29 January 2012; revised 21 February 2012; accepted 21 April 2012

KEYWORDS

Gold nanoparticle;
Amino acids;
Cysteine;
Glutathione;
Colorimetric detection.

Abstract We report herein the development of a highly sensitive colorimetric method for the determination of cysteine and glutathione, based on aggregation of the citrate capped gold nanoparticles (Au NPs). This was exploited from high affinity of low-molecular-weight aminothiols towards the Au NPs surface, which could induce displacement of the citrate shell by the thiolate shell of target molecules, resulting in aggregation of the NPs through intermolecular electrostatic interaction or hydrogen-bonding. As a result of aggregation, which can be affected by the ionic strength, pH and concentration of Au NPs, the plasmon band at around 521 nm decreases gradually, along with formation of a new red shifted band. The calibration curves, which are derived from the intensity ratios of absorbance at-640 nm and 650 nm for cysteine and glutathione, respectively, to the original wavelength of 521 nm, display a linear relation in the range of 1×10^{-6}–100×10^{-6} M cysteine and 5×10^{-6}–200×10^{-6} M glutathione. The obtained detection limits (3σ) were 2.1×10^{-6} M and 3.3×10^{-6} M for determination of cysteine and glutathione, respectively.

© 2012 Sharif University of Technology. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The determination of low-molecular-weight aminothiol based biological molecules, such as cysteine (Cys) and glutathione (GSH) (Scheme 1), in human plasma are becoming increasingly important, due to exploration of their crucial role in many biological pathways. Cysteine is sulfur containing non-essential amino acids, which is critical to the metabolism of a number of essential biochemicals, including coenzyme A, heparin, biotin, and glutathione. The tripeptide glutathione (GSH), a master antioxidant which is supplied by the cysteine, is the main intracellular defence against oxidative stress, in addition to regulating the action of antioxidants, such as vitamins C and E, in the body. Recent studies have shown the significant contribution of cysteine and glutathione in HIV, diabetes, liver damage, heart diseases, mild cognitive impairment, edema, pneumonia, skin lesions and other serious diseases [1–11]. Therefore, it is very important to find a sensitive, accurate and simple method for the measurement of cysteine and glutathione.

The majority of the currently available methods relating to the detection of cysteine and glutathione are based on electrochemical, immunoassay and chromatography techniques that benefit from derivatization with chromophores or fluorophores, or often carried out in conjunction with HPLC, GC, MS and capillary electrophoresis [12–23]. Although these methods can well sense aminothiols, their practical applications are limited because of suffering from some inherent drawbacks, such as requiring complicated instrumentation, expensive biological reagents or cumbersome sample preparation.

Gold nanoparticles (Au NPs) have received great attention for potential biological analysis, in recent years, due to the Surface Plasmon (SP) resonance phenomena, which is responsible for their unique size and shape optical dependant properties [24,25]. Having high order of magnitude for extinction coefficients, in addition to the dependence of surface plasmon resonance wavelength and intensity on the dialectric constant

* Corresponding author at: Department of Chemistry, Sharif University of Technology, Tehran, 11155-9516, Iran.

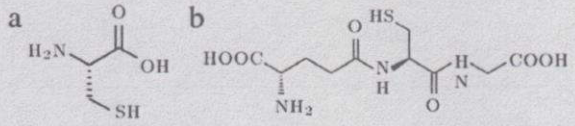
E-mail address: hormozi@sharif.edu (M.R. Hormozi-Nezhad).

Peer review under responsibility of Sharif University of Technology.

Production and hosting by Elsevier

1026-3098 © 2012 Sharif University of Technology. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.scient.2012.04.018



Scheme 1: Schematic illustration of the structures of (a) cysteine, and (b) glutathione.

of the medium, Au NPs are emerging as a promising tool for analysis of biologically active molecules through colorimetric assay [26–28].

Herein, we have developed a simple and highly sensitive colorimetric method for detection of both cysteine and glutathione based on the aggregation size-dependent optical property of citrate capped spherical Au NPs, through employing the strong affinity characteristics of the thiol group towards the surface of the Au NPs. The effects of affecting parameters, including concentration of NPs, ion strength and pH, have been investigated to find the optimized condition, with highest sensitivity and selectivity.

2. Reagent and apparatus

Thiol-containing amino acids, cystine (Cys, 97%) and glutathione (Glu, 98%), and all other chemicals, such as hydrogen tetra-chloroaurate ($HAuCl_4$, 99%), sodium citrate (99%), were purchased from Merck and were used without further purification. For the preparation of all samples, water purified with cartridges from Millipore (Milli-Q) to a resistivity of 18 MΩ was used. UV–vis spectroscopy was performed on a Lambda 25 (Perkin-Elmer, USA) spectrophotometer with the use of a 1.0 cm glass cell. Measurements of pH were made with a Denver Instrument Model of 270 pH meter equipped with a Metrohm glass electrode. Size distributions of the particles were obtained using Zetasizer Viscotec 802 at ambient temperature. Transmission Electron Microscopy (TEM) images were recorded with a PHILIPS MC 10 TH microscope at an acceleration voltage of 100 KV.

3. Experimental

3.1. Procedure for preparation of Au NPs

Citrate-capped Au NPs with an average diameter of about 13.1 ± 1.3 nm were synthesized following the method pioneered by Turkevich et al. [29,30] in which a 50 mL solution containing 1 mM of $HAuCl_4$ was prepared and heated under reflux. At the boiling point, 5 mL of 38.8 mM trisodium citrate were added to this solution under vigorous stirring and the mixture was heated under reflux for an additional 30 min during which the color changed to deep red, indicating the formation of Au NPs. The solution was set aside to cool to room temperature and stored at 4 °C for further utilization. The particle concentration at the resulted solutions was estimated to be 15 nM, according to Beer's law, and the extinction coefficient (ε) of about 13 nm Au NPs at 520 nm [31].

3.2. Procedure for determination of cysteine and glutathione

For the determination of cysteine, the solutions containing 2 mL of as-prepared Au NPs and 8 mL of Milli-Q water were prepared in volumetric flasks. To these solutions, 100 μL of 1.0 M NaCl and different concentrations of cysteine were added, one by one in order. For the determination of glutathione, the same procedure was performed on a mixture containing 1 mL of synthesized Au NPs and 9 mL of Milli-Q water, with pH adjusted at 4.7 by 0.1 M of HCl. The absorbance spectra were recorded at 3 min intervals, shortly after adding the analytes. It should be noted that the order of the addition of the reagents is very important. Alteration of the order of the addition of reagents causes inaccurate results, with a low level of reproducibility.

4. Results and discussions

Thiol-containing amino acid molecules have high affinity towards the surface of gold nanoparticles that can be finely described by the hard–soft acid-base theory [32]. Displacement of the citrate group shell with thiol-containing amino acids, such as cysteine and glutathione, induces the aggregation process, due to the hydrogen binding or electrostatic interaction between non-covalently adsorbed thiol-containing amino acids. As a result of the aggregation, the surface plasmon resonance absorption of Au NPs around 521 nm decreases, along with formation of a new band at longer wavelength. This is due to the near-field coupling in the resonant wavelength peak of the interacting particles [33]. Figure 1 displays typical TEM and DLS images and corresponding UV–vis absorption spectra of Au NPs, before and upon the addition of certain quantities of cysteine in appropriate ion strength. This clearly shows the effect of aggregation on surface plasmon maxima, size and optical properties of the Au NPs.

To establish the optimum analytical conditions for detection of cysteine and glutathione, the effects of critical parameters, including ion strength, pH and concentration of Au NPs, have been investigated.

4.1. Effect of ion strength

Ion strength has a crucial role in the aggregation process that can be attributed to the ability of strong electrolytes to constrict the aroused electrical double-layer from the capping agent. We observed that in the absence of strong electrolytes (low ion strength), Au NPs did not undergo the aggregation, even at the high concentration of cysteine or glutathione (Figure 2). Also, it is found that by increasing the ion strength above a certain limit, the aggregation of nanoparticles induces even in the absence of analytes. Therefore, some controlled experiments were conducted that have revealed the concentration of 10 mM of NaCl as optimized in which there is aggregation not in the absence, but only in the presence of our target analytes.

4.2. Effect of pH

Because of the presence of hydroxyl, carboxyl and amine groups in cysteine and glutathione, pH is another critical parameter that should be taken into consideration. As shown in Scheme 2 (a), electrostatic interactions are the mainly responsible for aggregation of Au NPs in the presence of cysteine. With this in mind, to increase the possibility of electrostatic interaction, the best condition is attainable in which the cysteine molecule is available in the form of zwitterions. This also could be confirmed based on the stock diagram of cysteine in which the zwitterion form has a greater contribution in the range of pH = 3–pH = 7 [34]. As shown in Figure 3, the synthesized Au NPs are stable in the range of pH of 4.5 and 10. Therefore, further adjustment of pH was eliminated in the case of cysteine. Based on the fact that the initial pH of synthesized Au NPs is found to be about 6.

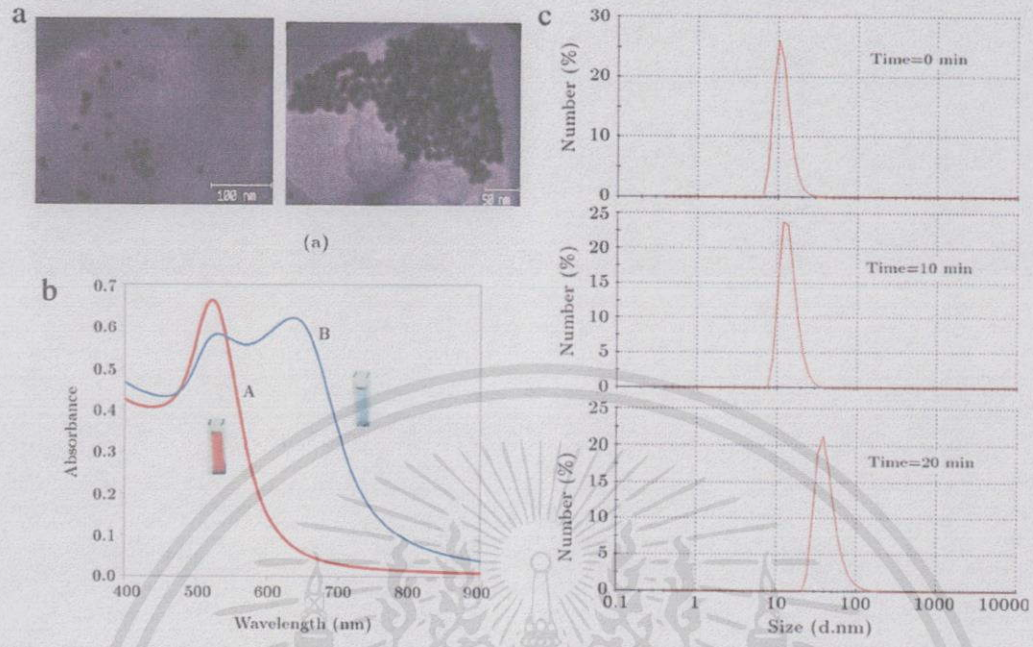
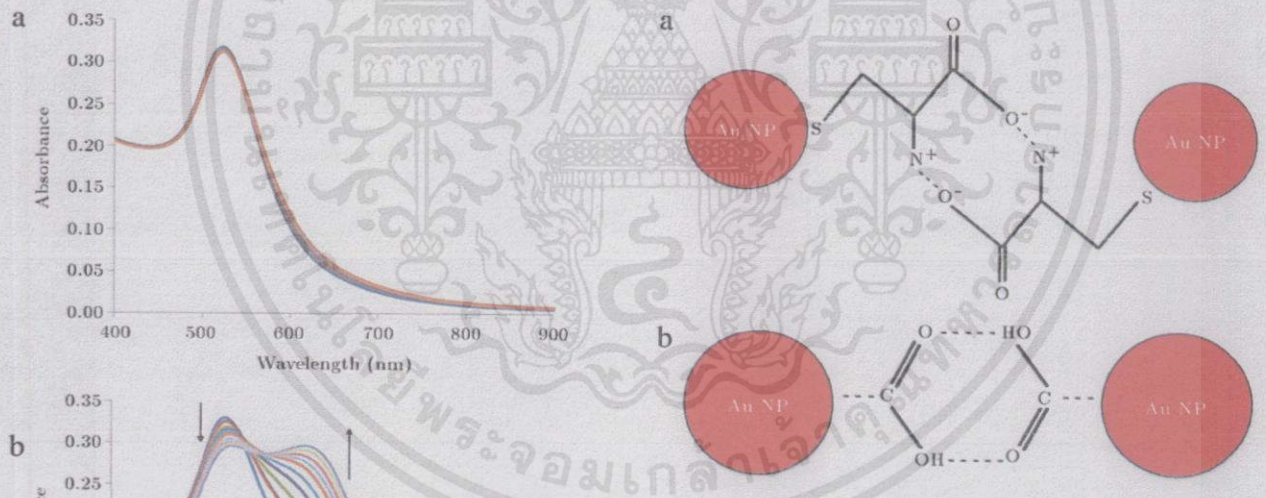


Figure 1: (a) Typical TEM images; (b) corresponding UV–vis absorption spectra; and (c) size distribution of the Au NPs before and upon the addition of certain quantity of cysteine.



Scheme 2: Schematic illustration of the aggregation mechanism for (a) cysteine, and (b) glutathione.

Figure 2: Variation in the surface plasmon maxima of Au NPs in the presence of 10 μM cysteine (a) in the absence of NaCl, and (b) upon the addition of 100 μL of 10 mM NaCl (time interval to record each spectrum is 3 min).

The aggregation mechanism for glutathione (Scheme 2(b)) benefits from a hydrogen bonding strategy, which demands a very precise view over the controlling of pH. We found, in the case of glutathione, no aggregation could be induced at the initial pH of the synthesized Au NPs (pH 6). This can be ascribed to the electrostatic repulsion between negatively charged carboxylic groups in the forms of zwitterions ($NH_3^+/COO^-/SH/COO^-$) and negatively charged citrate shells. However, by adjusting pH at acidic environment at which the carboxylic groups have their protonated form, the aggregation could be induced. We also investigated the anti-aggregation process for glutathione in which the color and corresponding UV–vis absorption spectra of the aggregated solution of glutathione–Au NPs were restored to the initial state, upon increasing the pH at 40 °C (Figure 4), due to the weaker hydrogen bonding interactions. This further confirmed contribution of hydrogen bonding regarding aggregation of Au NPs in the presence of

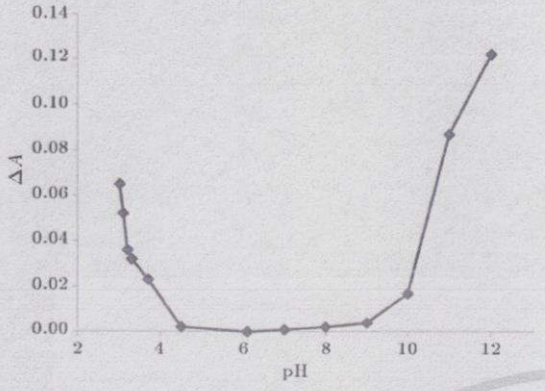


Figure 3: Effect of pH on the self-aggregation of Au NPs in the absence of analytes.

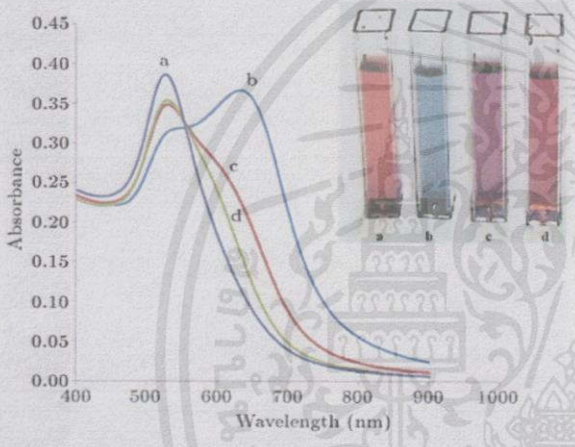


Figure 4: Anti-aggregation of the glutathione-induced aggregated Au NPs by increasing the pH at 40 °C. (a) Au NPs at pH = 6; (b) aggregated particles at pH = 6.0; (c) at pH = 7.0; and (d) at pH = 9.0.

glutathione. Hence, by considering the fact that Au NPs are not stable at a pH below 4.5, we proposed pH 4.7 for further experiments relating to the determination of glutathione.

4.3. Effect of concentration of Au NPs

To further optimize the sensitivity and selectivity of the method, we investigated the effect of the concentration of Au NPs on the aggregation process in the presence of 10 μM cysteine and 10 mM NaCl. As shown in Figure 5(a), for cysteine, the rate of aggregation increases with an increase in the concentration of NPs. However, higher concentrations of gold nanoparticles suffer from a limited linear range of detection. Therefore, based on the preliminary experiments, a concentration of 3 nM of the NPs at the final solution was selected for further experiments, which benefits from both acceptable linear range and reasonable time to complete the detection process. However, the obtained results for glutathione have revealed a decrease in the rate of aggregation by increasing the concentration of nanoparticles as shown in Figure 5(b). Herein, the concentration of 1.5 nM was selected for further measurements.

4.4. Analytical figures of merit

The linear ranges for determination of cyeteine and glutathione were evaluated under their optimum conditions.

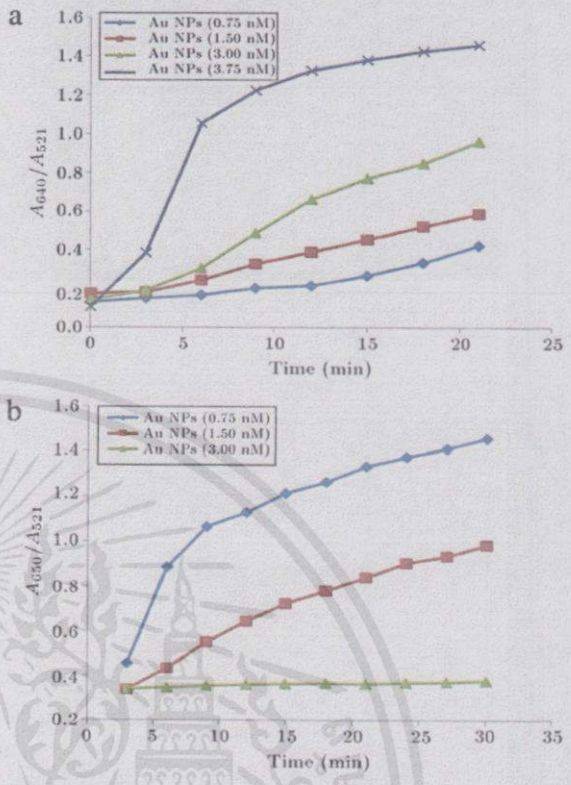


Figure 5: Effect of NPs concentration on aggregation rate in the presence of (a) 10 μM of cysteine, and (b) 20 μM of glutathione.

Figure 6(a) shows a linear relation between the ratio of A_{640}/A_{521} and concentration of cysteine in the range of 1.0–100 μM. For glutathione, a linear range could be achieved between the ratio of A_{650}/A_{521} and concentration of 5–200 μM (Figure 6(b)). The lower limit of detection for determination of cyeteine and glutathione at a signal-to-noise ratio of 3 (3σ) were 2.1 μM and 3.3 μM, respectively. The study of precision, which was made with five independent experiments, revealed relative standard deviations (% RSD) of 1.8% and 4.1% for determination of 10 and 20 μM of cysteine and glutathione, respectively.

4.5. Interference study

To assess the selectivity of the proposed method, an analysis of a standard solution of cysteine (10 μM) and glutathione (20 μM) were independently conducted, under their optimum conditions and in the presence of foreign metal ions and amino acids, with the possibility of interference. As shown in Figure 7, a wide range of presented species do not interfere, even at concentrations 50 times higher than those of the analytes.

4.6. Real sample analysis

The optimized method was applied for the determination of cysteine and glutathione in Ringer's serum as a real sample. Certain amounts of cysteine and glutathione were independently spiked into the real samples, and subsequently their concentrations were determined in each sample. The results given in Table 1 show the potential and feasibility of the developed method for determination of cysteine and glutathione in the real samples. It should be noted that

สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงแหล่งที่มาทุกครั้ง

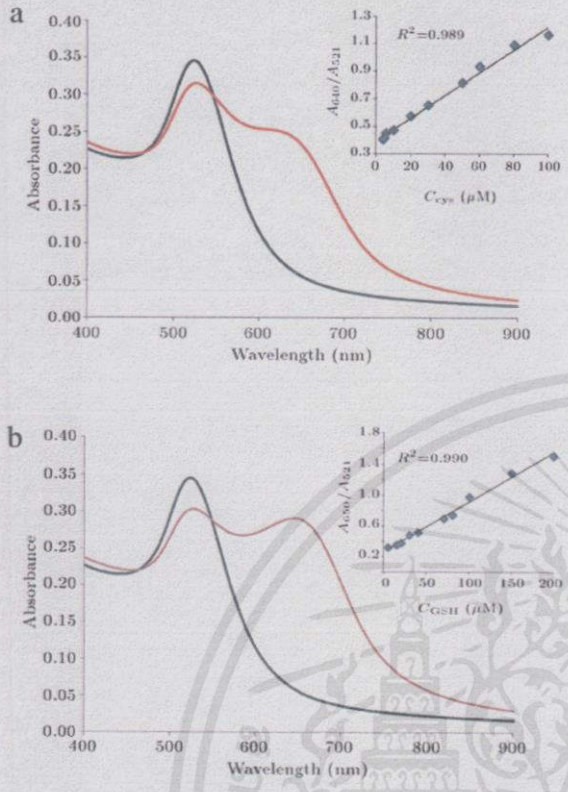


Figure 6: A typical absorption spectra of Au NPs upon adding certain quantity of (a) cysteine, and (b) glutathione (the insets are corresponding calibration curve in the ranges of 1–100 μM and 5–200 μM for cysteine and glutathione, respectively).

Table 1: Determination of cysteine and glutathione in Ringer's serum.

Analyte	Spiked (μM)	Measured (μM)	Recovery %
Cysteine	30	32.35	108
	50	52.29	104
	70	73.10	104
Glutathione	15	16.2	108
	50	51.25	102
	170	174.13	102

Table 2: Determination of cysteine in the presence of glutathione.

Glutathione (μM)	Spiked cysteine (μM)	Measured cysteine (μM)	Recovery (cysteine) %
200	10	9.6	96
200	15	15.68	104
200	20	20.36	102
200	30	29.4	98

glutathione is usually considered the most predominant interference for determination of cysteine. Therefore, some experiments were conducted in order to determine cysteine in the presence of glutathione. For this purpose, different quantities of cysteine were spiked into the solution of the ringer serum containing 200 μM of glutathione. It is found that by controlling pH at 6.0 in which the glutathione molecules could not affect the aggregation process, the cysteine quantity could be measured with an acceptable recovery percentage as shown in Table 2.

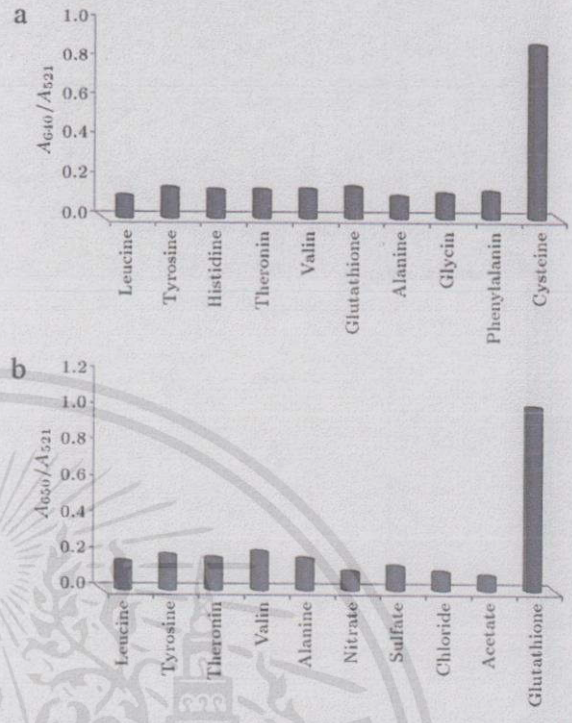


Figure 7: The interference study for (a) 10 μM of cysteine (at pH 6.0), and (b) 20 μM of glutathione (at pH 4.7) in the presence of interfering species with concentration of 50 times higher than those of analytes.

5. Conclusion

In summary, the potential and feasibility of Au NPs for the colorimetric determination of cysteine and glutathione have been demonstrated. The developed methodology, based on analyte-induced aggregation of NPs, could achieve a quantification limit at low levels, and good linearity, accompanied by acceptable accuracy and reproducibility, permitting determination of cysteine and glutathione in the ringer serum. There are further developments to investigate its clinical potential for determination of trace amounts of other targets of interest in biological samples.

Acknowledgments

This work was supported by Sharif University of Technology Research Council. The authors wish to express their gratitude for the support of this work.

References

[1] Perlman, I., Stillman, N. and Chaikoff, I.L. "The influence of methionine, cystine, and cysteine upon the phospholipid turnover in the liver", *J. Biol. Chem.*, 133, pp. 651–659 (1940).
[2] Meister, A. and Anderson, M.E. "Glutathione", *Annu. Rev. Biochem.*, 52, pp. 711–760 (1983).
[3] Bounous, G., Batista, G. and Golda, P. "Whey proteins in cancer prevention", *Cancer Lett.*, 57, pp. 91–94 (1991).
[4] Witschi, A., Reddy, S., Stofer, B. and Lauterburg, B.H. "The systemic availability of oral glutathione", *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 43(6), pp. 667–669 (1992).
[5] Julius, M., Lang, C.A., Gleiberman, L., Harburg, E., Difranceisco, W. and Schork, A. "Glutathione and morbidity in a community-based sample of elderly", *J. Clin. Epidemiol.*, 47(9), pp. 1021–1026 (1994).
[6] Bray, T.M. and Taylor, C.G. "Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition", *Biochem. Pharmacol.*, 47(12), pp. 2113–2123 (1994).

[7] Droge, W. and Holm, E. "Role of cysteine and glutathione in HIV infection and other diseases associated with muscle wasting and immunological dysfunction", *FASEB J.*, 11, pp. 1077–1089 (1997).
[8] Staal, F.J.T. "Glutathione and HIV infection: reduced reduced, or increased oxidized?" *Eur. J. Clin. Investig.*, 28, pp. 194–196 (1998).
[9] Micke, P., Beeh, K.M., Schlaak, J.F. and Buhl, R. "Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients", *Eur. J. Clin. Investig.*, 31, pp. 171–178 (2001).
[10] Adair, J.C., Knoefel, J.E. and Morgan, N. "Controlled trial of *N*-acetylcysteine for patients with probable Alzheimer's", *Neurology*, 57(8), pp. 1515–1517 (2001).
[11] Ozkilic, A.C., Cengiz, M., Ozaydin, A., Cobanoglu, A. and Kanigur, G. "The role of *N*-acetylcysteine treatment on anti-oxidative status in patients with type II diabetes mellitus", *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 17(4), pp. 245–254 (2006).
[12] Shahrokhian, S. "Lead phthalocyanine as a selective carrier for preparation of a cysteine-selective electrode", *Anal. Chem.*, 73, pp. 5972–5978 (2001).
[13] Safavi, A., Maleki, N., Farjami, E. and Mahyari, F.A. "Simultaneous electrochemical determination of glutathione and glutathione disulfide at a nanoscale copper hydroxide composite carbon ionic liquid electrode", *Anal. Chem.*, 81, pp. 7538–7543 (2009).
[14] Xu, F., Wang, L., Gao, M. and Jin, L. "Amperometric determination of glutathione and cysteine on Pd–IrO(2) modified electrode with high performance liquid chromatography in rat brain microdialysate", *Anal. Bioanal. Chem.*, 372, pp. 791–794 (2002).
[15] Marzal, P.C., Torres, K.Y.C. and Kubota, L.T. "Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte with amperometric sensor based on TTF-TCNQ", *Clin. Chim. Acta*, 371, pp. 152–158 (2006).
[16] Andrew, M. and Karuso, P. "Fluorometric assay for the determination of glutathione reductase activity", *Anal. Chem.*, 79, pp. 8769–8773 (2007).
[17] Yang, P., Chen, Y., Zhu, Q., Wang, F., Wang, L. and Li, Y. "Sensitive chemiluminescence method for the determination of glutathione, L-cysteine and 6-mercaptopurine", *Microchim. Acta*, 163, pp. 263–269 (2008).
[18] Liang, S.-C., Wang, H., Zhang, Z.-M., Zhang, X. and Zhang, H.-S. "Direct spectrofluorimetric determination of glutathione in biological samples using 5-maleimidyl-2-(m-methylphenyl) benzoxazole", *Anal. Chim. Acta*, 451, pp. 211–219 (2002).
[19] Kim, G.-J., Lee, K., Kwon, H. and Kim, H.-J. "Ratiometric fluorescence imaging of cellular glutathione", *Org. Lett.*, 13, pp. 2799–2801 (2011).
[20] Potesil, D., Petrlova, J., Adama, V., Vacek, J. and Klejdus, B. "Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced andoxidized glutathione, and phytochelatin in maize kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection", *J. Chromatogr. A*, 1084, pp. 134–144 (2005).
[21] Kuster, A., Tea, I., Sweeten, S., Roze, J.C. and Robins, R.J. "Simultaneous determination of glutathione and cysteine concentration and 2H enrichments in micro volumes of neonatal blood using gas chromatography-mass spectroscopy", *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, pp. 1403–1412 (2008).
[22] Chiang, N.-C., Chiang, C.-K., Lin, Z.-H., Chiu, T.-C. and Chang, H.-T. "Detection of aminothiols through surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using mixed gold nanoparticles", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, pp. 3063–3068 (2009).
[23] Bakirdere, S., Bramanti, E., D'ulivo, A., Ataman, O.Y. and Mester, Z. "Speciation and determination of thiols in biological samples using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and high performance liquid chromatography–Orbitrap MS", *Anal. Chim. Acta*, 680, pp. 41–47 (2010).
[24] Hulst, H.C.V.d., *Light Scattering by Small Particles*, Dover, New York 397–400 (1981).
[25] Burda, C., Chen, X., Narayanan, R. and El-Sayed, M.A. "Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes", *Chem. Rev.*, 105, pp. 1025–1102 (2005).
[26] Liu, J. and Lu, Y. "Colorimetric biosensor based on DNA enzyme-assembled gold nanoparticles", *J. Fluresc.*, 14(4), pp. 931–935 (2004).
[27] Hong, M., Lee, D., Nam, S., Yoon, H.C. and Kim, H. "Inhibition assay of biomolecules based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles", *J. Am. Chem. Soc.*, 127, pp. 3270–3276 (2005).
[28] Xu, Q., Jin, S.G.D., Li, H. and Hu, X. "Determination of acetamiprid by a colorimetric method based on the aggregation of gold nanoparticles", *Microchim. Acta*, 173, pp. 323–329 (2011).
[29] Turkevich, J., Stevenson, P.C. and Hillier, J. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold", *Discuss. Faraday Soc.*, 11, pp. 55–75 (1951).
[30] Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H. and Plech, A. "Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited", *J. Phys. Chem. B*, 110, pp. 15700–15707 (2006).
[31] Zhao, W., Chiuman, W., Lam, J.C.F., MacManus, S.A., Chen, W., Cui, Y., Pelton, R., Brook, M.A. and Li, Y. "DNA aptamer folding on gold nanoparticles: from colloid chemistry to biosensors", *J. Am. Chem. Soc.*, 130, p. 3610 (2008).
[32] Ghosh, S.K., Nath, S., Kundu, S., Esumi, K. and Pal, T. "Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold colloids", *J. Phys. Chem. B*, 108, pp. 13963–13971 (2004).
[33] Su, K.-H., Wei, Q.-H. and Zhang, X. "Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles", *Nano Lett.*, 3(8), pp. 1087–1090 (2003).
[34] Mocanu, U., Cernica, I., Tomoaia, G., Bobos, L.-D., Horovitz, O. and T-Cotisel, M. "Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine", *Colloids Surf. A*, 338, pp. 93–101 (2009).

Mohammad Reza Hormozi Nezhad is Assistant Professor of Analytical Chemistry in the Chemistry Department, and an Associate Member of the Institute of Nanoscience and Nanotechnology at Sharif University of Technology in Iran. He earned a Ph.D. degree in Analytical Chemistry from Shiraz University, followed by a one-year sabbatical period at the University of Alberta (Professor Jillian Buriak's group) and a post-doctoral degree at the Institute of Nanoscience and Nanotechnology at Sharif University of Technology. His research interests include synthesis and application of colloidal metallic and semiconductor nanoparticles in analytical chemistry.

Ensieh Seyedhosseini obtained her B.S. degree in Pure Chemistry, and her M.S. degree in Analytical Chemistry, from Sharif University of Technology in 2004 and 2011, respectively. Currently, she is pursuing her Ph.D. degree at the Center for Research in Ceramic and Composite Materials (CICECO), University of Aveiro, Portugal. Her research interests include synthesis and characterization nano crystal and investigating the piezoelectricity and ferroelectricity in organic crystals.

Hossein Robatjazi obtained his B.S. degree in applied Chemistry from Isfahan University of Technology, Iran, in 2009, and his M.S. degree in Analytical Chemistry from Sharif University of Technology, Iran, in 2011. His research focused on the synthesis, characterization of different shapes of plasmonic nanoparticles, along with investigating their potential applications in nano-bioscience.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ectronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale
is journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

Salt-Mediated Kinetics of the Self-Assembly of Gold Nanorods End-Tethered with Polymer Ligands

Kun Liu,[a] Cristina Resetco,[a] and Eugenia Kumacheva*[a,b,c]

[a] *Department of Chemistry, University of Toronto, 80 Saint. George Street, Toronto, Ontario M5S 3H6, Canada,*
[b] *The Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering, University of Toronto, 4 Taddle Creek Road, Toronto, Ontario M5S 3G9, Canada,*
[c] *Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, University of Toronto, 200 College Street, Toronto, Ontario M5S 3E5, Canada*

Supporting information

Following depletion-induced fractionation of the mixture of nanorods (NRs) and spherical nanoparticles (NPs), no aggregation of NRs occurred in the system. After the removal of the supernatant containing the spherical NPs and short NRs, the precipitation of NRs was redispersed in deionized water. Figure S1 illustrates the absorbance spectra of NRs before and after their fractionation by depletion-induced precipitation. After purification, the transverse surface plasmon resonance (SPR) peak was blue shifted to 505 nm with much less intensity compared to that of as-synthesized NRs, due to the removal of spherical NPs which exhibit a characteristic absorbance peak centered at 530 nm. The longitudinal SPR peak became narrower and slightly red-shifted.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ectronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale
is journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

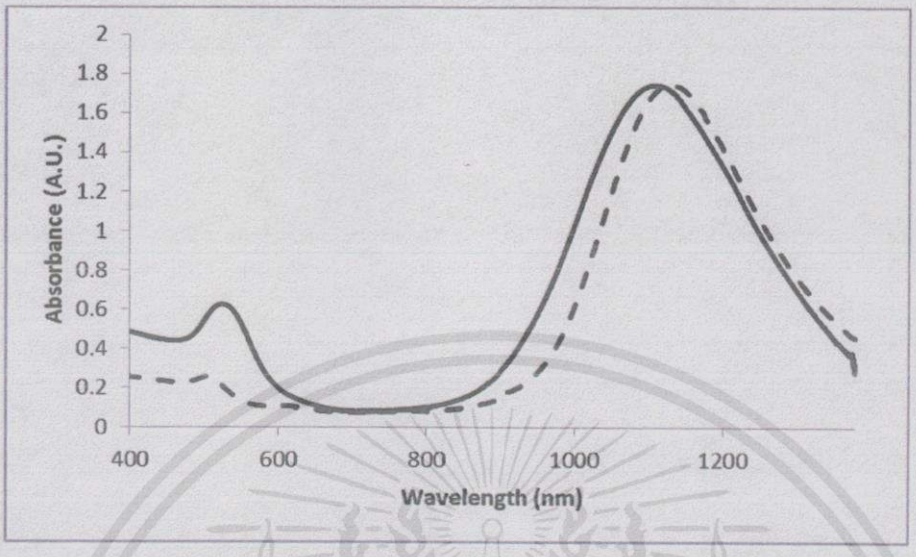


Figure S1. Absorbance spectra of the solution of as-prepared gold nanorods (solid line) and after purification by depletion (dashed line).

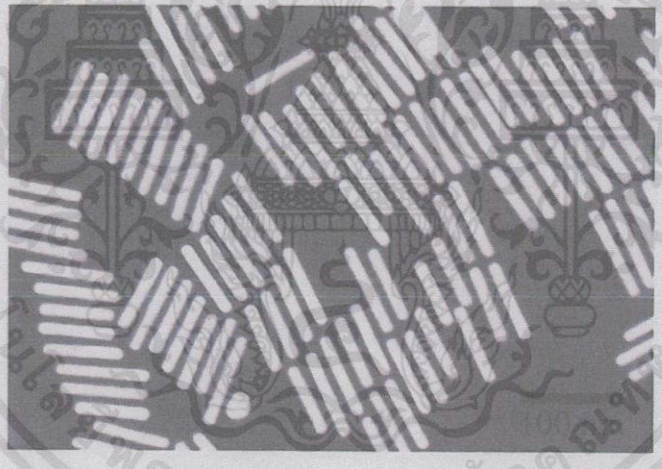


Figure S2. Dark field tramsmission elelctronic microscopy image of Au NRs after depletion.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ectronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale
is journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

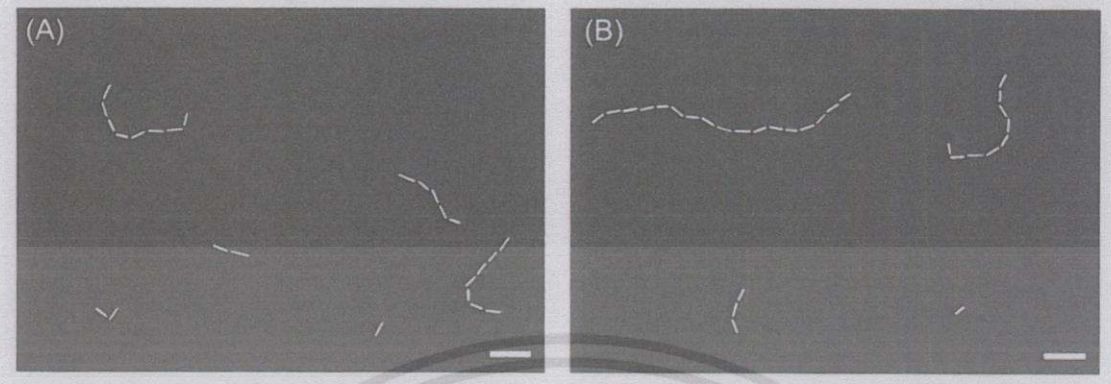


Figure S3. Dark field TEM images of the representative chains of the NRs formed after 4 h self-assembly at (A) [NaCl]=100 μM and (B) [NaCl]=300 μM. The scale bars are 200 nm.

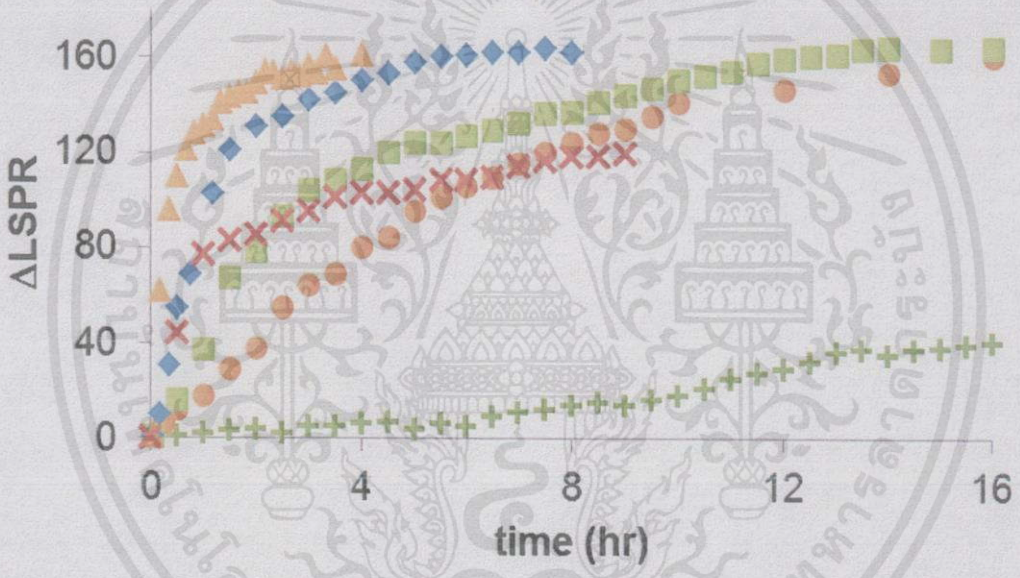


Figure S4. Temporal change up to 16 hours in $\Delta\lambda_{LSPR}$ for the NRs organized in chains in the DMF/water mixture at [NaCl] of 50μM (+), 100μM (●), 150μM (■), 200μM (◆), and 300μM (▲), and [$CaCl_2$] of 50 μM (×).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ctronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale
s journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

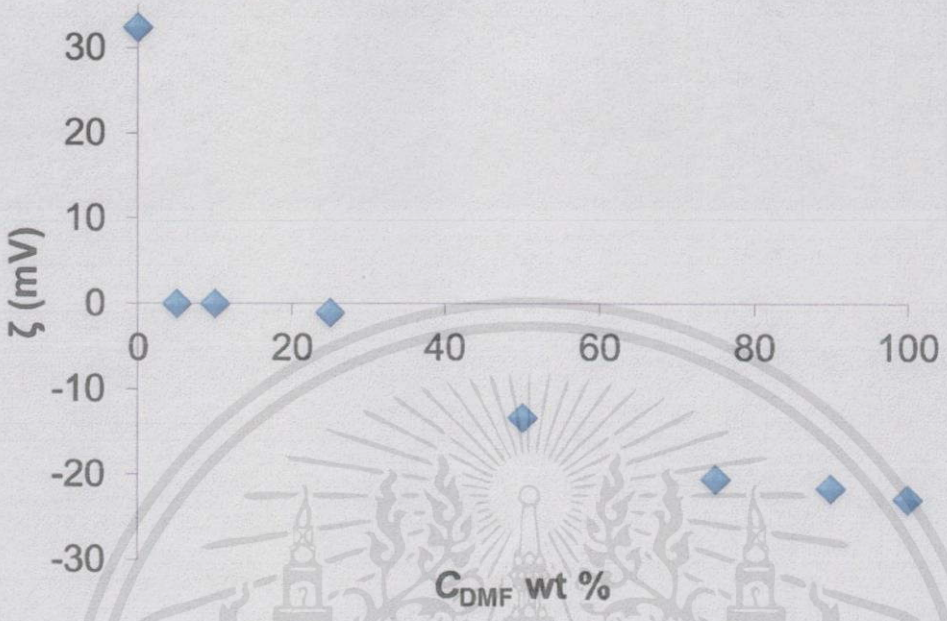


Figure S5. Variation in ζ-potential of gold NRs covered with CTAB in the mixtures of DMF/water at different concentrations of DMF, C_{DMF}.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้