การพัฒนาอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่ตกค้างในสัตว์น้ำ

THE DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC STRIP TEST FOR DETECTION OF LEUCOMALACHITE GREEN RESIDUAL IN AQUATIC ANIMALS

อุไรวรรณ วงษ์ทองดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การพัฒนาอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่ตกค้างในสัตว์น้ำ

อุไรวรรณ วงษ์ทองดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์-กรีน ที่ตกค้างในสัตว์น้ำ The Development of Immunochromatographic Strip Test for Detection of Leucomalachite Green Residual in Aquatic Animals
ชื่อ – นามสกุล	นางสาวอุไรวรรณ วงษ์ทองดี
สาขาวิชา	เคมีประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริรรณ ตี้ภู่, ปร.ด.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์พงศธร ประภักรางกูล, Ph.D.
ปีการศึกษา	2562

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์นภาพร ยังวิเศษ, ปร.ด.)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมร ไชยสัตย์, Ph.D.)

.....กรรมการ
(อาจารย์พงศธร ประภักรางกูล, Ph.D.)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริรรณ ตี้ภู่, ปร.ด.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ปร.ด.)
วันที่ เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2562

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์-กรีน ที่ตกค้างในสัตว์น้ำ
ชื่อ – นามสกุล นางสาวอุไรวรรณ วงษ์ทองดี
สาขาวิชา เคมีประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริรรณ ตี้ภู่, ปร.ด.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์พงศธร ประภักรางกูล, Ph.D.
ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

ลูโคมาลาไคธ์ กรีน เป็นสารที่เกิดจากการสลายของมาลาไคธ์ กรีนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อราในสัตว์น้ำ ซึ่งจะสะสมอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ ในกรณีที่มนุษย์บริโภคสัตว์น้ำที่มีการตกค้างของลูโคมาลาไคธ์ กรีน ทำให้เป็นโรคมะเร็ง ทารกในครรภ์เกิดความผิดปกติ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำ ซึ่งอาศัยหลักการทางอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ผลการทดลองพบว่าแอนติบอดีทุติยภูมิสำหรับเส้นควบคุมเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้นและปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทอง เท่ากับ 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 140 ไมโครลิตร และเวลาในการตรวจวิเคราะห์เท่ากับ 5 นาที จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ผลการทดลองพบว่ามีความเที่ยง ความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจงสูง โดยมีความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.7 - 2 ไมโครกรัมต่อลิตร มีขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณเท่ากับ 0.24 และ 0.80 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากนั้นนำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสไปตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริง พบว่าในทุกตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนของลูโคมาลาไคธ์ กรีน ข้อดีของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสที่พัฒนาขึ้น คือ ง่าย รวดเร็ว และสามารถตรวจวัดในภาคสนามได้

คำสำคัญ: ลูโคมาลาไคธ์ กรีน อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

Thesis Title	The Development of Immunochromatographic Strip Test for Detection of Leucomalachite Green Residual in Aquatic Animals
Name – Surname	Miss Uraiwan Wongtongdee
Program	Applied Chemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Siriwan Teepoo, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Mr. Pongsathon Phapugrangkul, Ph.D.
Academic Year	2019

ABSTRACT

Leucomalachite green is major reduced metabolite of malachite green, which was used as fungicide in aquatic animals. It was left and stored in the tissue of aquatic animals. The consumption of the contaminated leucomalachite green aquatic animals caused cancer, fetal abnormalities, and mutagenic. Therefore, the objective of this research was to develop the immunochromatographic strip test using competitive immunosensor for detection of leucomalachite green residual in aquatic animals.

The results revealed that the optimum conditions of the immunochromatographic strip test were as followed. The concentration of secondary antibody for control line was 0.1 mg/mL at the volume of 1 µL. The optimal concentration and volume of the LMG pAb-colloidal gold conjugate were 0.0025 mg/mL and 20 µL, respectively. The sample volume was 140 µL and the test time was 5 minutes. It was found that the immunochromatographic strip test performed high precision, accuracy, and specificity with a linear range of the concentration of 0.7 - 2 µg/L. The limit of detection and the limit of quantitation were at 0.24 and 0.80 µg/L, respectively.

After that, the immunochromatographic strip test was used for detection of leucomalachite green in the real samples and it showed that all samples were not contaminated with leucomalachite green. The advantage of the developed immunochromatographic strip test was that it was simple, rapid and suitable for on-site detection.

Keywords: leucomalachite green, immunochromatographic strip test, competitive immunosensor

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาเป็นอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ ตี้ภู่ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คือ ดร. พงศธร ประภักรางกูล ที่เสียสละเวลาและให้คำปรึกษาเป็นอย่างดี พร้อมทั้งติดตามความก้าวหน้าของวิทยานิพนธ์อย่างสม่ำเสมอตลอดมา นับตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสำเร็จอย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่งที่ให้ความกรุณาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นภาพร ยังวิเศษ ประธานในการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมร ไชยสัตย์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้เสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ รวมทั้งยังกรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณโครงการภาคีบัณฑิตศึกษา จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่สนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัย ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการแยกและวิเคราะห์สารปริมาณน้อย อาคารสถาบันวิจัยเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำพร้อมการสนับสนุนเป็นอย่างดีจนทำให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้จนประสบผลสำเร็จ อีกทั้งความช่วยเหลือจากครอบครัว เพื่อน พี่ และน้อง ตลอดจนบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ให้แก่ผู้สนใจ หากมีความผิดพลาดหรือบกพร่องใดๆในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยกราบขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

อุไรวรรณ วงษ์ทองดี

สารบัญ

หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย (3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (4)
กิตติกรรมประกาศ (5)
สารบัญ (6)
สารบัญตาราง (8)
สารบัญภาพ (9)
บทที่ 1 บทนำ 11
1.1 ที่มาและความสำคัญ 11
1.2 วัตถุประสงค์ของงานการวิจัย 12
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 12
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย 13
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 14
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
2.1 อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ 15
2.2 ปัญหาสารตกค้างในสัตว์น้ำ 17
2.3 ลูโคมาลาไคธ์ กรีน 18
2.4 วิธีการทั่วไปในการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน 19
2.5 เทคนิคอิมมูโนเอสเสย์ (Immunoassay) 21
2.6 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 22
2.7 หลักการเลือกแอนติบอดีทุติยภูมิ 26
2.8 ประเภทของแอนติบอดี 26
2.9 การอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J 30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 33
3.1 สารเคมี 33
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 34
3.3 วิธีการทดลอง 35

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 47

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง 47

4.2 การหาปริมาตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เหมาะสมสำหรับเชื่อมอนุภาคนาโนทอง 47

4.3 การเชื่อมแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับอนุภาคนาโนทอง 49

4.4 การสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน 49

4.5 การเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวีนซีรั่มอัลบูมิน 50

4.6 การสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 51

4.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 52

4.8 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ 58

4.9 ตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริงโดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสเปรียบเทียบกับเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์ 65

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 66

5.1 สรุปผลการทดลอง 66

5.2 ข้อเสนอแนะ 67

บรรณานุกรม 68

ภาคผนวก ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ 73

ประวัติผู้เขียน 98

สารบัญตาราง

หน้า
ตารางที่ 2.1 ยาและสารเคมีที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย 17
ตารางที่ 4.1 สรุปการหาสภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัด ลูโคมาลาไคธ์ กรีน 57
ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน 58
ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน 59
ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาความถูกต้องของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 59
ตารางที่ 4.5 อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 61
ตารางที่ 4.6 ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 63
ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยสถิติ *t*-test 65

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส โดยใช้หลักการของเทคนิค อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน 14
ภาพที่ 2.1 ผลผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากประเทศในภูมิภาคเอเชียปี พ.ศ. 2559 15
ภาพที่ 2.2 ผลผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำในประเทศไทยปี พ.ศ. 2544-2558 16
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของลูโคมาลาไคธ์ กรีน 18
ภาพที่ 2.4 กระบวนการเกิดลูโคมาลาไคธ์ กรีน 18
ภาพที่ 2.5 หลักการของเทคนิคอิมมูโนเอสเสย์ 22
ภาพที่ 2.6 ส่วนประกอบของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 23
ภาพที่ 2.7 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแซนวิช 24
ภาพที่ 2.8 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส แบบแข่งขัน 25
ภาพที่ 2.9 กระบวนการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี 27
ภาพที่ 2.10 กระบวนการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดี 28
ภาพที่ 2.11 หน้าต่างของโปรแกรม Image J 30
ภาพที่ 2.12 การเปิดไฟล์รูปภาพที่ต้องการตรวจวัดค่าความเข้มสี 30
ภาพที่ 2.13 การสร้างรูปสี่เหลี่ยมสำหรับตรวจวัดค่าความเข้มสี 31
ภาพที่ 2.14 การกำหนดขนาดของรูปสี่เหลี่ยมสำหรับการอ่านค่าความเข้มสี 31
ภาพที่ 2.15 การอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J 32
ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสร้างแผ่นคอนจูเกต 37
ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสร้างเส้นทดสอบ 38
ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการสร้างเส้นควบคุม 39
ภาพที่ 3.4 ส่วนประกอบของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 40
ภาพที่ 3.5 การแปรผลของอิมมูโนโครมาโกราฟิก สตริป เทส 40
ภาพที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคยูวี วิสิเบิลสเปกโตรสโคปี (ก) และขนาดของอนุภาคนาโนทองด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 210,000 เท่า (ข) 47
ภาพที่ 4.2 สีของอนุภาคนาโนทองหลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ (ก) และค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ปริมาตร 5 – 10 ไมโครลิตร 48
ภาพที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีน เชื่อมอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโคปี (ก) และขนาดของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทอง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 210,000 เท่า (ข) 49

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4.4 ผลค่าการดูดกลืนแสงของคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินด้วย เทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์ แอสเสย์แบบแข่งขัน 50
ภาพที่ 4.5 ผลการสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน 51
ภาพที่ 4.6 ผลของค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม 52
ภาพที่ 4.7 ผลของเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีน เชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต 53
ภาพที่ 4.8 ผลของปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีน เชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต 54
ภาพที่ 4.9 ผลของการศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิกสตริป เทส 55
ภาพที่ 4.10 ผลการศึกษาเวลาของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 56
ภาพที่ 4.11 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนค่าความเข้มสี และความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีน 60
ภาพที่ 4.12 โครงสร้างของสารในกลุ่มไตรฟีนิลมีเทน ได้แก่ ลูโคมาลาไคธ์ กรีน (ก) มาลาไคธ์ กรีน (ข) บริลเลี่ยน กรีน (ค) และคริสตัล ไวโอเลต (ง) 62
ภาพที่ 4.13 ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 63
ภาพที่ 4.14 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส 64

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยได้พัฒนาขยายตัวอย่างรวดเร็วในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมา ด้านหนึ่งเป็นผลจากการลดลงของผลผลิตสัตว์น้ำที่จับได้จากแหล่งน้ำตามธรรมชาติและอีกด้านหนึ่งเป็นผลจากการขยายตัวของความต้องการสินค้าสัตว์น้ำทั้งในส่วนของตลาดการค้าภายในประเทศและตลาดการค้าระหว่างประเทศ ทำให้เกิดการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลากหลายชนิดเพื่อเป็นสินค้าทดแทนสัตว์น้ำที่จับได้จากแหล่งธรรมชาติ โดยอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดถือเป็นอาชีพเศรษฐกิจที่สำคัญในฐานะที่เป็นแหล่งผลิตสัตว์น้ำและแหล่งรายได้ที่สำคัญของประเทศไทย แต่เนื่องจากมีปัจจัยเสี่ยงที่มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อราบนผิวหนังและโรคจุดขาว จึงมีการนำสารเคมีมาใช้เพื่อป้องกันการเกิดโรคระบาดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของสัตว์น้ำ ได้แก่ สารมาลาไคธ์ กรีน (Malachite green : MG) [1]

มาลาไคธ์ กรีน เป็นสีย้อมในกลุ่มไตรฟีนิลมีเทน (Triphenylmethane) [2] มีลักษณะเป็นผงสีเขียวละลายน้ำได้ดี เมื่อละลายน้ำแล้ว มาลาไคธ์ กรีน จะถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อของสัตว์น้ำได้อย่างรวดเร็วและสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นลูโคมาลาไคธ์ กรีน (Leucomalachite green : LMG) ซึ่งจะสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำและตกค้างเป็นเวลานาน [3] เมื่อร่างกายได้รับลูโคมาลาไคธ์ กรีนเข้าไปมีผลทำให้เป็นโรคมะเร็ง ทารกในครรภ์เกิดความผิดปกติ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม [4] จึงทำให้ในประเทศคู่ค้าต่างๆ ได้กำหนดปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีนสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์น้ำ (Maximum residue limit; MRL) เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา จีน แคนนาดา ไทย สหภาพยุโรป ได้กำหนดให้มีลูโคมาลาไคธ์ กรีนสูงสุดในสัตว์น้ำได้ไม่เกิน 2 ไมโครกรัมต่อลิตร [4] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องตรวจหาปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์น้ำ

วิธีทั่วไปที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีน ได้แก่ เทคนิคทางโครมาโตกราฟี (Chromatography) และเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor) สำหรับเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่นิยมใช้ในการตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน คือ เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) โดยใช้ยูวี สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

(UV spectrophotometer) [5] ฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence) [6] แมสสเปกโตรมิเตอร์ [7] ไดโอดแอเรย์ (Diode-array) เป็นตัวตรวจวัด [8] นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้โดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ [9, 10] แต่พบว่าเทคนิคดังกล่าว มีข้อจำกัดคือ เครื่องมือมีราคาสูง ผู้วิเคราะห์จะต้องมีความชำนาญในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี และต้องส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้ในภาคสนามและให้ผลการตรวจวัดที่รวดเร็ว นั่นคือ ชุดตรวจแบบรวดเร็วในรูปแบบอิมมูโนโครมาโต-กราฟิก สตริป เทส (Immunochromatographic strip test) ด้วยเทคนิคแบบแข่งขัน (Competitive binding) เพื่อตรวจหาปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์น้ำ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาวิธีสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.2.3 เพื่อหาประสิทธิภาพของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.2.4 เพื่อตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริงโดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 สังเคราะห์และตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง (Gold nanoparticle)

1.3.2 ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนสำหรับเชื่อมอนุภาคนาโนทอง

1.3.3 ศึกษาวิธีการเชื่อมแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับอนุภาคนาโนทอง

1.3.4 ศึกษาวิธีการสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนสำหรับเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมิน

1.3.5 ศึกษาวิธีการเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน

1.3.6 สร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.3.6.1 เตรียมแผ่นคอนจูเกต (Conjugate pad)

1.3.6.2 เตรียมเส้นทดสอบ (Test line)

1.3.6.3 เตรียมเส้นควบคุม (Control line)

1.3.6.4 ประกอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

1.3.6.5 การแปรผลของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับการวิเคราะห์ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.3.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวิเคราะห์หาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.3.7.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีทุติยภูมิสำหรับสร้างเส้นควบคุม

1.3.7.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต

1.3.7.3 ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต

1.3.7.4 ศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

1.3.7.5 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

1.3.8 ศึกษาประสิทธิภาพของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

1.3.8.1 ศึกษาหาความเที่ยง (Precision)

1.3.8.2 ศึกษาหาความถูกต้อง (Accuracy)

1.3.8.3 ศึกษาหาความเป็นเส้นตรง (Linearity)

1.3.8.4 ศึกษาหาความไววิเคราะห์ (Sensitivity)

1.3.8.5 ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection : LOD)

1.3.8.6 ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation : LOQ)

1.3.8.7 ศึกษาหาความจำเพาะเจาะจง (Selectivity)

1.3.8.8 ศึกษาอายุการใช้งานของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

1.3.9 ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริงโดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีแนวความคิดของการพัฒนาอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน โดยใช้หลักการของเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์หาปริมาณของลูโคมาลาไคธ์ กรีน (แอนติเจน) โดยใช้แอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีน (anti-Leucomalachite green) โดยมีวิธีการสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ดังภาพที่ 1.1

ขั้นที่ 1 เตรียมแผ่นคอนจูเกตโดยหยดแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทอง

ขั้นที่ 2 สร้างเส้นทดสอบ โดยหยดลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

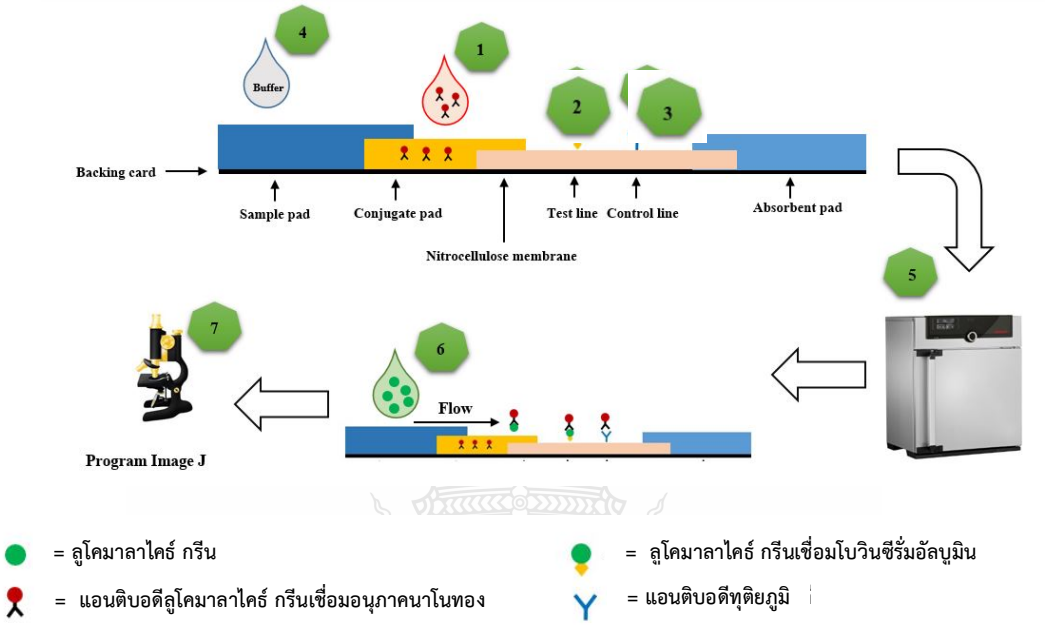
ขั้นที่ 3 สร้างเส้นควบคุม โดยหยดแอนติบอดีทุติยภูมิของลูโคมาลาไคธ์ กรีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

ขั้นที่ 4 เตรียมแผ่นตัวอย่างและแผ่นดูดซับ

ขั้นที่ 5 ประกอบเป็นอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส โดยนำแผ่นคอนจูเกตและแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแต่ละส่วนประกอบทั้งหมดมาประกอบลงบนแผ่นพลาสติกรองรับ (Backing card)

ขั้นที่ 6 หยดตัวอย่างลงบนแผ่นตัวอย่าง

ขั้นที่ 7 ตรวจวัดความเข้มของสีที่ได้ตรงตำแหน่งทดสอบและเส้นควบคุมด้วยโปรแกรมวัดค่าความเข้มสี (Image J) โดยสัญญาณที่ได้จะแปรผกผันกับปริมาณของลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ต้องการวิเคราะห์



ภาพที่ 1.1 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส โดยใช้หลักการของเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน (1) แผ่นคอนจูเกต (2) เส้นทดสอบ (3) เส้นควบคุม (4) แผ่นตัวอย่าง (5) ประกอบเป็นอิมมูโน-โครมาโตกราฟิก สตริป เทส และอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (6) หยดตัวอย่างลงบนแผ่นตัวอย่าง (7) ตรวจวัดความเข้มสีที่ได้ตรงตำแหน่งทดสอบและเส้นควบคุม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้วิธีการสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.5.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.5.3 ได้ทราบประสิทธิภาพของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

1.5.4 สามารถนำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ไปตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริงได้

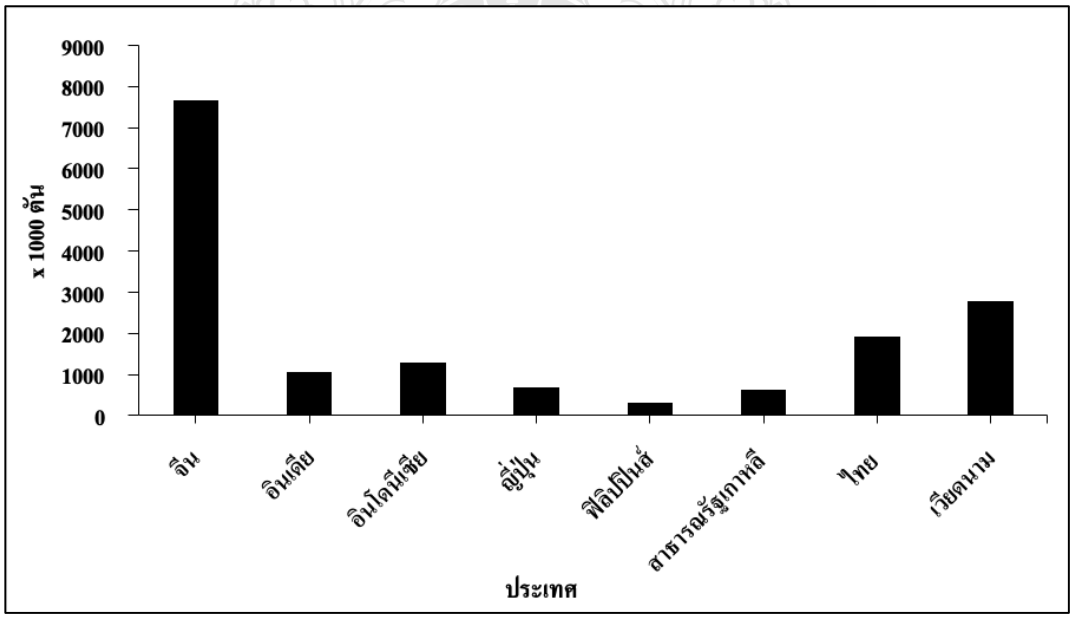
บทที่ 2

วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ

2.1.1 อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำของโลก

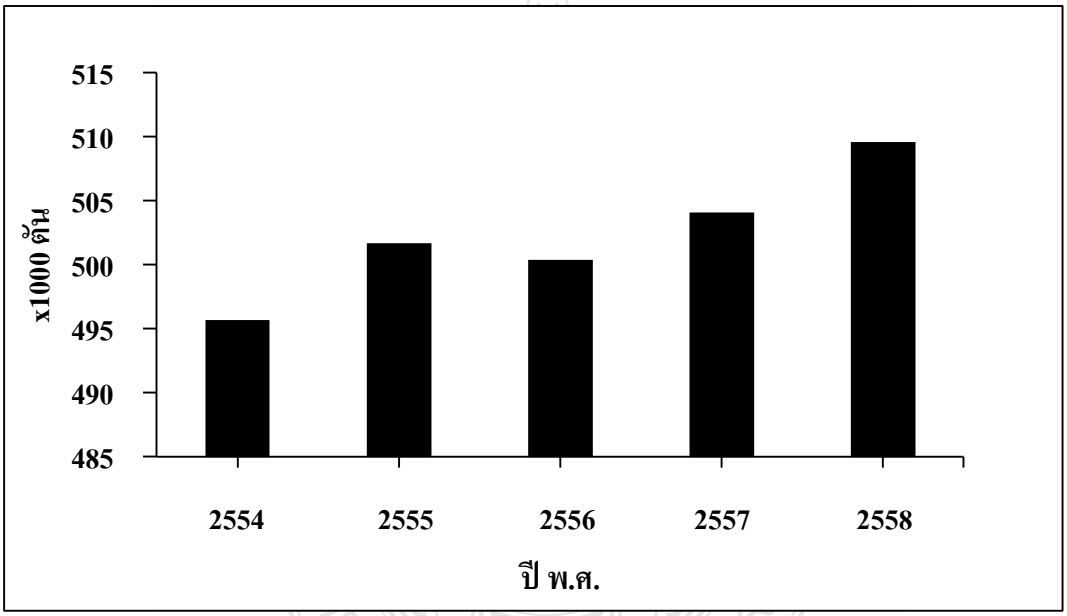
อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำยังคงเป็นแหล่งที่สำคัญด้านอาหาร โภชนาการ รายได้และการดำรงชีวิตสำหรับมนุษย์ทั่วโลก การบริโภคผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำสูงถึง 33.73 กิโลกรัมต่อคนต่อปี ถือเป็นประวัติการณ์ใหม่ในปี พ.ศ. 2559 แสดงถึงการเจริญเติบโตที่ดีในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ นอกจากนี้สัตว์น้ำยังคงเป็นหนึ่งในสินค้าอาหารส่วนใหญ่ที่มีการซื้อขายกันทั่วโลก ดังนั้นในอนาคตจะมีส่วนสำคัญต่อความมั่นคงทางด้านอาหารที่เพียงพอสำหรับประชากรทั่วโลกและคาดว่าจะถึง 9.7 พันล้านคนภายในปี พ.ศ. 2593 [11] จากการรายงานทางสถิติขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO, 2018) คาดว่าจะมีผลผลิตจากอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 – 2573 จาก 1,916,000 ตัน ถึง 2,392,000 ตัน โดยมีอัตราเพิ่มขึ้นเฉลี่ยเป็น 24.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการตอบสนองที่ดีของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำต่อการบริโภคของมนุษย์ สำหรับประเทศผู้นำการผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำในภูมิภาคเอเชีย ได้แก่ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ สาธารณรัฐเกาหลี ไทยและเวียดนาม เมื่อเทียบผลผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากประเทศคู่ค้าจากปี พ.ศ 2559 พบว่าประเทศไทยมีผลผลิตสัตว์น้ำส่งออกในอัตราที่สูงรองจากประเทศจีนและเวียดนาม ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ผลผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากประเทศในภูมิภาคเอเชียปี พ.ศ. 2559 [12]

2.1.2 อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำของประเทศไทย

ประเทศไทยถือว่าเป็นประเทศที่มีการส่งออกของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำเป็นลำดับต้นของโลก นอกจากจะช่วยเพิ่มผลผลิตของสัตว์น้ำแล้วยังเป็นการกระตุ้นเศรษฐกิจภายในประเทศ ในช่วงปี พ.ศ. 2543 – 2553 พบว่าผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่จับได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติมีแนวโน้มลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ในปี พ.ศ. 2551 ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำอยู่ใน 5 อับดับแรกของโลก [13] จากการรายงานของกรมประมงและสมาคมผู้เพาะเลี้ยงปลาไทยเผยให้เห็นว่าอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำภายในประเทศไทยมีทั้งหมด 647,814 แห่ง แบ่งเป็นอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำรายใหญ่ 41,000 แห่ง และอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำรายย่อย 606,814 แห่ง คิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ ปลานิล ปลาทับทิม ปลาดุก ปลาตะเพียน ปลาสลิด ปลาสวายและกุ้งก้ามกราม โดยอัตราเฉลี่ยผลผลิตจากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2554 – 2558 [14] ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 ผลผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำในประเทศไทยปี พ.ศ. 2554-2558 [14]

2.1.3 ปัจจัยเสี่ยงต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ

โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ หากเกิดมลพิษทางน้ำ เช่น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในอัตราที่หนาแน่นเกินไป สัตว์น้ำจะขับถ่ายของเสียออกมาในปริมาณมาก ทำให้น้ำเกิดการเน่าเสีย หรือเกิดจากการให้อาหารในปริมาณที่มากเกินไป ทำให้อาหารตกค้างอยู่ภายในบริเวณการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดมลพิษทางน้ำ เช่น ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Aeromonas hydrophila* และ *Aeromonas salmonicida* เจริญเติบโตได้ดี เป็นสาเหตุให้เกิดโรคระบาดกับสัตว์น้ำจืด [15] เช่น โรคเชื้อรา โรคปรสิต

และโรคเหงือกเน่า จึงได้มีการใช้สารเคมีบางชนิดเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียและป้องกันการเกิดโรคระบาดในสัตว์น้ำ [1] ซึ่งส่งผลให้เกิดสารพิษตกค้างในสัตว์น้ำและส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรง

2.2 ปัญหาสารตกค้างในสัตว์น้ำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการเติบโตอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง จึงมีความกังวลเกี่ยวกับการใช้ยาที่ไม่ได้รับอนุญาตและสารเคมีที่ไม่ปลอดภัยในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การตรวจสอบปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อรับประกันถึงความปลอดภัยของแหล่งอาหารและจัดการกับความเสี่ยงด้านสุขภาพของมนุษย์ทั่วโลก ซึ่งมียาและสารเคมีบางชนิดที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 299) พ.ศ. 2549 เช่น อะม็อกซีซิลิน (Amoxicillin) เอนโรฟล็อกซาซิน (Enrofloxacin) ซาราฟล็อกซาซิน (Sarafloxacin) ออกโซลินิก แอซิด (Oxolinic acid) ออกซีเตตร้า-ซัยคลิน (Oxytetracyclin) และโทลทราซูริล (Toltrazuril)

นอกจากยาและสารเคมีดังกล่าว ยังพบว่ามีสารเคมีบางชนิดที่นิยมใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและป้องกันโรคระบาดในสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีพิษรุนแรงและส่งผลต่อผู้บริโภค แสดงดังตารางที่ 2.1

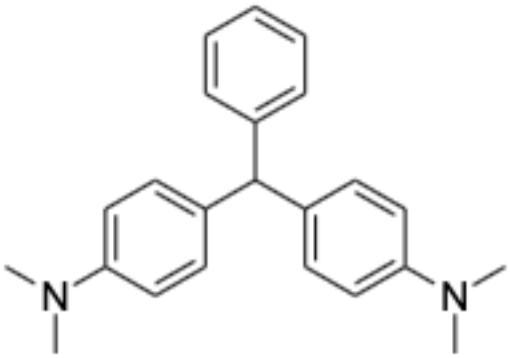
ตารางที่ 2.1 ยาและสารเคมีที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย

ยาและสารเคมี	ความเป็นพิษต่อมนุษย์
1. มาลาไคธ์ กรีน และลูโคมาลาไคธ์ กรีน	1. เหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็ง ทารกในครรภ์ผิดปกติและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
2. คลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol)	2. เสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว
3. สารในกลุ่มของไนโตรฟิวแรนส์ (Nitrofurans)	3. เป็นสารก่อมะเร็ง
3.1 ฟูราโซลิโดน (Furazolidone)	
3.2 ฟูรัลทาโดน (Furaltadone)	
3.3 ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone)	
3.4 ไนโตรฟูรานโทอิ(Nitrofurantoin)	

2.3 ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

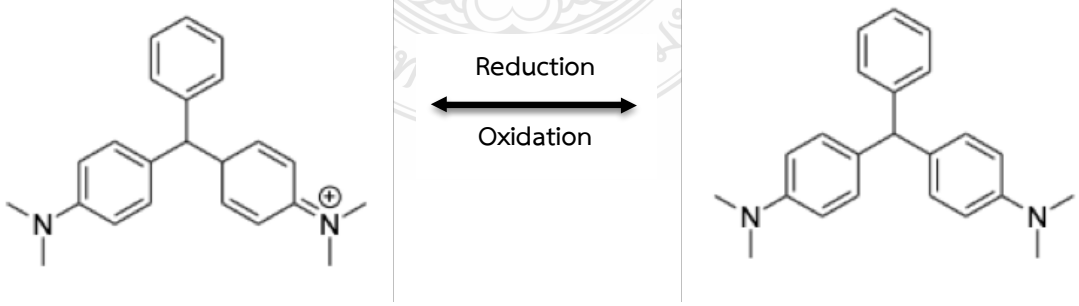
2.3.1 ลักษณะและสมบัติของลูโคมาลาไคธ์ กรีน

ลูโคมาลาไคธ์ กรีน หรือ 4-[[4-(dimethylamino)phenyl]-phenylmethyl]-N,N-dimethylaniline มีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 2.3 มีลักษณะเป็นผงสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน มีจุดเดือดที่ 102 องศาเซลเซียส สามารถละลายน้ำได้ แต่จะละลายได้ดีในสารละลายเบนซีนและเอทิลอีเทอร์



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของลูโคมาลาไคธ์ กรีน

ลูโคมาลาไคธ์ กรีน เกิดจากกระบวนการสร้างและสลาย (Metabolism) ของมาลาไคธ์ กรีน ซึ่งมาลาไคธ์ กรีนเป็นสีย้อมในกลุ่มไตรฟีนิลมีเทน เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียและราคาไม่แพง จึงนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศแถบเอเชีย [16] เมื่อสัตว์น้ำได้รับมาลาไคธ์ กรีน เข้าไปจะเปลี่ยนรูปเป็นลูโคมาลาไคธ์ กรีนอย่างรวดเร็ว และจะสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อที่มีไขมันของสัตว์น้ำเป็นเวลานาน ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าสารตกค้างส่วนใหญ่ในสัตว์น้ำจะอยู่ในรูปของลูโคมาลาไคธ์ กรีน [17]



ภาพที่ 2.4 กระบวนการเกิดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

2.3.2 ความเป็นพิษของลูโคมาลาไคธ์ กรีน

มาลาไคธ์ กรีน เป็นสารเคมีที่ห้ามใช้ในการรักษาโรคระบาดของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดาและสหภาพยุโรป [16] เมื่อมาลาไคธ์ กรีนถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ จะเกิดกระบวนการสร้างและสลายเป็นลูโคมาลาไคธ์ กรีน ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและมนุษย์ มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ระบบสืบพันธุ์และเป็นสารก่อมะเร็ง [5] หากผู้หญิงตั้งครรภ์รับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของลูโคมาลาไคธ์ กรีนในปริมาณสูง จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ทำให้ทารกในครรภ์มีความผิดปกติหรือร่างกายพิการ [17] ทำให้สหภาพยุโรปกำหนดให้มีปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีนสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์น้ำไม่เกิน 2 ไมโครกรัมต่อลิตร [4]

2.4 วิธีการทั่วไปในการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

2.4.1 ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ยูวี สเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัด

จากงานวิจัยของ Bergwerff และ Peter [18] ทำการตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนจากตัวอย่างปลา 29 ตัวอย่าง โดยสกัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนจากตัวอย่างปลา ชั่งเนื้อปลาปริมาณ 2 กรัม เติมสารละลาย McIlvaine บัฟเฟอร์ พีเอช 3.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พาราโทลูอินซัลโฟนิค (*p*-Toluenesulfonic) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ *N,N,N',N'*-เตตระเมทิล-1,4-ฟีนิลีน-ไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (*N,N,N',N'*-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมอะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะตอนความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดไปตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ยูวี สเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ประเภท C18 และใช้โซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างปลาได้ในช่วง 2.5 – 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีขีดจำกัดการตรวจพบที่ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้เปอร์เซ็นต์การได้คืนกลับที่ 105$\pm$14 เปอร์เซ็นต์ แต่เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัด คือ เครื่องมือมีราคาสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และต้องตรวจวัดภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น [5]

2.4.2 ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ฟลูออเรสเซนต์เป็นตัวตรวจวัด

Guoying และ Shui ในปี ค.ศ. 2010 ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ฟลูออเรสเซนต์เป็นตัวตรวจวัด [17] เนื่องจากลูโคมาลาค์ กรีน เป็นสารที่ไม่สามารถตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ได้โดยตรง ต้องอาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเลดออกไซด์ (Lead oxide) ไอโอดีน (Iodine) และไดคลอโร-ไดไซยาโนเบนโซควิโนน (Dichlorodicyanobenzoquinone) เพื่อเปลี่ยนลูโคมาลาไคธ์ กรีนให้เป็นมาลาไคธ์ กรีน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงใช้คอลัมน์ชนิด C18 ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้ความยาวคลื่นการกระตุ้นที่ 266 นาโนเมตร และความยาวคลื่นการคายที่ 360 นาโนเมตร พบว่าสามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนโดยมีขีดจำกัดการตรวจพบที่ 0.10 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม เปอร์เซ็นต์การได้คืนกลับที่ 80.6 เปอร์เซ็นต์ แต่เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัด คือ ไม่สามารถตรวจวัดได้โดยตรง จะต้องเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์หลายขั้นตอน ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน [5]

2.4.3 ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้แมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัด

ได้มีการพัฒนาวิธีตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้แมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัด [19] เพื่อตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างปลา จำนวน 208 ตัวอย่าง ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ใช้แอมโมเนียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.50 และอะซิโตไนไตรล์ในแอมโมเนียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.50 เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยใช้ตัวตรวจวัดแมสสเปกโตรมิเตอร์เป็น โหมดมัลติเพิลรีแอกชั่นมอนิทอริ่ง (Multiple reaction monitoring) จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน โดยมีขีดจำกัดการตรวจพบที่ 0.24 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 16-19 เปอร์เซ็นต์ แต่เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัด คือ เครื่องมือมีราคาสูง ต้องมีทักษะในการใช้เครื่องมือและการแปรผลการวิเคราะห์ [5]

2.4.4 ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ไดโอดแอเรย์เป็นตัวตรวจวัด

Stoev และ Stoyanov ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคโครมาโต-กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ไดโอดแอเรย์เป็นตัวตรวจวัด [20] ประกอบด้วยคอลัมน์ 2 ชนิด ได้แก่ คอลัมน์ชนิด C18 และคอลัมน์ที่เคลือบด้วยเลดไดออกไซด์ ใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร จากงานวิจัยนี้ พบว่าตัวตรวจวัดไดโอด-แอเรย์มีขีดจำกัดการตรวจพบที่ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9986 แต่ก็ยังมีข้อเสีย คือ จำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างและต้องทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์ ทำให้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน

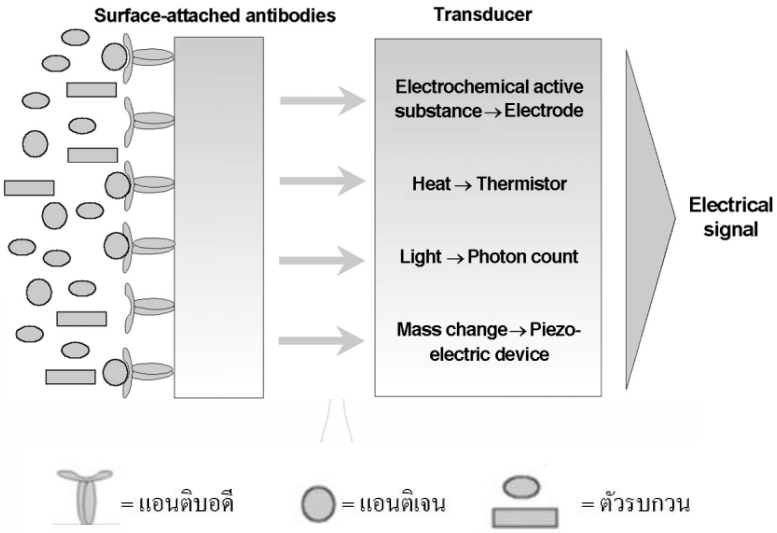
2.4.5 ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์

เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme limked immunosorbent assay ; ELISA) แบบแข่งขัน (Competitive) จากงานวิจัยของ Yang และคณะ [21] ได้ทำการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ในตัวอย่างปลา 80 ตัวอย่าง อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนลูโคมาลาไคธ์ กรีนและแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีน ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์ลูโคมาลาไคธ์ กรีนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ พบว่ามีขีดจำกัดการตรวจพบที่ 0.05 ไมโครกรัมต่อลิตร มีความจำเพาะเจาะจงและความไววิเคราะห์สูง แต่ก็ยังมีข้อจำกัด คือ มีหลายขั้นตอน ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน

ดังนั้นในงายวิจัยนี้จึงสนใจที่จะวิเคราะห์ปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีน ในสัตว์น้ำโดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เนื่องจากง่าย รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญสูงในการตรวจวัด

2.5 เทคนิคอิมมูโนเอสเสย์ (Immunoassay)

เทคนิคอิมมูโนเอสเสย์ ได้มีการพัฒนาและคิดค้นครั้งแรกใน ค.ศ. 1959 โดย Berson และ Yalow [22] เทคนิคอิมมูโนเอสเสย์เป็นอุปกรณ์การวิเคราะห์หาสารที่ต้องการจะตรวจวัดในตัวอย่างโดยอาศัยการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนอย่างจำเพาะเจาะจง ผลจากการจับกันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น ค่าการนำไฟฟ้า ความร้อน แสง หรือการเปลี่ยนแปลงทางมวล ตรวจวัดการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยใช้ตัวตรวจวัด (Transducer) โดยตัวตรวจวัดจะแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณไฟฟ้าและแสดงผลออกมา ดังภาพที่ 2.5 ผลจากการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีทำให้เทคนิคอิมมูโนเอสเสย์เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์สูง ไม่มีผลของตัวรบกวน และให้ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ ทำให้นิยมประยุกต์ใช้เทคนิคอิมมูโนเอสเสย์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ ทั้งทางด้านการแพทย์ [23] สิ่งแวดล้อม [24] และอาหาร [25] เป็นต้น



ภาพที่ 2.5 หลักการของเทคนิคอิมมูโนเอสเสย์ [22]

2.6 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

2.6.1 หลักการของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากเทคนิคอิมมูโนเอส-เสย์ ครั้งแรกในช่วงปลายทศวรรษ 1960 เพื่อวิเคราะห์หาโปรตีนในปัสสาวะ และได้เริ่มผลิตออกมาเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ในปี ค.ศ. 1976 สำหรับวิเคราะห์หา Human choronic gonadotropin (hCG) ในปัสสาวะ [26] หลักการของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เป็นเทคนิคการตรวจวัดที่อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีบนแผ่นเมมเบรน [27] โดยทั่วไปจะเป็นไนโตรเซลลูโลส หรือ ไนลอน (Nylon) [28] เมื่อหยดตัวอย่างบนเมมเบรน สารจะเกิดการเคลื่อนที่ด้วยแรงคาพิลลารี (Capillary force) บนเมมเบรน เกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี จากนั้นทำให้เกิดการแยกขึ้น ผลจากการแยกทำให้สามารถตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เป็นวิธีการตรวจหาสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากง่าย สามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวเอง ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์อื่นประกอบ และให้ผลตรวจวัดที่รวดเร็ว การรายงานผลการวิเคราะห์สามารถรายงานได้ทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative) และปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative) [29]

2.6.2 ส่วนประกอบของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส [30]

อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ประกอบด้วย 5 ส่วน ได้แก่ แผ่นตัวอย่าง แผ่นคอนจูเกต ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แผ่นดูดซับ และแผ่นพลาสติกรองรับ

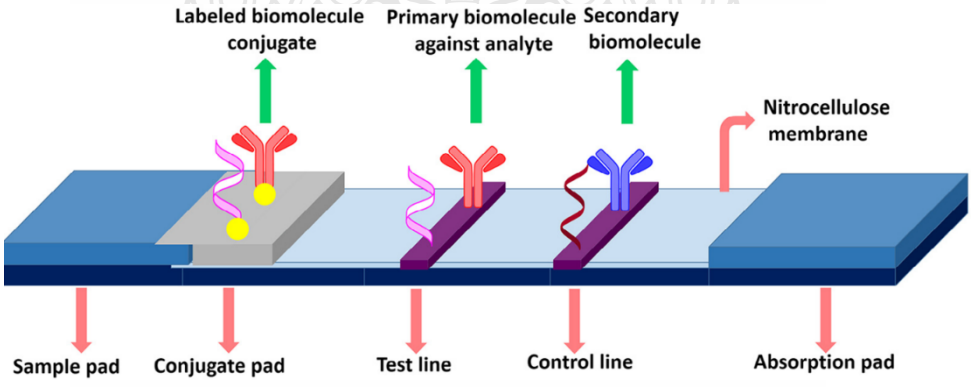
2.6.2.1 แผ่นตัวอย่าง เป็นบริเวณสำหรับใส่สารตัวอย่าง มีหน้าที่ช่วยส่งตัวอย่างไปยังแผ่นดูดซับด้วยแรงคาพิลลารี ทำให้แอนติเจนในสารตัวอย่างเคลื่อนไปจับกับแอนติบอดี โดยแผ่นตัวอย่างส่วนใหญ่ทำจากอะซิเตทเซลลูโลส (Cellulose acetate) หรือแผ่นใยแก้ว (Glass fiber)

2.6.2.2 แผ่นคอนจูเกต เป็นบริเวณสำหรับใส่แอนติบอดีที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทอง ซึ่งเป็นเครื่องหมายในการเกิดสัญญาณสำหรับการตรวจวัดสารตัวอย่าง โดยจะเคลื่อนที่ไปบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนในอัตราคงที่

2.6.2.3 แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน เป็นวัสดุที่สำคัญของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เป็นบริเวณที่เกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ประกอบด้วยเส้นทดสอบและเส้นควบคุม เมื่อเกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี จะแสดงความเข้มสีของสัญญาณบนเส้นทดสอบและเส้นควบคุม

2.6.2.4 แผ่นดูดซับ เป็นบริเวณที่ช่วยให้อัตราการไหลของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ตั้งแต่แผ่นตัวอย่างจนถึงแผ่นดูดซับมีอัตราการไหลคงที่ และหยุดการไหลย้อนกลับของสารตัวอย่าง

2.6.2.5 แผ่นพลาสติกรองรับ ใช้สำหรับรองรับแผ่นตัวอย่าง แผ่นคอนจูเกต ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและแผ่นดูดซับ โดยจะทำการติดส่วนประกอบทั้งหมดไว้บนแผ่นพลาสติกรองรับ ซึ่งจะเรียกว่า อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

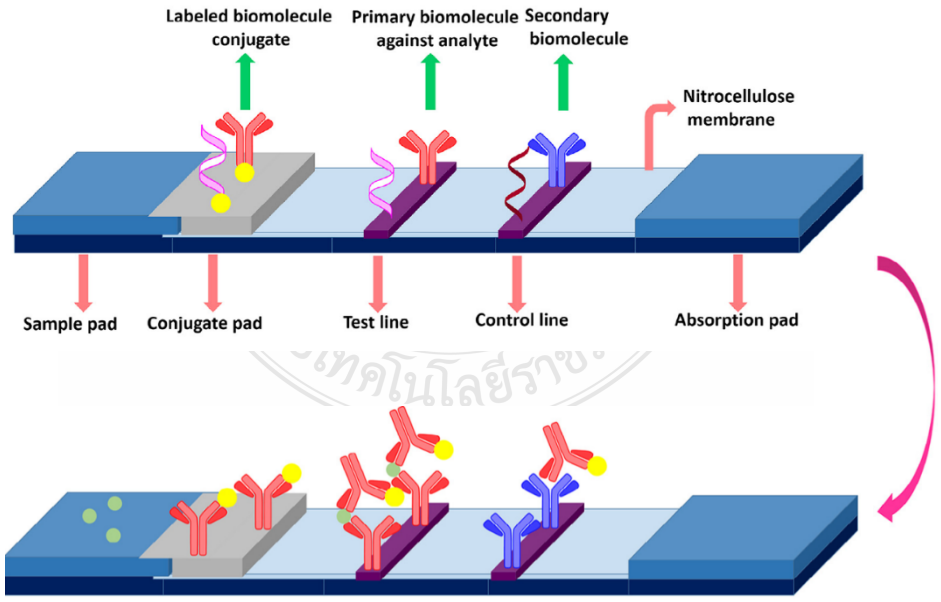


ภาพที่ 2.6 ส่วนประกอบของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส [26]

2.6.3 ประเภทของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส [31]

2.6.3.1 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแซนวิช (Sandwich immunechromatographic strip test)

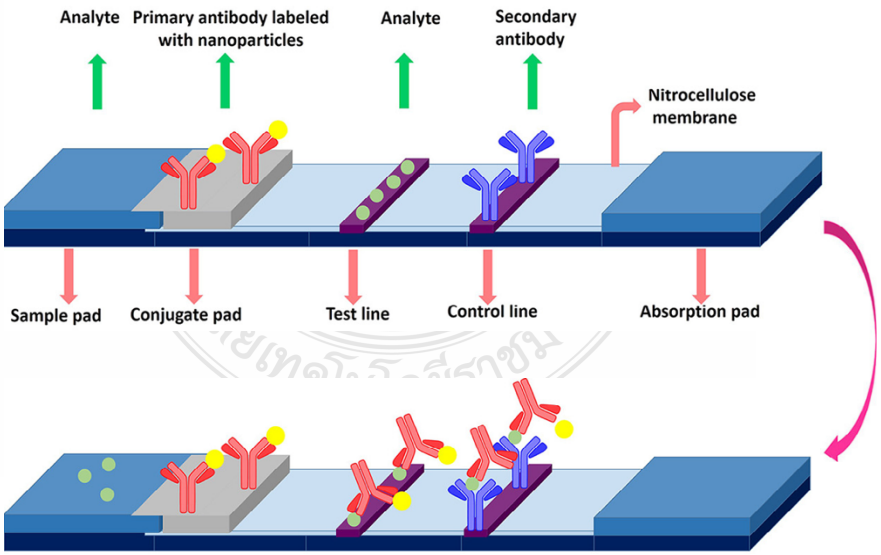
หลักการของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแซนวิช แสดงดังภาพที่ 2.7 โดยใช้แอนติบอดีที่แตกต่างกัน แอนติบอดีปฐมภูมิ (Primary antibody) จะมีความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนในสารตัวอย่าง แอนติบอดีปฐมภูมิจะเชื่อมกับอนุภาคนาโนทองและถูกตรึงไว้บนแผ่นคอนจูเกต เมื่อหยดสารตัวอย่างที่มีแอนติเจนบนแผ่นตัวอย่าง แอนติเจนในตัวอย่างจะไปจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทอง จากนั้นแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีปฐมภูมิที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทองจะเคลื่อนที่ด้วยแรงคาพิลลารีไปยังตำแหน่งเส้นทดสอบ และไปจับกับแอนติบอดี-ปฐมภูมิที่ถูกตรึงไว้ตรงเส้นทดสอบ ทำให้ปรากฏเส้นสีแดงตรงเส้นทดสอบ (สีแดงเกิดจากอนุภาคนาโนทอง) จากนั้นแอนติบอดีปฐมภูมิที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทองที่เหลือจะเคลื่อนที่ไปยังเส้นควบคุม เพื่อไปจับกับแอนติบอดีทุติยภูมิ (Secondary antibody) ที่ถูกตรึงไว้บนเส้นควบคุม ทำให้เกิดเส้นสีแดงขึ้น ดังนั้นการแปรผลของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแซนวิช ในกรณีที่ตัวอย่างมีแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์อยู่จะปรากฏเส้นสีแดง 2 เส้น (เส้นทดสอบและเส้นควบคุม) แต่ในกรณีที่สารตัวอย่างไม่มีแอนติเจน เส้นสีแดงจะปรากฏเพียงเส้นควบคุมเท่านั้น อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแซนวิช เหมาะสำหรับวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น ตรวจวัดระดับน้ำตาลเฉลี่ยสะสมในเลือด (Hemoglobin A1c) [32] ตรวจวัดไวรัสตับอักเสบบี(Hepatitis B virus) ในตัวอย่างซีรั่ม [33] และตรวจวัดเชื้อซาลโมเนนลา (*Salmonella typhi*) [34] เป็นต้น



ภาพที่ 2.7 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแซนวิช [26]

2.6.3.2 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแข่งขัน

หลักการของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส แบบแข่งขัน เป็นดังภาพที่ 2.8 โดยตรึงแอนติบอดีปฐมภูมิซึ่งจะเชื่อมกับอนุภาคนาโนทอง ตรึงไว้บนแผ่นคอนจูเกต เมื่อหยดสารตัวอย่างที่มีแอนติเจนบนแผ่นตัวอย่าง แอนติเจนในตัวอย่างจะไปจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทอง จากนั้นแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีปฐมภูมิที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทองที่เหลือจะเคลื่อนที่ไปจับกับแอนติเจน ที่ถูกตรึงอยู่บนเส้นทดสอบ จะปรากฏเส้นสีแดงตรงเส้นทดสอบ (ถ้าในตัวอย่างมีแอนติเจนมาก จะเหลือแอนติบอดีปฐมภูมิที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทองน้อย สีแดงของเส้นทดสอบจะจาง) จากนั้นแอนติเจนในตัวอย่างที่ไปจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทองจะเคลื่อนที่ไปยังเส้นควบคุม เพื่อไปจับกับแอนติบอดีทุติยภูมิที่ถูกตรึงไว้บนเส้นควบคุม ทำให้เกิดเส้นสีแดงขึ้น ดังนั้นการแปรผลของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแข่งขัน ในกรณีที่ตัวอย่างมีแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณมาก สีแดงของเส้นทดสอบจะจาง แต่ในกรณีที่สารตัวอย่างไม่มีแอนติเจน เส้นสีแดงของเส้นทดสอบจะเข้ม ในขณะที่เส้นควบคุมจะปรากฏสีแดง ทั้งมีและไม่มีแอนติเจนในตัวอย่าง อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส แบบแข่งขัน เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เนื่องจากสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะไม่สามารถจับกับแอนติบอดี พร้อมกันได้ 2 ตัว เช่น ตรวจวัดสารเจนิสทีน (Genistein) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง [35] ตรวจวัดอะฟลาท็อกซิน-เอ็ม 1 (Aflatoxin M1) ในตัวอย่างน้ำนม [36] และตรวจวัดสารเร่งเนื้อแดง (Clebuterol) ในปัสสาวะสัตว์ [23] เป็นต้น จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมา พบว่ายังไม่มีงานวิจัยใดที่ตรวจหาลูโคมาลาไคต์-กรีน โดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสแบบแข่งขัน



ภาพที่ 2.8 อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส แบบแข่งขัน [26]

2.7 หลักการเลือกแอนติบอดีทุติยภูมิ

แอนติบอดีทุติยภูมิเป็นแอนติบอดีที่เชื่อมโยงกับแอนติบอดีปฐมภูมิและทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจง ในทางอิมมูโนเซนเซอร์จำเป็นต้องเลือกแอนติบอดีทุติยภูมิให้เหมาะสมกันสำหรับการทดสอบ ดังนั้นการเลือกแอนติบอดีทุติยภูมิจึงมีความสำคัญโดยต้องเลือกให้ครอบคลุมถึงชนิดของแอนติบอดีปฐมภูมิ ซึ่งจะต้องพิจารณา ดังนี้ [37]

2.7.1 แหล่งที่มาของแอนติบอดี

แอนติบอดีทุติยภูมิต้องมาจากแหล่งเดียวกับแอนติบอดีปฐมภูมิที่ใช้ ตัวอย่างเช่น หากแอนติบอดีปฐมภูมิเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมจากซีรั่มแกะ (Sheep polyclonal antibody) ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิจึงต้องใช้แอนตี้แกะเป็นแอนติบอดีรอง (Anti-sheep antibody)

2.7.2 Subtype ของแอนติบอดีปฐมภูมิ

แอนติบอดีทุติยภูมิต้องตรงกับคลาสของแอนติบอดีปฐมภูมิ โดยปกติแอนติบอดีปฐมภูมิแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีเป็นส่วนสำคัญของอิมมูโนโกลบูลินแบบจี (IgG-like immunoglobulin) เช่น ถ้าแอนติบอดีปฐมภูมิเป็นแบบ IgG ของแกะ ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิต้องเป็นแอนติบอดีชนิด IgG ต่อต้านแกะ (Anti-Sheep (IgG) secondary antibodies)

2.7.3 แหล่งที่มาของแอนติบอดีทุติยภูมิ

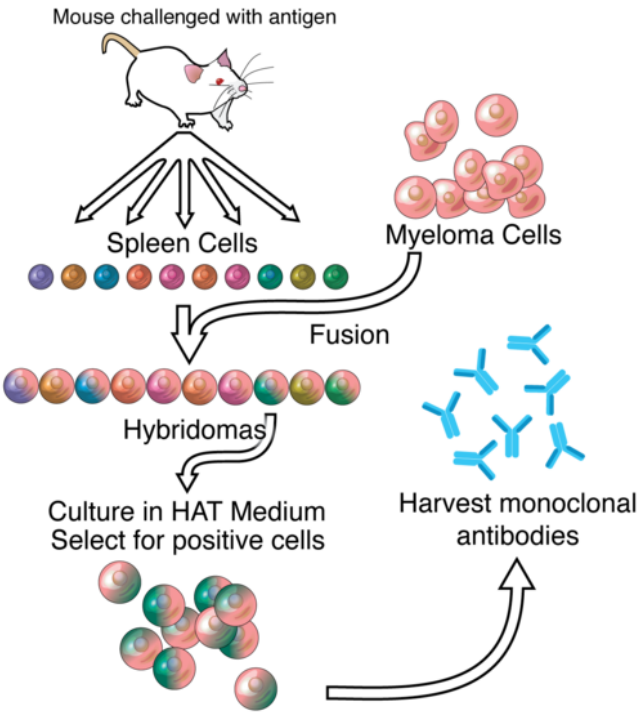
โดยปกติหลักการเลือกแหล่งที่มาของแอนติบอดีทุติยภูมิจะไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างสายพันธุ์ นั่นคือ หากแอนติบอดีทุติยภูมิที่ได้จากกระต่ายและแอนติบอดีทุติยภูมิที่ได้จากแพะจะไม่แตกต่างกันมากสำหรับใช้ในการทดลอง แต่ถ้าหากแอนติบอดีปฐมภูมิมีแหล่งที่มาจากแกะและแอนติบอดีปฐมภูมิที่มาจากเมาส์ ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิไม่ควรตรงกับแหล่งที่มาของแอนติบอดีปฐมภูมิ นั่นคือ แอนติบอดีทุติยภูมิห้ามมีแหล่งที่มาจากแกะหรือเมาส์

2.8 ประเภทของแอนติบอดี

แอนติบอดีเป็นโปรตีนทรงกลมชนิดหนึ่งที่ผลิตจากเซลล์พลาสมา บี (Plasma B cells) เพื่อจับกับแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดี ตำแหน่งของแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดี เรียกว่า เอพิโทป (Epitopes) แอนติบอดีที่จับกับเอพิโทปของแอนติเจน เรียกว่า พาราโทป (Paratope) ซึ่งแอนติบอดีจะแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) และโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody) เป็นแอนติบอดีที่สามารถใช้ในการรักษาโรค รวมถึงใช้ในงานวิจัย ทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนชนิดเดียวกันได้ ซึ่งความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลิโคลนอลแอนติบอดี คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะผลิตจากเซลล์พลาสมา บี ชนิดเดียวกันและสามารถจับกับเอพิโทปของแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจงได้ ในขณะที่โพลิโคลนอลแอนติบอดีจะผลิตจากเซลล์พลาสมา บี ที่แตกต่างกันและสามารถจับกับเอพิโทปที่แตกต่างกันของแอนติเจนเดียวกันได้

2.8.1 โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneous) ที่ผลิตจากเซลล์พลาสมา บี ชนิดเดียวกัน โดยขั้นแรก ฉีดเอพิโทปของแอนติเจนที่ต้องการเข้าไปในสัตว์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี กระบวนการนี้เรียกว่าการสร้างภูมิคุ้มกัน (Immunization) จากนั้นสัตว์จะผลิตแอนติบอดีต่อเอพิโทปของแอนติเจนภายในร่างกายและเก็บเซลล์พลาสมา บี ที่รวมกันจากตำแหน่งเฉพาะ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะรวมกัน เรียกว่า เซลล์มัยอิโลม่า (Myeloma cells) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium เพื่อให้เกิดเซลล์ไฮบริโดมา (Hybridoma cells) จะได้เซลล์โมโนโคลนอล พลาสมา บี ไฮบริโดมาที่ใหญ่ขึ้นและเก็บโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากภาชนะที่เพาะเลี้ยงเซลล์ แสดงดังภาพที่ 2.9

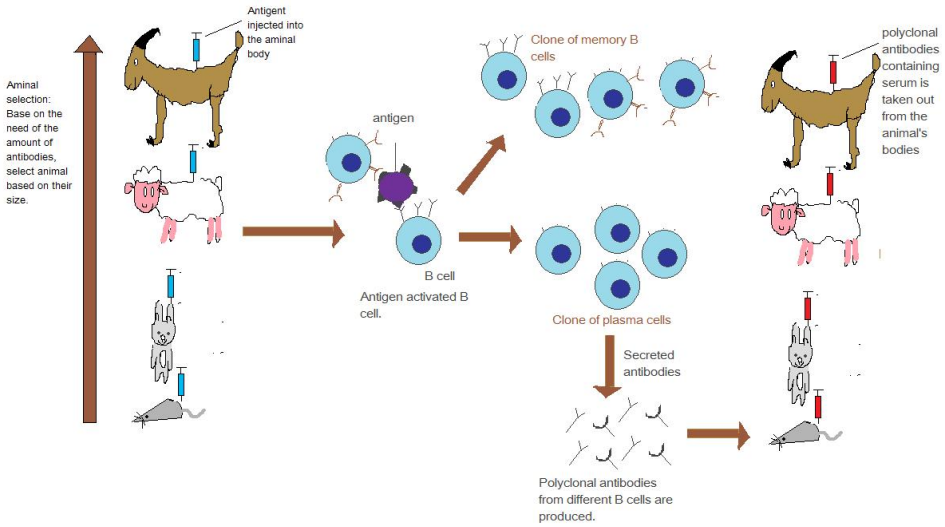


ภาพที่ 2.9 กระบวนการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี [38]

โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถรับรู้และเชื่อมโยงกับเอพิโทปที่จำเพาะเจาะจงของแอนติเจนได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถนำไปใช้เพื่อระบุโรคที่เกิดขึ้น ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่จึงนิยมใช้เพื่อรักษาโรค

2.8.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดี

โพลีโคลนอลแอนติบอดีเป็นการผสมกันของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน (Immunogolbulin) โดยแอนติบอดีแต่ละตัวสามารถรับรู้เอพิโทปที่ต่างกันของแอนติเจนได้ เนื่องจากการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจะผลิตจากเซลล์พลาสมา บี ที่ต่างชนิดกันหลายเซลล์ โดยกระบวนการสร้างภูมิคุ้มกันจะเป็นขั้นตอนแรกของการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งสัตว์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้โดยใช้แอนติเจนที่จำเพาะเจาะจงซึ่งอาจมีได้หลายเอพิโทป และโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถเก็บได้จากซีรั่มของสัตว์ได้โดยตรง แสดงดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 กระบวนการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดี [38]

โพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถเชื่อมกับเอพิโทปได้หลายตำแหน่งของแอนติเจนเดียวกัน โดยข้อดีนี้จึงสามารถเพิ่มความจุของการตรวจสอบของแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจงได้อย่างยิ่ง

ตารางที่ 2.2 ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลิโคลนอลแอนติบอดี

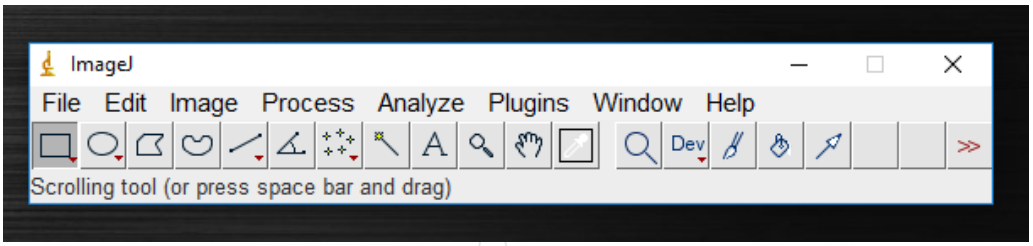
โมโนโคลนอลแอนติบอดี	โพลิโคลนอลแอนติบอดี
1. โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน	1. โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีส่วนผสมของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลินที่ได้จากแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจง ซึ่งมีลักษณะต่างกัน
2. โมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกผลิตโดยเซลล์พลาสมา บี ชนิดเดียวกัน	2. โพลีโคลนอลแอนติบอดีผลิตโดยเซลล์พลาสมา บี ที่แตกต่างกัน
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต้องผลิตเซลล์ไฮบริโดมา	3. การผลิตแอนติบอดีโพลีโคลนอลไม่จำเป็นต้องใช้เซลล์ไฮบริโดมา แต่สามารถเก็บได้โดยตรงจากซีรั่ม
4. โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีปฏิกิริยากับเอพิโทปที่จำเพาะเจาะจงในแอนติเจน	4. โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีปฏิกิริยากับเอพิโทปที่แตกต่างกันในแอนติเจนเดียวกัน
5. โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีราคาสูงสำหรับการผลิต	5. โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีราคาถูกสำหรับการผลิต
6. ผู้ผลิตต้องมีทักษะในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	6. ผู้ผลิตไม่จำเป็นต้องมีทักษะมากในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี
7. ใช้เวลานานในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	7. ใช้เวลาน้อยในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี
8. โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีปฏิกิริยาการข้ามน้อย (Cross reactivity)	8. โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีปฏิกิริยาการข้ามที่ค่อนข้างสูง
9. โมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกใช้ในการรักษาโรค	9. โพลีโคลนอลแอนติบอดีถูกใช้ในงานวิจัยทั่วไป
10. มีความจำเพาะเจาะจงและความสามารถในการทำซ้ำสูง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	10. มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะซึ่งเป็นข้อดีของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีสองประเภทที่ใช้เพื่อจุดประสงค์ที่แตกต่างกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกผลิตจากเซลล์พลาสมา บี ซึ่งโพลีโคลนอลแอนติบอดีถูกผลิตโดยเซลล์พลาสมา บี ที่แตกต่างกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับเอพิโทปเดียวกันในแอนติเจนในขณะที่โพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับเอพิโทปที่แตกต่างกันของแอนติเจนเดียวกัน

2.9 การอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J

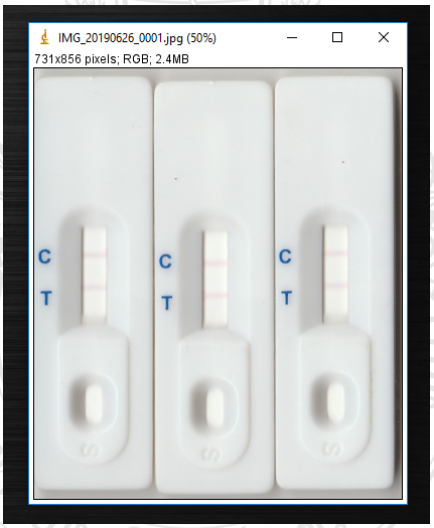
2.9.1. การเปิดไฟล์รูปภาพที่ต้องการวัดค่าความเข้มสี

2.9.1.1 เปิดโปรแกรม Image J จะแสดงหน้าต่างของโปรแกรม Image J ประกอบด้วยเมนูคำสั่งและไอคอนแสดงสัญลักษณ์ของเครื่องมือ



ภาพที่ 2.11 หน้าต่างของโปรแกรม Image J

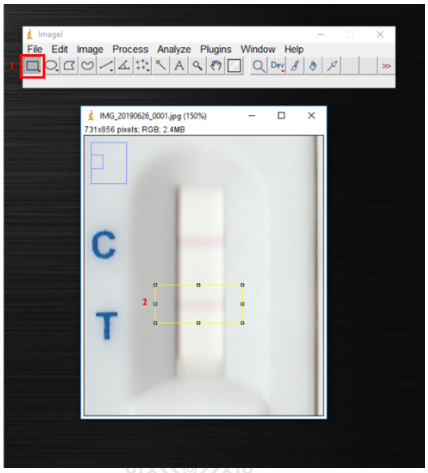
2.9.1.2 เปิดไฟล์รูปภาพที่ต้องการตรวจวัดค่าความเข้มสี โดยคลิกที่เมนูคำสั่ง เลือกที่เมนู File > Open และเลือกไฟล์รูปภาพที่ต้องการตรวจวัดค่าความเข้มสี



ภาพที่ 2.12 การเปิดไฟล์รูปภาพที่ต้องการตรวจวัดค่าความเข้มสี

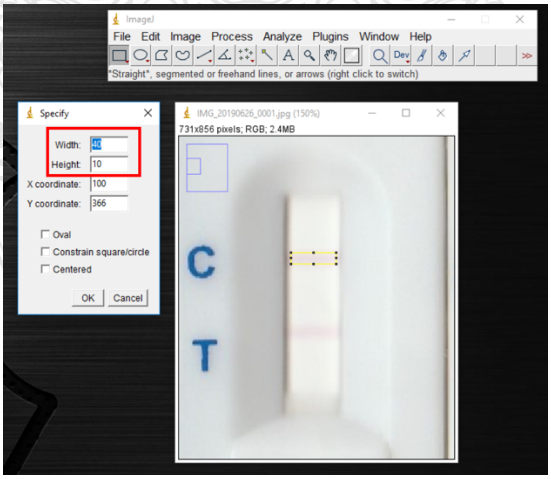
2.9.2. การตรวจวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J

2.9.2.1 เลือกไอคอนรูปสี่เหลี่ยม (Rectangle) ตรงแถบเมนูของหน้าต่างโปรแกรม จากนั้นสร้างรูปสี่เหลี่ยมบนรูปภาพที่ต้องการตรวจวัดค่าความเข้มสี



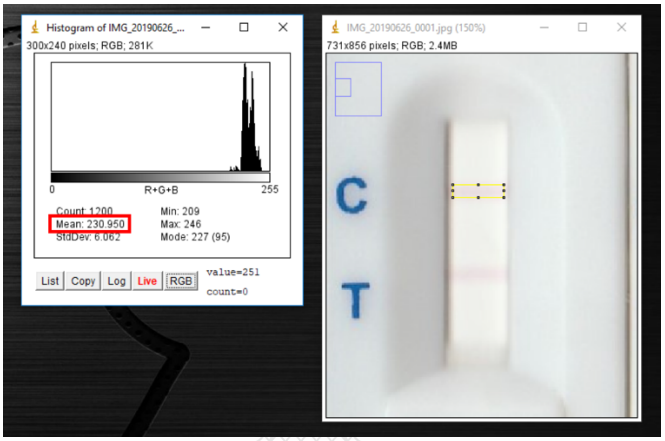
ภาพที่ 2.13 การสร้างรูปสี่เหลี่ยมสำหรับตรวจวัดค่าความเข้มสี

2.9.2.2 กำหนดขนาดของรูปสี่เหลี่ยม โดยคลิกที่เมนูคำสั่ง Edit > Selection > Specific จากนั้นกำหนดขนาดของรูปสี่เหลี่ยมให้มีขนาด 40x10 เพื่อให้มีขนาดพอดีกับเส้นทดสอบและเส้นควบคุมและเพื่อลดความคลาดเคลื่อนในการอ่านค่าความเข้มสี



ภาพที่ 2.14 การกำหนดขนาดของรูปสี่เหลี่ยมสำหรับการอ่านค่าความเข้มสี

2.9.2.3 ตรวจวัดค่าความเข้มสีโดยคลิกที่เมนูคำสั่ง Analyze > Histogram จะแสดงหน้าต่างของ Histogram ขึ้นมา จากนั้นคลิกที่ Live และเลือกการอ่านค่าความเข้มสีแบบเฉลี่ย (R+G+B) โดยสามารถอ่านค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมได้จากค่า Mean และนำค่าความเข้มสีที่ได้ไปหาอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม



ภาพที่ 2.15 การอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

3.1.1 แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีน (Anti-Leucomalachite green antibody, Polyclonal, ab31127, Abcam, UK)

3.1.2 แอนติบอดีทุติยภูมิ (Rabbit anti-sheep, Abcam, UK)

3.1.3 ลูโคมาลาไคธ์ กรีน (Leucomalachite green, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.4 โกลด์ (III) คลอไรด์ ไตรไฮเดรต (Gold(III) chloride trihydrate, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.5 โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate, Ajax Finechem, Australia)

3.1.6 โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.7 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Ajax Finechem, Australia)

3.1.8 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, Ajax Finechem, Australia)

3.1.9 โบวินซีรั่มอัลบูมิน (Bovine Serum albumin, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.10 โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium di-hydrogen orthophosphase, Ajax Finechem, Australia)

3.1.11 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen orthophosphase, Ajax Finechem, Australia)

3.1.12 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)คาร์โบดิไมด์ (1-Ethyl-3-(3-dimethlyaminopropyl)carbodiimide, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.13 โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.14 4-ฟอร์มิลเบนโซอิค แอซิด (4-formylbenzoic acid, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.15 N,N-ไดเมทิลอะนิลีน (N,N-dimethylaniline, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.16 ไบโอติน 3-ซัลโฟ-เอ็น-ไฮดรอกซิซักซินิไมด์ เอสเทอร์ โซเดียม ซอลต์ (Biotin 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.17 สเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (Streptavidin-peroxidase, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.18 ซูโครส (Sucrose, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.19 แอนไฮดรัส ซิงค์ คลอไรด์ (Anhydrous zinc chloride, Ajax Finechem, Australia)

3.1.20 โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Ajax Finechem, Australia)

3.1.21 ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, Ajax Finechem, Australia)

3.1.22 เอทานอลบริสุทธิ์ (Absolute ethanol, QreC, New Zealand)

3.1.23 ได-เมทิล ซัลฟอกไซด์ (Di-methyl sulfoxide, RCI Labscan, Thailand)

3.1.24 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid, RCI Labscan, Thailand)

3.1.25 อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile, RCI Labscan, Thailand)

3.1.26 เมทานอล (Methanol, RCI Labscan, Thailand)

3.1.27 มาลาไคธ์ กรีน (Malachite green, Union chemical, Thailand)

3.1.28 บริลเลี่ยน กรีน (Brilliant green, Himedia Laboratories, India)

3.1.29 คริสตัล ไวโอเลต (Crystal violet, Applichem, Germany)

3.1.30 เมมเบรนไดอะไลซิส (Seamless cellulose tubing, size 20/32, lot: 009001, Viskase sales corp)

3.1.31 3,3',5,5' เตตระเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.32 โพลีออกซีเอทิลลีนซอบิแทน โมโนเลท (Polyoxyethylenesorbitan monoleate, Sigma-Aldrich, USA)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 แผ่นตัวอย่าง (Sample pad, Millipore CO48, USA)

3.2.2 แผ่นคอนจูเกต (Conjugate pad, Whatman, UK)

3.2.3 แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose, UniSart CN 95, USA)

3.2.4 แผ่นดูดซับ (Absorbance pad, Millipore CO48, USA)

3.2.5 แผ่นพลาสติกรองรับ (Backing card, Lohmann, USA)

3.2.6 เครื่องเขย่ารุ่น VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries, USA)

3.2.7 ไมโครปิเปต ขนาด 10 100 และ 1,000 ไมโครลิตร (BRAND, Germany)

3.2.8 เครื่องกวนแม่เหล็ก Magnetic Bar ขนาด 10 เซนติเมตร (IKA RH basic 1, Germany)

3.2.9 เครื่องมือวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Model UB-10 (DENVER INSTRUMENT, USA)

3.2.10 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยมสี่ตำแหน่ง รุ่น AZ Series (SARTORIUS, USA)

3.2.11 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV-1601 (SHIMATSU, Japan)

3.2.12 ตู้บ่ม รุ่น Loading Model 30-750 (Memmert, Germany)

3.2.13 เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) รุ่น 30106889 (Jouan, UK)

3.2.14 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) รุ่น TECHNAI 20 (Phillips, USA)

3.2.15 ไมโครเพลท (Microplate, TPP tissue culture plates, Switzerland)

3.2.16 เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) รุ่น T25 digital ultra-turrax (IKA RH basic 1, Germany)

3.2.17 เครื่องสแกน (Scanner) รุ่น Canoscan LIDE 120 (Cannon, Vietnam)

3.2.18 เครื่องฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) รุ่น iD7 ATR NICOLET iS5 (Thermo scientific, Massachusetts, USA)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

นำเครื่องแก้วที่ใช้ไปทำความสะอาดโดยแช่ในกรดไนตริก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบจนแห้ง จากนั้นชั่งโซเดียมซิเตรต 5.80 มิลลิกรัม นำไปละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปั่นอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมโกลด์ (III) คลอไรด์ไตรไฮเดรต ความเข้มข้น 0.30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และโซเดียมโบโรไฮไดรด์ ความเข้มข้น 125 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดโดยใช้ช่วงความยาวคลื่นที่ 400 - 650 นาโนเมตร และตรวจวัดสมบัติทางกายภาพด้วยเครื่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [39]

3.3.2 ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนสำหรับเชื่อมอนุภาคนาโนทอง

ศึกษาปริมาตรต่ำสุดของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนสำหรับเชื่อมกับอนุภาคนาโนทอง โดยใช้แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 6 7 8 9 และ 10 ไมโครลิตร หยดลงในสารละลายอนุภาคนาโนทอง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พีเอช 8.50 (ปรับพีเอชด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเขย่าเป็นเวลา 1 นาที โดยเกณฑ์การพิจารณาเลือกปริมาตรต่ำสุดของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ไม่ทำให้สีของอนุภาคนาโนทองเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วง [40]

3.3.3 การเชื่อมแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับอนุภาคนาโนทอง

นำอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้จากการทดลอง 3.3.1 มาปรับพีเอช ด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ให้มีพีเอชเท่ากับ 8.50 จากนั้นเติมแอนติบอดีลูโคมาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรที่ได้จากการทดลอง 3.3.2 ลงในอนุภาคนาโนทองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 30 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อมิลลิลิตร โบวินซีรั่มอัลบูมิน ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเฉพาะส่วนของตะกอนมาละลายด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40

ที่มีโบวินซีรั่มอัลบูมินและซูโครส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและ 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโซเดียมเอไซด์ ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร [40]

3.3.4 การสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

วิธีการสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน อ้างอิงจาก Yang และคณะ [21] โดยใช้ 4-ฟอร์มิลเบนโซอิค แอซิด ปริมาณ 450 มิลลิกรัม N,N-ไดเมทิลอะนิลีน ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และซิงค์คลอไรด์ ปริมาณ 1.2 กรัมที่ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดรีฟรักซ์แล้วนำไปกวนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมเมทานอล ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 5.00 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จะมีตะกอนสีเขียวเกิดขึ้น นำตะกอนที่ได้ไปกรองและล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน และตรวจสอบหมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิคฟลูเรียร์ทรานส์-ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตสโคปี

3.3.5 การเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน

ขั้นแรกชั่งคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน 20 มิลลิกรัม โบวินซีรั่มอัลบูมิน 8 มิลลิกรัม และ 1-เอทิล-3-(-3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล) คาร์โบดิไมด์ 240 มิลลิกรัม ละลายใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปั่นอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตสารละลายผสมที่ได้ใส่ในถุงไดอะไลซีส และนำไปไดอะไลซีส (Dialysis) ด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ปั่นอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เก็บสารละลายที่ได้จากการไดอะไลซีสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปทดสอบการเชื่อมติดของคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน โดยใช้เทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์ แอสเสย์ [9]

ขั้นที่ 1 ปิเปตสารคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตรและสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลท บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโบวินซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง

ขั้นที่ 2 นำสารละลายมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตรผสมกับแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวบ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโบวินซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง

ขั้นที่ 3 เติมสารละลายสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นล้างไมโครเพลทด้วย

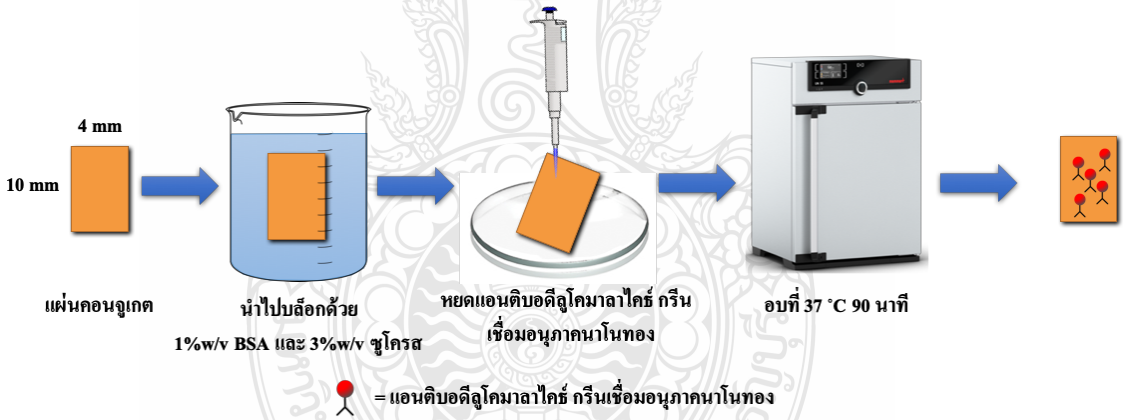
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.40 ที่มี 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโพลีออกซีเอทิลลีนซอบิแทนโมโนเลท จำนวน 5 ครั้ง

ขั้นที่ 4 ปิเปต 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีนและสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายสีฟ้า จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเพื่อหยุดการเกิดปฏิกิริยา จะได้สารละลายสีเหลือง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.3.6 สร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

3.3.6.1 การเตรียมแผ่นคอนจูเกต

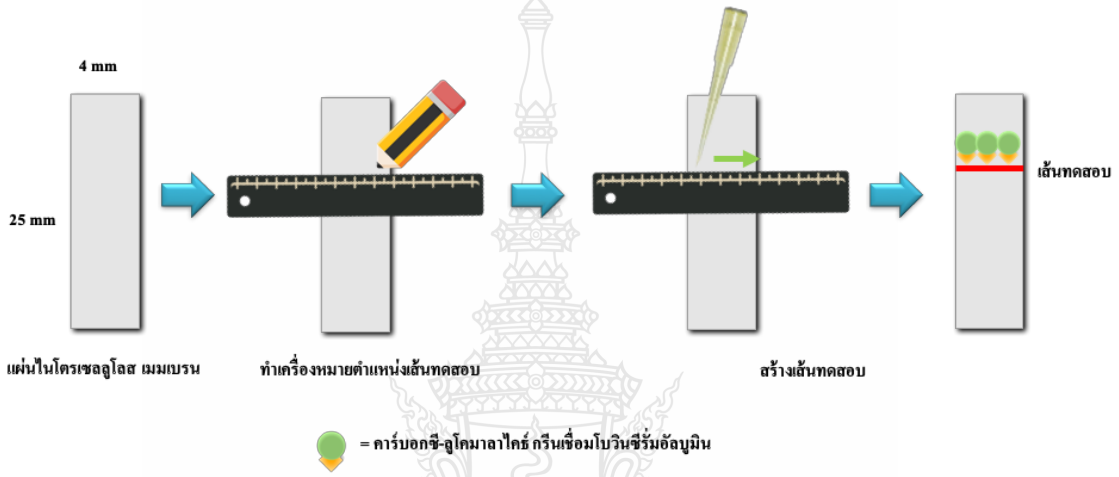
ตัดแผ่นคอนจูเกตขนาด 4x10 มิลลิเมตร นำไปบล็อกด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โบวินซีรั่มอัลบูมินและซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและนำไปซับให้แห้ง จากนั้นเติมสารละลายแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทอง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นคอนจูเกต นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แสดงดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสร้างแผ่นคอนจูเกต

3.3.6.2 การเตรียมเส้นทดสอบ

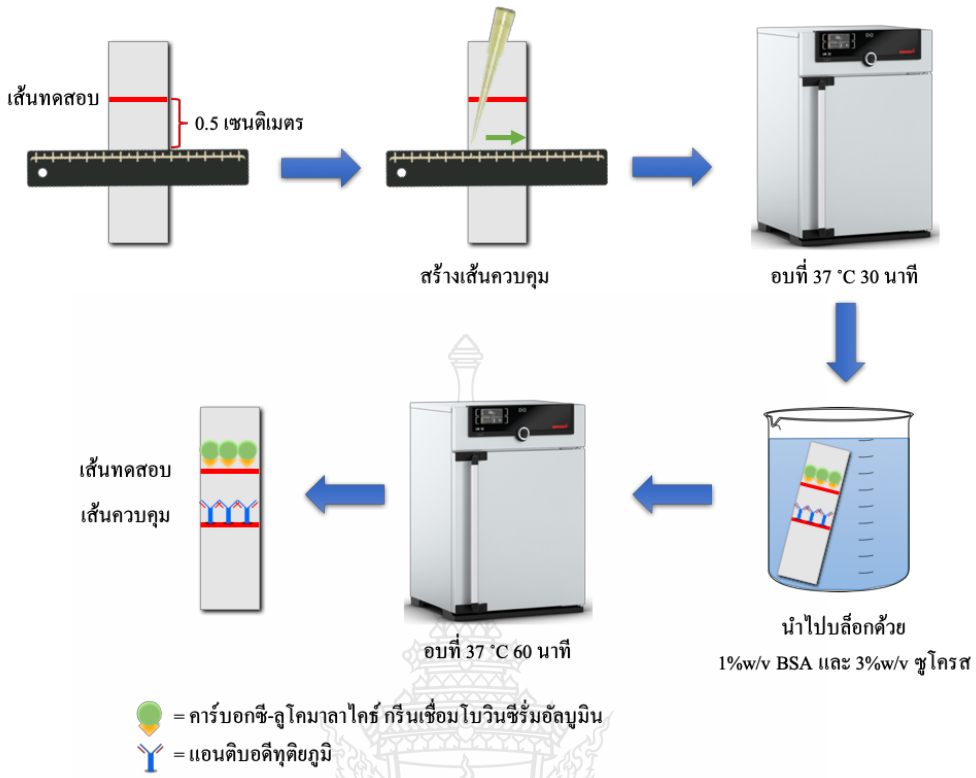
ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนขนาด 4x25 มิลลิเมตร ใช้ดินสอทำเครื่องหมายด้านบนแผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้นทดสอบ ที่อยู่ห่างจากริมบนของแผ่นไนโตร-เซลลูโลสเมมเบรน เติมสารละลายคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมกับโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรง จากนั้นใช้ปิเปตที่มีคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมิน ลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวา เพื่อสร้างเป็นเส้นทดสอบ แสดงดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสร้างเส้นทดสอบ

3.3.6.3 การเตรียมเส้นควบคุม

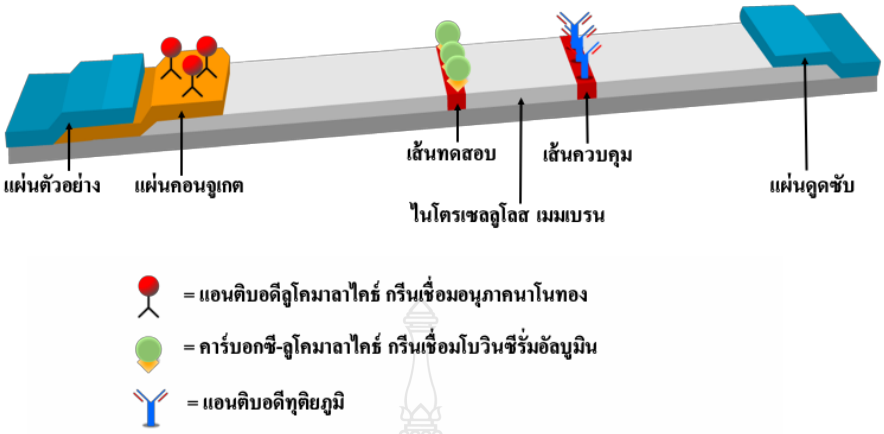
นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ลากเส้นทดสอบจากการทดลอง 3.3.6.2 มาสร้างเส้นควบคุมให้อยู่ถัดมาจากเส้นทดสอบ 0.5 เซนติเมตร ใช้ปิเปตดูดสารละลายแอนติบอดี-ทุติยภูมิ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร วางไม้บรรทัดให้เป็นแนวเส้นตรง แล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวา เพื่อสร้างเป็นเส้นควบคุม นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบล็อกด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โบวินซีรั่มอัลบูมินและซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แสดงดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการสร้างเส้นควบคุม

3.3.6.4 การประกอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

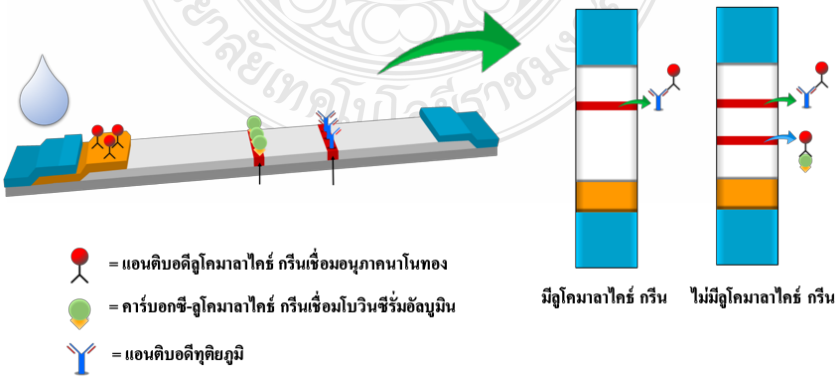
สร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ขนาด 4x60 มิลลิเมตร ประกอบด้วยแผ่นตัวอย่าง ขนาด 4x18 มิลลิเมตร แผ่นคอนจูเกต ขนาด 4x10 มิลลิเมตร แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 4x25 มิลลิเมตร และแผ่นดูดซับ ขนาด 4x18 มิลลิเมตร ขั้นแรกตัดแผ่นพลาสติกรองรับให้มีขนาด 4x60 มิลลิเมตร จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ได้จากการทดลอง 3.3.6.3 แผ่นคอนจูเกตที่ได้จากการทดลอง 3.3.6.1 แผ่นตัวอย่างและแผ่นดูดซับ มาติดลงบนแผ่นพลาสติกรองรับ ตามลำดับ จะได้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เพื่อตรวจหาลูโคมาลาไคธ์-กรีน แสดงดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 ส่วนประกอบของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

3.3.6.5 การแปรผลของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับการวิเคราะห์หาลูโคมาลาไคธ์ กรีน

เมื่อหยดตัวอย่างที่มีลูโคมาลาไคธ์ กรีนบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโต-กราฟิก ตริป เทส ลูโคมาลาไคธ์ กรีนจะเคลื่อนที่ไปจับกับแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมอนุภาคนาโนทองจึงไม่สามารถจับกับลูโคมาลาไคธ์ กรีนตรงเส้นทดสอบได้ ทำให้เส้นทดสอบไม่มีสีหรือมีสีแดงจางลงเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นควบคุม แต่ในกรณีหยดตัวอย่างที่ไม่มีลูโคมาลาไคธ์ กรีนบนแผ่นตัวอย่าง แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์-กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองจะเคลื่อนที่ไปจับกับลูโคมาลาไคธ์ กรีนตรงเส้นทดสอบ ทำให้เส้นทดสอบมีสีแดง จากนั้นตรวจวัดความเข้มสีบนเส้นทดสอบและเส้นควบคุมโดยใช้โปรแกรมอ่านค่าความเข้มสี (Image J) สำหรับการแปรผลการทดลองจะคำนวณจากอัตราส่วนของความเข้มสีของเส้นทดสอบ (I_t) ต่อความเข้มสีของเส้นควบคุม (I_c) [23]



ภาพที่ 3.5 การแปรผลของอิมมูโนโครมาโกราฟิก สตริป เทส

3.3.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

3.3.7.1 ศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีทุติยภูมิที่เหมาะสมสำหรับสร้างเส้นควบคุม

ศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีทุติยภูมิสำหรับสร้างเส้นควบคุมที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยสร้างเส้นทดสอบโดยใช้คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบล็อกด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โบวินซีรั่มอัลบูมินและซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นประกอบเป็นอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ขั้นต่อไปหยดสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เปรียบเทียบอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม เกณฑ์ในการพิจารณาเลือกการทดลองที่ให้ค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบเท่ากับเส้นควบคุม

3.3.7.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต

ศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองที่ความเข้มข้น 0.0020 0.0025 0.0030 0.0050 และ 0.1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรที่ได้จากการทดลอง 3.3.2 ลงในอนุภาคนาโนทอง พีเอช 8.50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อมิลลิลิตร โบวินซีรั่มอัลบูมิน ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเฉพาะส่วนของตะกอนมาละลายด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มีโบวินซีรั่มอัลบูมินและซูโครส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและ 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโซเดียมเอไซด์ ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ในขั้นนี้จะได้แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการศึกษาหาความเข้มข้นของแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองโดยนำไปหยดลงบนแผ่นคอนจูเกต จากนั้นเตรียมเส้นทดสอบและเส้นควบคุมประกอบเป็นอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ขั้นต่อไปหยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป-เทส เปรียบเทียบอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม เกณฑ์ในการพิจารณาเลือกการทดลองที่ให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมากที่สุด

3.3.7.3 ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต

ศึกษาหาปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมอนุภาคนาโนทองที่ได้จากการทดลอง 3.3.7.2 ปริมาตร 5 10 15 20 และ 25 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นคอนจูเกต จากนั้นเตรียมเส้นทดสอบและเส้นควบคุมประกอบเป็นอิมมูโนโครมาโตกราฟิก-สตริป เทส ขั้นต่อไปหยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เปรียบเทียบอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม เกณฑ์ในการพิจารณาเลือกการทดลองที่ให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมากที่สุด

3.3.7.4 ศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก-สตริป เทส

ศึกษาหาปริมาตรที่เหมาะสมของสารตัวอย่างโดยใช้สารละลายฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.00 ปริมาตร 100 110 120 130 140 150 และ 160 ไมโครลิตร ขั้นแรกสร้างเส้นทดสอบโดยใช้คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สร้างเส้นควบคุมโดยใช้แอนติบอดีทุติยภูมิความเข้มข้นจากการทดลอง 3.3.7.1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นประกอบเป็นอิมมูโนโครมาโต-กราฟิก สตริป เทส ขั้นต่อไปหยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.00 ที่ปริมาตรต่างๆ ลงบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เปรียบเทียบอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม เกณฑ์ในการพิจารณาเลือกการทดลองที่ให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมากที่สุด

3.3.7.5 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมโดยสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ขั้นแรกสร้างเส้นทดสอบโดยใช้คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สร้างเส้นควบคุมโดยใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ ความเข้มข้นจากการทดลอง 3.3.7.1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นประกอบเป็นอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส หยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.00 ปริมาตรที่ได้จากการทดลอง 3.3.7.4 ลงบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จากนั้นวางที่ไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆ ได้แก่ เวลาที่ 1 3 5 7 และ 9 นาที เปรียบเทียบอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม เกณฑ์ในการพิจารณาเลือกการทดลองที่ให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมากที่สุด

3.3.8 ศึกษาประสิทธิภาพของอิมมูโนโครมาโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

3.3.8.1 หาความเที่ยงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

1) ศึกษาการทำซ้ำของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาการทำซ้ำของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ทำการทดลองตามข้อ 3.3.6 สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่เหมาะสม ภายใต้การทดลองเดียวกัน จำนวน 7 ซ้ำ นำอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมไปคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Standard Deviation; SD) เกณฑ์การยอมรับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงไม่เกิน 30 เปอร์เซ็นต์ [41]

2) ศึกษาการทวนซ้ำของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาการทวนซ้ำของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ทำการทดลองตามข้อ 3.3.6 สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้วันในการทำการทดลองที่ต่างกัน จำนวน 7 วัน นำอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมไปคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วงไม่เกิน 30 เปอร์เซ็นต์ [41]

3.3.8.2 หาความถูกต้องของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาหาความถูกต้องของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส โดยการเติมสารละลายมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 1.3 1.5 และ 1.7 ไมโครกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น ทำการทดลองตามข้อ 3.3.6 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมที่ได้ มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยเกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน อยู่ในช่วง 40-120 % [41]

$$\%\text{Recovery} = \left[\frac{(Csp - Cs)}{Ca}\right] \times 100$$

โดย Csp คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spike sample),

Cs คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (Unspike sample)

Ca คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

3.3.8.3 หาความเป็นเส้นตรงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ทำการทดลองตามข้อ 3.3.6 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 0.7 0.9 1.0 1.3 1.5 1.7 1.9 2.0 2.3 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อลิตร นำค่าความเข้มสีที่ได้ไปหาอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมและนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีน กับอัตราส่วนค่าความเข้มสีของลูโคมาลาไคธ์ กรีน

โดยเกณฑ์การพิจารณา คือ ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงจะต้องมีค่าสัมประสิทธิ์-สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) มากกว่า 0.995 [42]

3.3.8.4 หาความไววิเคราะห์ของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาความไววิเคราะห์โดยตรวจวัดสารละลายมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่ความเข้มข้น 0.7 1.3 1.5 1.7 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำการทดลองตามข้อ 3.3.6 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำค่าความเข้มสีที่ได้ไปหาอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมและนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีน กับอัตราส่วนค่าความเข้มสีของลูโคมาลาไคธ์ กรีน โดยความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงจะต้องมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995 จากนั้นหาค่าความไววิเคราะห์ได้จากสมการเส้นตรง

3.3.8.5 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ โดยนำสารละลายแบลงค์มาตรวจวัดโดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จำนวน 7 ครั้ง จากนั้นหาอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์และคำนวณหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบโดยใช้สูตร LOD = 3SD [43]

3.3.8.6 หาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ โดยนำสารละลายแบลงค์มาตรวจวัดโดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จำนวน 7 ครั้ง จากนั้นหาอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม คำนวณหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณโดยใช้สูตร LOQ = 10SD จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์โดยเกณฑ์ที่กำหนดคือ ความเข้มข้นที่ได้จะต้องมีความเที่ยงและเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ยอมรับได้ [43]

3.3.8.7 หาความจำเพาะเจาะจงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน กับสารกลุ่มไตรฟีนิลมีเทน ได้แก่ มาลาไคธ์ กรีน บริลเลี่ยน กรีน และคริสตัลไวโอเลต [10] ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาลูโคมาลาไคธ์ กรีน ในข้อ 3.3.6 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยใช้สารที่นำมาทดสอบความจำเพาะเจาะจงแทนลูโคมาลาไคธ์ กรีน และเกณฑ์ในการพิจารณาความจำเพาะเจาะจงคือ เปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมของสารที่นำมาทดสอบซึ่งจะต้องมีค่ามากกว่าอัตราส่วนความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมของลูโคมาลาไคธ์ กรีน

3.3.8.8 ศึกษาอายุการใช้งานของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาอายุการใช้งานของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส โดยทำการทดลองตามข้อ 3.3.6 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ไปเก็บไว้ในถุงซิปแบบฟรอยด์ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาทดสอบ [44]

3.3.9 ตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริงโดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริง เช่น ปลาและกุ้ง ทำการสกัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่าง อ้างอิงวิธีการสกัดมาจาก Wang และคณะ [45] โดยใช้ตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ผสมกับอะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปบดละเอียดด้วยเครื่องเสียงฮอโมจีไนเซอร์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ และทำการสกัดตัวอย่างอีกครั้ง โดยเติมอะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปผสมกับสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดครั้งแรก จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงและนำสารสกัดส่วนที่เหลือมาละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน ด้วยอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ขั้นที่ 1 เตรียมแผ่นคอนจูเกตขนาด 4x10 มิลลิเมตร นำไปบล็อกด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โบวินซีรั่มอัลบูมินและซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและนำไปซับให้แห้ง จากนั้นเติมสารละลายแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทอง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นคอนจูเกต นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

ขั้นที่ 2 เตรียมเส้นทดสอบโดยตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนขนาด 4x25 มิลลิเมตร ใช้ดินสอทำเครื่องหมายตำแหน่งเส้นทดสอบที่อยู่ห่างจากริมบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน เติมสารละลายคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรง จากนั้นใช้ปิเปตที่มีคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมิน ลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวา เพื่อสร้างเป็นเส้นทดสอบ

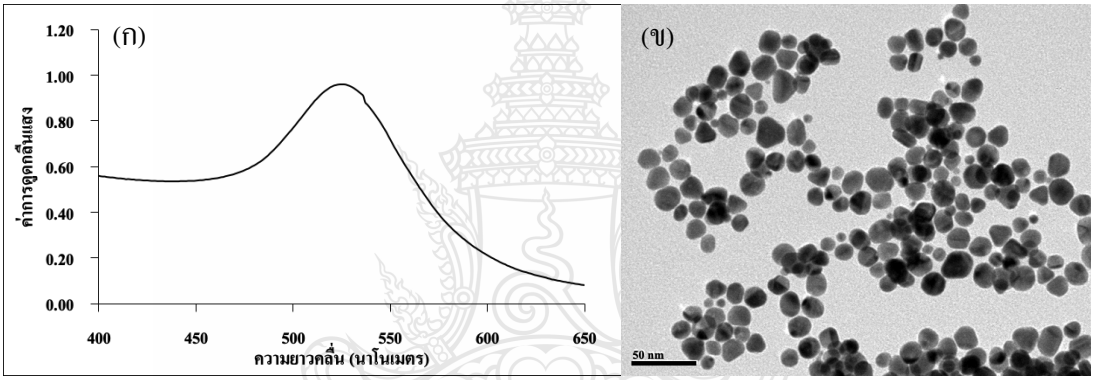
ขั้นที่ 3 เตรียมเส้นควบคุมโดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ลากเส้นทดสอบจากขั้นตอนที่ 2 มาสร้างเส้นควบคุมให้อยู่ถัดมาจากเส้นทดสอบ 0.5 เซนติเมตร ใช้ปิเปตดูดสารละลายแอนติบอดีทุติยภูมิ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร วางไม้บรรทัดให้เป็นแนวเส้นตรง แล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวา เพื่อสร้างเป็นเส้นควบคุม นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบล็อกด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โบวินซีรั่มอัลบูมินและซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

ขั้นที่ 4 นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แผ่นคอนจูเกต แผ่นตัวอย่างและแผ่นดูดซับที่ได้จากการเตรียมข้างต้นติดลงบนแผ่นพลาสติกรองรับ จากนั้นนำสารสกัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ที่ได้จากตัวอย่าง มาหยดลงบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส หาปริมาณของลูโคมาลาไคธ์ กรีนจากตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมกับสมการเส้นตรงของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับอัตราส่วนค่าความเข้มสีของลูโคมาลาไคธ์ กรีน และเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีอื่น เช่น ELISA

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ศึกษาผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโคปี พบว่าอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้มีค่าการดูดแสงสูงสุดที่ 525 นาโนเมตร ดังภาพที่ 4.1 (ก) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วงนาโนเมตรซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบขนาดของอนุภาคนาโนทองด้วยเครื่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ดังภาพที่ 4.1 (ข) พบว่าขนาดของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้มีขนาดของอนุภาคประมาณ 15 นาโนเมตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองได้

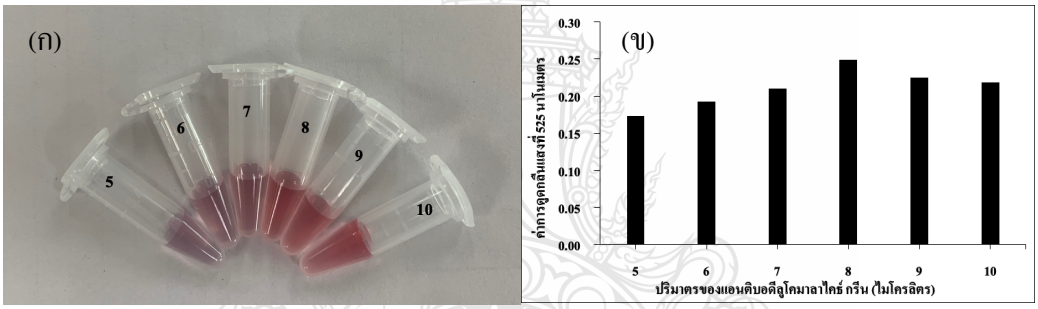


ภาพที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโคปี (ก) และขนาดของอนุภาคนาโนทองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 210,000 เท่า (ข)

4.2 การหาปริมาตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เหมาะสมสำหรับเชื่อมอนุภาคนาโนทอง

ผลการศึกษาการหาปริมาตรต่ำสุดของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนสำหรับเชื่อมอนุภาคนาโนทอง ทำการศึกษาโดยใช้แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 6 7 8 9 และ 10 ไมโครลิตร โดยแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนสามารถจับกับพื้นที่ผิวของอนุภาคนาโนทองได้ด้วยแรงทางกายภาพ ได้แก่ 1) ความสัมพันธ์ระหว่างพันธะไอออนิก (Ionic bond interaction) เป็นการดึงดูดของประจุไฟฟ้าระหว่างประจุบวกของแอนติบอดี ลูโคมาลาไคธ์ กรีนและประจุลบของพื้นผิวหน้าของอนุภาคนาโนทอง 2) แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำของแอนติบอดี ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง และ 3) การเชื่อมติดกัน (Dative binding) ระหว่างอิเล็กตรอนของอนุภาคนาโนทองและอะตอม

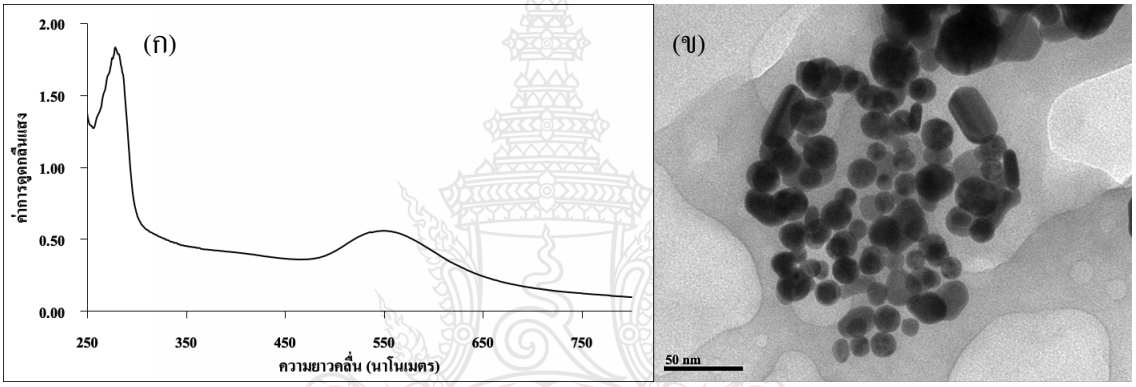
ซัลเฟอร์ (-S-) ของหมู่อะมิโนในแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีน [46] เมื่อพื้นผิวหน้าของอนุภาคนาโนทองถูกเชื่อมติดโดยแอนติบอดีอย่างเหมาะสมจนมีความเสถียรแล้ว หลังจากเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงไป ประจุของโซเดียมคลอไรด์ไม่สามารถจับกับพื้นที่ผิวของอนุภาคนาโนทองได้ อนุภาคนาโนทองจึงมีขนาดเท่าเดิมและสารละลายยังคงเป็นสีแดง แต่ถ้าหากปริมาณของแอนติบอดีไม่เหมาะสม ทำให้อนุภาคนาโนทองมีพื้นที่ผิวว่างทำให้โซเดียมคลอไรด์เข้ามาจับได้ โดยประจุระหว่างอนุภาคนาโนทองและโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้ขนาดของอนุภาคนาโนทองใหญ่ขึ้น ทำให้สารละลายเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีม่วงหรือเทา ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.2 (ก) พบว่าปริมาตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์-กรีนที่ 8 ไมโครลิตร ไม่ทำให้สีของอนุภาคนาโนทองเปลี่ยนไป แสดงว่ามีปริมาณของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเกาะที่ผิวหน้าของอนุภาคนาโนทองเพียงพอ จึงไม่ทำให้อนุภาคนาโนทองเกิดการเกาะกันเอง โดยให้ผลสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตร ดังภาพที่ 4.2 (ข) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 8 ไมโครลิตร เหมาะสมสำหรับการเชื่อมกับอนุภาคนาโนทองโดยไม่ทำให้สีของอนุภาคนาโนทองหรือขนาดของอนุภาคนาโนทองเปลี่ยน



ภาพที่ 4.2 สีของอนุภาคนาโนทองหลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ (ก) และค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองที่เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ปริมาตร 5 – 10 ไมโครลิตร (ข)

4.3 การเชื่อมแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับอนุภาคนาโนทอง

ผลการเชื่อมแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล-สเปกโตรสโคปี ดังภาพที่ 4.3 (ก) แสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 2 ตำแหน่ง โดยความยาวคลื่นที่ตำแหน่ง 280 นาโนเมตรเป็นแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนซึ่งเป็นโปรตีนและความยาวคลื่นที่ตำแหน่ง 541 นาโนเมตรเป็นอนุภาคนาโนทอง แสดงว่าแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนสามารถเชื่อมติดกับอนุภาคนาโนทองได้ เนื่องจากอนุภาคนาโนทองมีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ขนาดยังคงอยู่ในระดับนาโนเมตรเมื่อเชื่อมกับแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนโดยเปรียบเทียบกับการตรวจสอบขนาดของอนุภาคนาโนทองด้วยเครื่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ดังภาพที่ 4.3 (ข) พบว่าอนุภาคนาโนทองมีขนาด 25 นาโนเมตรเมื่อเชื่อมกับแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สามารถเชื่อมแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับอนุภาคนาโนทองได้



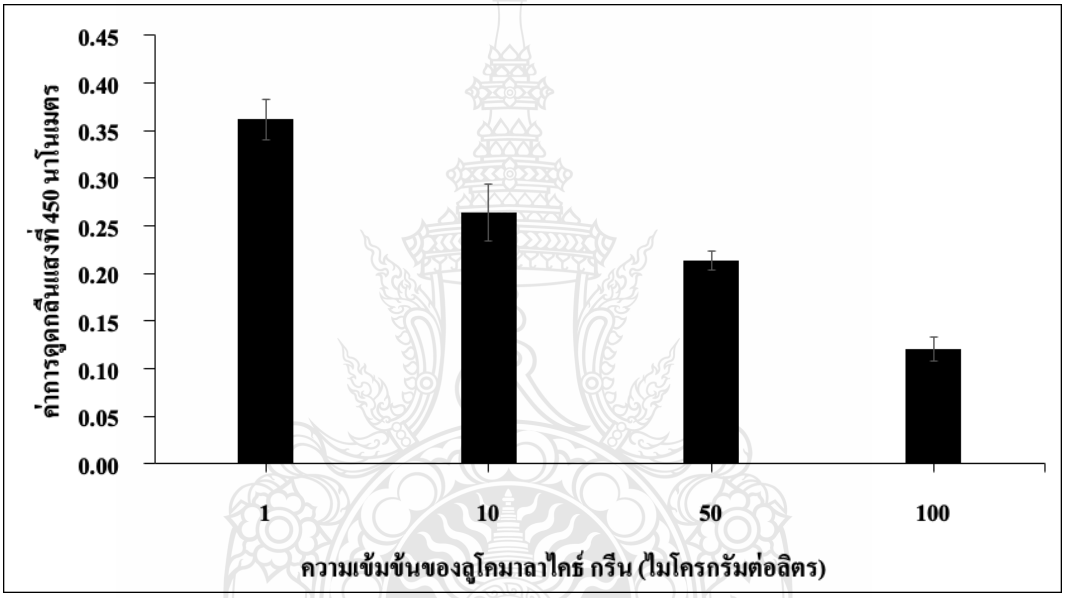
ภาพที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโคปี (ก) และขนาดของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 210,000 เท่า (ข)

4.4 การสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

ผลการสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด-สเปกโตรสโคปี โดยเปรียบเทียบกับลูโคมาลาไคธ์ กรีน พบว่าคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ได้จากการสังเคราะห์แสดงร้อยละของแสงที่ผ่านที่ตำแหน่ง 3,400 cm^{-1} และ 1,700 cm^{-1} เป็นหมู่ของไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่คาร์บอนิล (C=O) ตามลำดับ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) โดยสารมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีนไม่แสดงร้อยละของแสงที่ผ่านในตำแหน่งดังกล่าว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์สารคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน โดยการเพิ่มหมู่คาร์บอกซิลิกได้

4.5 การเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน

ผลการเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมินด้วยเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์ แอสเสย์แบบแข่งขัน แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อผสมแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์-กรีนที่ติดฉลากด้วยไบโอตินกับสารลูโคมาลาไคธ์ กรีน จะเกิดการจับกันก่อนภายในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวป์ ทำให้เหลือปริมาณแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่แปรผกผันกับลูโคมาลาไคธ์ กรีน ดังนั้นเมื่อหยดแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนข้างต้นลงในไมโครเพลทที่มีการตรึงลูโคมาลาไคธ์ กรีนไว้ ค่าการดูดกลืนแสงจึงลดลงตามปริมาณที่ลดลงของแอนติบอดี ลูโคมาลาไคธ์ กรีน จึงสรุปได้ว่าสามารถเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมินได้



ภาพที่ 4.4 ผลค่าการดูดกลืนแสงของคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินด้วยเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์ แอสเสย์แบบแข่งขัน

4.6 การสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

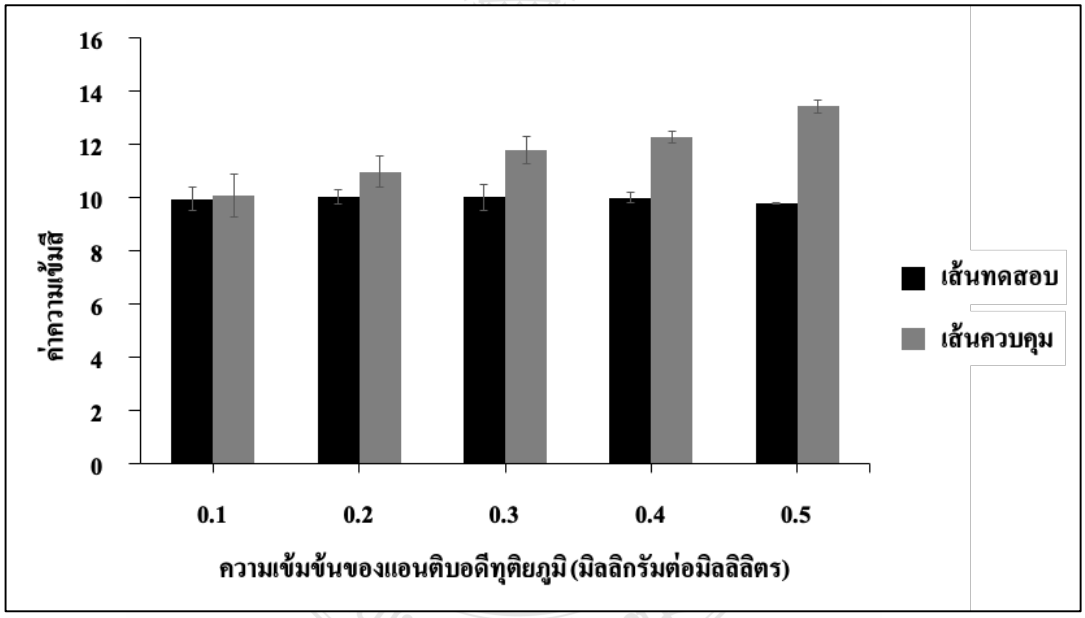
ผลการทดลองการสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส โดยใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อลิตร แทนสารละลายตัวอย่างหยดลงบนตำแหน่งแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส แสดงดังภาพที่ 4.5 พบว่า เมื่อสารตัวอย่างที่ไม่มีลูโคมาลาไคธ์ กรีน อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสจะแสดงเส้นสีแดงตรงตำแหน่งเส้นทดสอบและเส้นควบคุม เนื่องจากแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองตรงแผ่นคอนจูเกต จะเคลื่อนที่ด้วยแรงแคพิลลารี่มาจับกับคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนตรงตำแหน่งเส้นทดสอบและแอนติบอดีทุติยภูมิตรงตำแหน่งเส้นควบคุม แต่เมื่อสารตัวอย่างมีลูโคมาลาไคธ์ กรีน อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสจะแสดงเส้นสีแดงตรงตำแหน่งเส้นควบคุมเพียงเส้นเดียว เนื่องจากเกิดการจับกันระหว่างลูโคมาลาไคธ์ กรีนจากสารตัวอย่างและแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองตรงแผ่นคอนจูเกตก่อน ทำให้แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนไม่สามารถจับกับคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนตรงตำแหน่งเส้นทดสอบได้ แต่ยังสามารถจับกับแอนติบอดีทุติยภูมิตรงตำแหน่งเส้นควบคุมได้ จึงสรุปได้ว่า สามารถสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้

ภาพที่ 4.5 ผลการสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

4.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

4.7.1 ศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีทุติยภูมิที่เหมาะสมสำหรับสร้างเส้นควบคุม

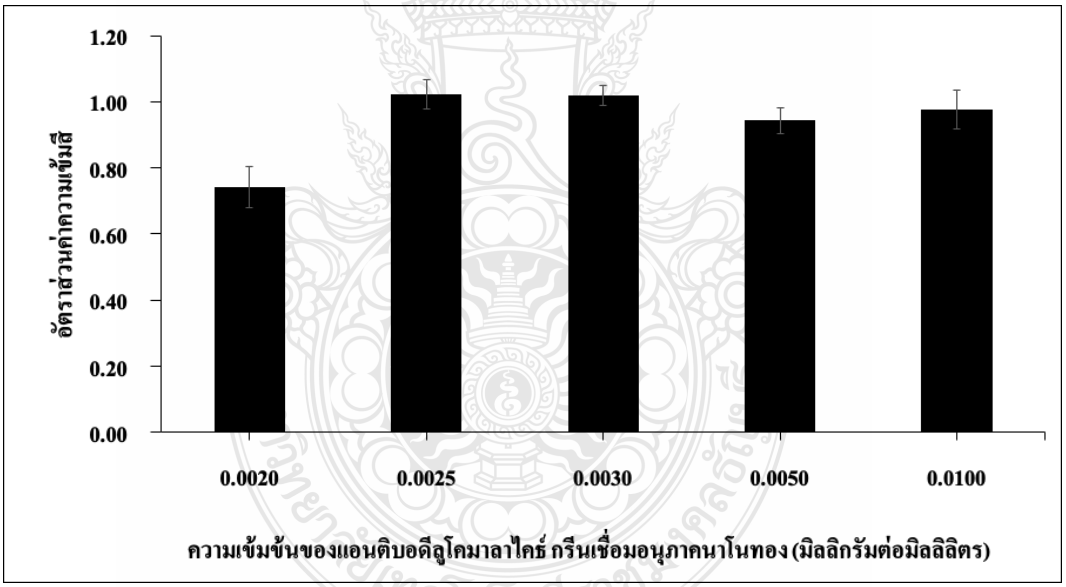
ศึกษาผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีทุติยภูมิสำหรับสร้างเส้นควบคุมเพื่อต้องการให้เส้นทดสอบและเส้นคุมคุมมีค่าความเข้มสีที่เท่ากัน โดยกำหนดคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรสำหรับสร้างเส้นทดสอบ และแอนติบอดีทุติยภูมิสำหรับสร้างเส้นควบคุม โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่า ค่าความเข้มสีของเส้นควบคุมมากขึ้นตามความเข้มข้นของแอนติบอดีทุติยภูมิ แต่ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของแอนติบอดีทุติยภูมิ ให้ค่าความเข้มสีใกล้เคียงคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงตำแหน่งเส้นทดสอบ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สามารถสร้างเส้นทดสอบโดยใช้คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสร้างเส้นควบคุมโดยใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร



ภาพที่ 4.6 ผลของค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม

4.7.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต

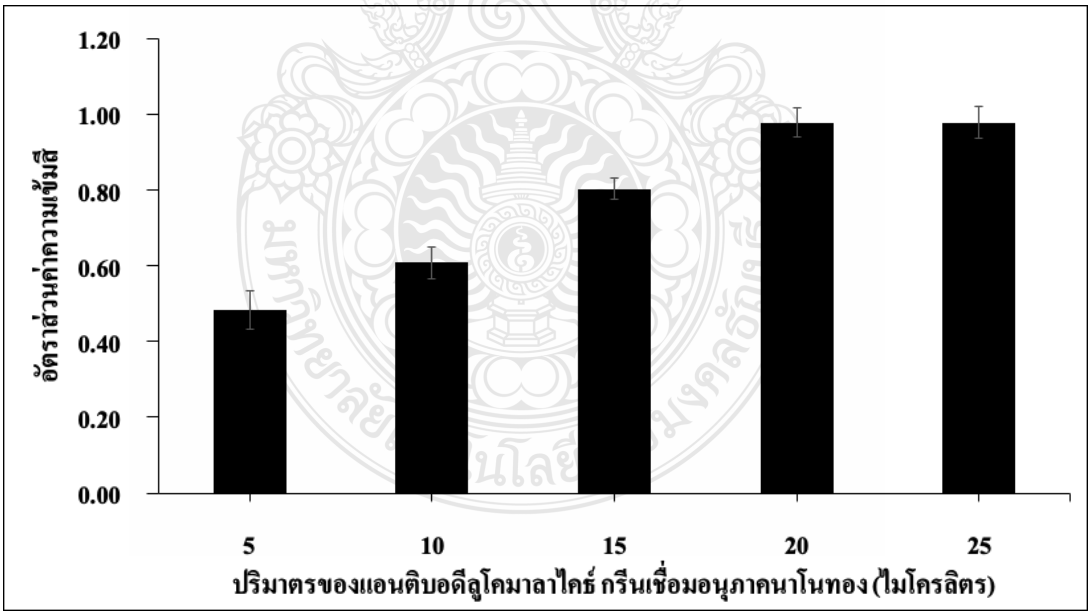
ความเข้มข้นของแอนติบอดีลูโคมาลไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองมีผลต่อค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกตที่ความเข้มข้น 0.0020 0.0025 0.0030 0.0050 และ 0.0100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.7 พบว่า ความเข้มข้นของแอนติบอดีลูโคมาลไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองที่ความเข้มข้น 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีสูงที่สุดและคงที่เมื่อความเข้มข้นของแอนติบอดีลูโคมาลไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองเพิ่มขึ้น เนื่องจากแอนติบอดีลูโคมาลไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองที่ความเข้มข้น 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถจับกับคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบและแอนติบอดีทุติยภูมิตรงเส้นควบคุมได้เหมาะสม เมื่อความเข้มข้นของแอนติบอดีเชื่อมอนุภาคนาโนทองเพิ่มขึ้นจึงไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต คือ 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.7 ผลของเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต

4.7.3 ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต

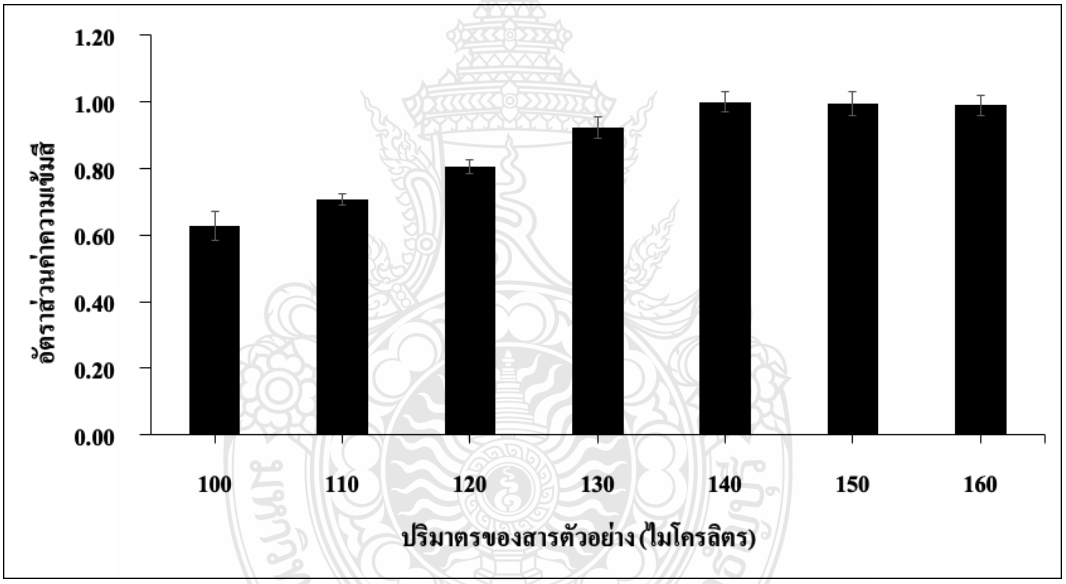
ปริมาตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองมีผลต่อค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์-กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกตที่ปริมาตร 5 10 15 20 และ 25 ไมโครลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.8 พบว่าที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมสูงที่สุด เนื่องจากแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองสามารถจับกับคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบและแอนติบอดีทุติยภูมิตรงเส้นควบคุมได้อย่างเหมาะสม แต่เมื่อปริมาตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองต่ำกว่า 20 ไมโครลิตร อัตราส่วนระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมีค่าลดลง เนื่องจากอัตราส่วนของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองไม่พอดีกับคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบและแอนติบอดีทุติยภูมิตรงเส้นควบคุม และเมื่อปริมาตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองมากกว่า 20 ไมโครลิตร มีอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองที่มากเกินพอ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ปริมาตรของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกตคือ 20 ไมโครลิตร



ภาพที่ 4.8 ผลของปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต

4.7.4 ศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก-สตริป เทส

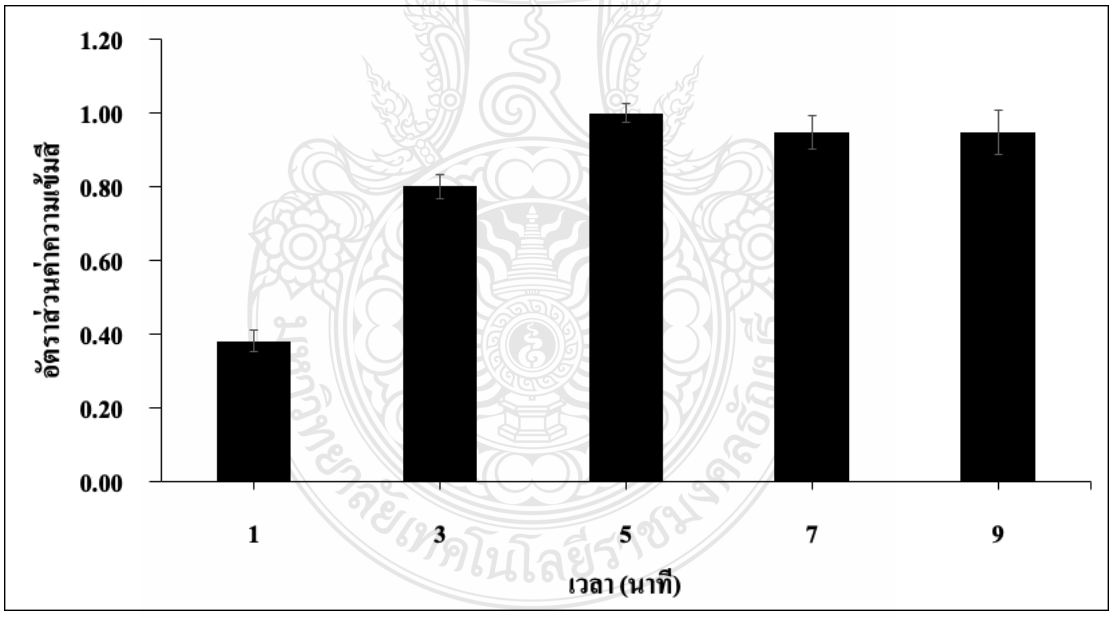
ปริมาตรของสารตัวอย่างมีผลต่ออัตราการไหลของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป-เทสและค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างโดยใช้ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ปริมาตร 100 110 120 130 140 150 และ 160 ไมโครลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.9 พบว่าหากปริมาตรของสารตัวอย่างน้อยกว่า 140 ไมโครลิตร ทำให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมลดลง เนื่องจากปริมาตรของสารตัวอย่างมีไม่มากพอที่จะทำให้เกิดอัตราการไหลจากแผ่นตัวอย่างไปสู่แผ่นดูดซับได้อย่างสมบูรณ์ แต่ที่ปริมาตรของสารตัวอย่างตั้งแต่ 140 ไมโครลิตร ให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมากที่สุด เนื่องจากทำให้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสมีอัตราการไหลคงที่และค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมชัดเจน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ปริมาตรที่ 140 ไมโครลิตรเป็นปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส



ภาพที่ 4.9 ผลของการศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

4.7.5 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

เวลาสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส มีผลต่ออัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเวลาในการตรวจวัดที่เวลา 1 3 5 7 และ 9 นาที โดยใช้ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 เป็นสารตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.10 พบว่าที่เวลาน้อยกว่า 5 นาที สารละลายตัวอย่างยังไม่สามารถไหลจนถึงตำแหน่งแผ่นดูดซับได้อย่างสมบูรณ์ทำให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมีค่าลดลง แต่ที่เวลา 5 นาที อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมากที่สุด เนื่องจากเกิดอัตราการจับกันอย่างสมบูรณ์ของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองกับคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบและแอนติบอดีทุติยภูมิตรงเส้นควบคุม และที่เวลามากกว่า 5 นาที อัตราส่วนค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมมีอัตราคงที่ เนื่องจากเกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์แล้วของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองกับคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบและแอนติบอดีทุติยภูมิตรงเส้นควบคุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสที่เหมาะสม คือ เวลาที่ 5 นาที



ภาพที่ 4.10 ผลการศึกษาเวลาของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ตารางที่ 4.1 สรุปการหาสภาวะที่เหมาะสมของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

สภาวะที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
1. ศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีทุติยภูมิที่เหมาะสมสำหรับสร้างเส้นควบคุม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.1
2. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์-กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.0025
3. ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์-กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต (ไมโครลิตร)	20
4. ศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโคร-มาโตกราฟิก สตริป เทส (ไมโครลิตร)	140
5. ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส (นาที)	5

4.8 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

การหาประสิทธิภาพของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสที่พัฒนาขึ้นมา เพื่อยืนยันการนำไปใช้ได้ของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ว่าสามารถนำไปใช้ได้จริงและสามารถตรวจหาปริมาณของลูโคมาลาไคธ์ กรีนในเชิงกึ่งปริมาณวิเคราะห์ได้ จึงได้มีการหาประสิทธิภาพ ดังนี้

4.8.1 ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

4.8.1.1 ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ทำการทดลองจำนวน 7 ซ้ำ ภายใต้สภาวะเดียวกัน นำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ที่ได้ไปสแกนเพื่อวัดอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม จากนั้นคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) พบว่าค่าที่ได้เท่ากับ 3.54 ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ เนื่องจากเกณฑ์การยอมรับได้ของ % RSD ในช่วงความเข้มข้นระดับไมโครกรัมต่อลิตร จะต้องไม่เกิน 30% แสดงว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูง

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

ครั้งที่	อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม
1	0.80
2	0.78
3	0.77
4	0.74
5	0.81
6	0.76
7	0.74
ค่าเฉลี่ย	0.77
SD	0.03
%RSD	3.54

4.8.1.2 ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ทำการทดลองจำนวน 7 ซ้ำ ภายใต้สภาวะที่ต่างกัน นำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ที่ได้ไปสแกนเพื่อวัดอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม จากนั้นคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าค่าที่ได้เท่ากับ 7.09 ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ เนื่องจากเกณฑ์การยอมรับได้ของ % RSD ในช่วงความเข้มข้นระดับไมโครกรัมต่อลิตร จะต้องไม่เกิน 30% แสดงว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูง

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

ครั้งที่	อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม
1	0.68
2	0.67
3	0.63
4	0.58
5	0.69
6	0.64
7	0.58
ค่าเฉลี่ย	0.64
SD	0.05
% RSD	7.09

4.8.2 ศึกษาความถูกต้องของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

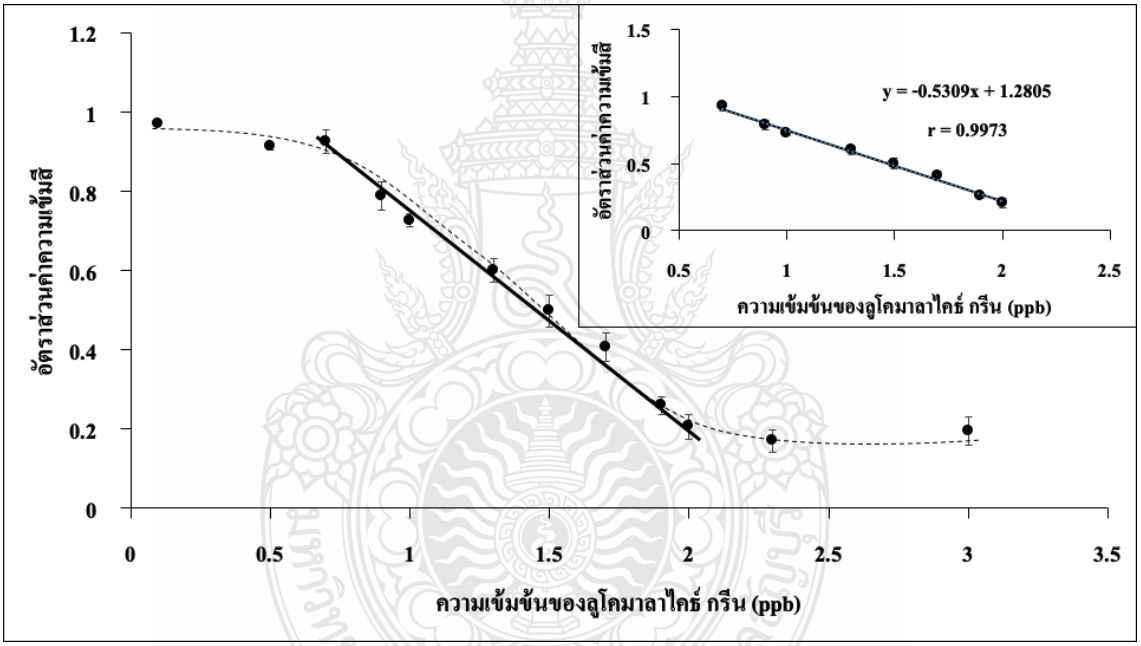
ศึกษาความถูกต้องของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส โดยการศึกษาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเพื่อยืนยันความสามารถของวิธีวิเคราะห์ โดยเติมสารมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 1.3 1.5 และ 1.7 ไมโครกรัมต่อลิตร ลงในสารสกัดจากตัวอย่างจริง จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของลูโคมาลาไคธ์ กรีน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 94-99 % ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (40-120%) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการสกัดและวิธีวิเคราะห์ของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน มีความถูกต้องสูง

ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาความถูกต้องของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีน (ไมโครกรัมต่อลิตร)			เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน
ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
0.00	0.84	0.78	93$\pm$4.63
0.00	1.30	1.26	97$\pm$0.09
0.00	1.50	1.48	99$\pm$0.05
0.00	1.70	1.60	94$\pm$0.04

4.8.3 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาความเป็นเส้นตรงโดยใช้สารมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีนความเข้มข้น 0.1 0.5 0.7 0.9 1.0 1.3 1.5 1.7 1.9 2.0 2.3 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อลิตร นำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป-เทส ที่ได้ไปหาอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ผลการทดลองพบว่าอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส แสดงเส้นสีแดงของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมที่ความเข้มข้น 0.1 – 1.9 ไมโครกรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีนมากกว่า 2 ไมโครกรัมต่อลิตร อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จะแสดงเส้นสีแดงเพียงเส้นเดียวตรงตำแหน่งเส้นทดสอบ จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานเส้นตรง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.12 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีมเพิ่มขึ้น อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมจะลดลง โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.7 – 2 ไมโครกรัมต่อลิตรและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9973



ภาพที่ 4.11 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนค่าความเข้มสีและความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีน

4.8.4 ศึกษาความไววิเคราะห์ของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ศึกษาความไววิเคราะห์โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนค่าความเข้มสีของเส้นทดสอบกับเส้นควบคุมต่อค่าความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีน จากความสัมพันธ์เชิงเส้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0.7 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่ามีความไววิเคราะห์เท่ากับ 0.5309 ไมโครกรัมต่อลิตร

4.8.5 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ โดยใช้สารละลายแบลงค์ ทำการทดลองจำนวน 7 ครั้ง นำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสไปหาอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม จากนั้นคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่าเมื่อคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบมีค่าเท่ากับ 0.24 ไมโครกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.5 อัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมของอิมมูโนโครมาโต กราฟิก-สตริป เทส

ครั้งที่	ความเข้มข้นของแบลงค์ (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	0.39
2	0.55
3	0.65
4	0.57
5	0.44
6	0.56
7	0.54
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (SD)	0.08

โดยขีดจำกัดการตรวจพบคำนวณได้จากสูตร

$$LOD = 3SD$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัด

จะได้ $LOD = 3\ (0.08)$

$= 0.24$ ไมโครกรัมต่อลิตร

4.8.6 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ โดยวัดค่าความเข้มข้นจากสารละลายแบลงค์ จำนวน 7 ครั้ง พบว่าขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 0.80 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีความเที่ยง (% RSD) เท่ากับ 3.4 เปอร์เซ็นต์ และมีความถูกต้องจากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเท่ากับ 87-96 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณเท่ากับ 0.80 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยคำนวณจากสูตร

$$LOQ = 10SD$$

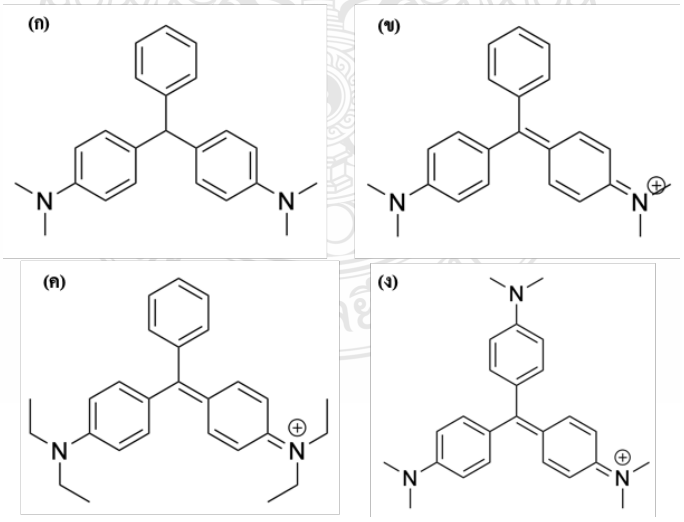
เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัด

จะได้ $LOQ = 10\ (0.08)$

$= 0.80$ ไมโครกรัมต่อลิตร

4.8.7 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

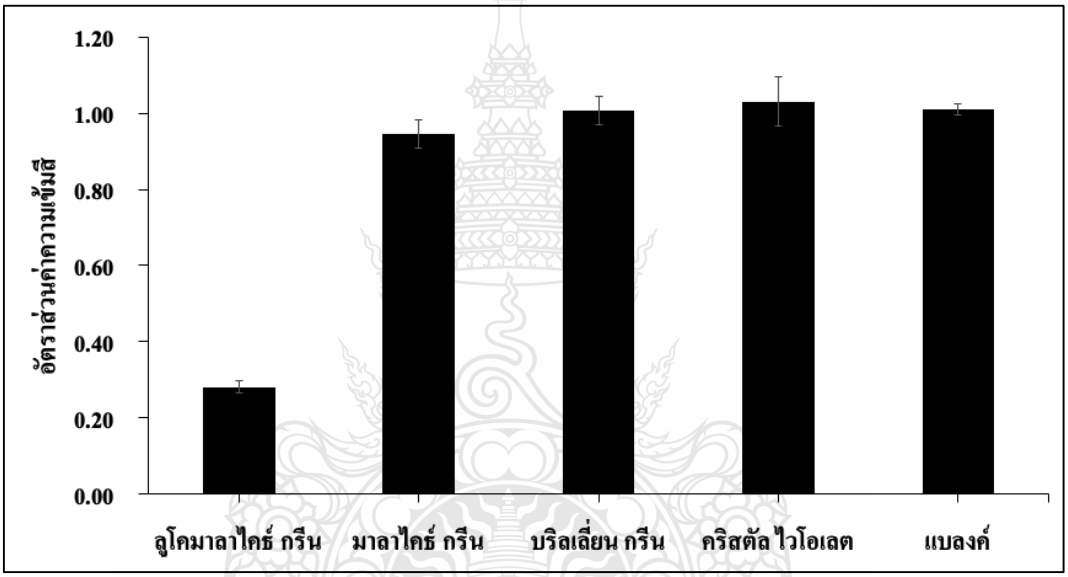
ศึกษาความจำเพาะเจาะจงโดยใช้สารในกลุ่มไตรฟีนิลมีเทน ได้แก่ มาลาไคธ์ กรีน บริลเลี่ยน กรีนและคริสตัล ไวโอเลต โครงสร้างดังภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบกับลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.13 พบว่าสารมาลาไคธ์ กรีน บริลเลี่ยน กรีนและคริสตัล ไวโอเลตให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีที่สูงเท่ากับแบลงค์และลูโคมาลาไคธ์ กรีนให้อัตราส่วนค่าความเข้มสีที่ต่ำ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า อิมมูโนโครมาโตกราฟิก-สตริป เทส มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน



ภาพที่ 4.12 โครงสร้างของสารในกลุ่มไตรฟีนิลมีเทน ได้แก่ ลูโคมาลาไคธ์ กรีน (ก) มาลาไคธ์ กรีน(ข) บริลเลี่ยน กรีน (ค) และคริสตัล ไวโอเลต (ง)

ตารางที่ 4.6 ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

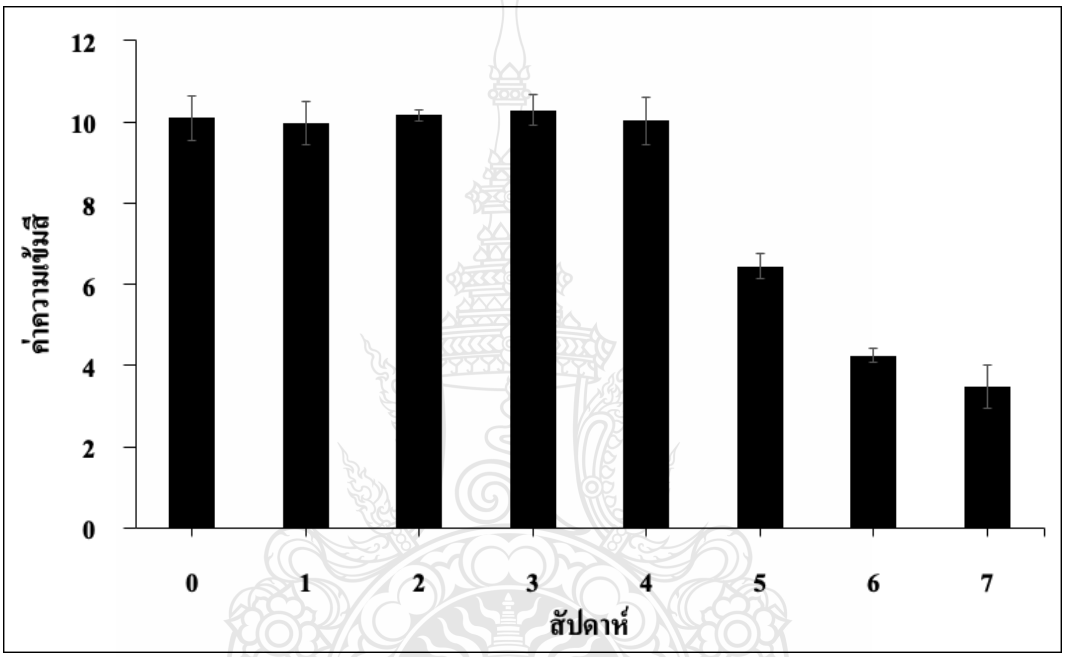
สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนค่าความเข้มสี
ลูโคมาลาไคธ์ กรีน	2	0.28
มาลาไคธ์ กรีน	2	1.01
บริลเลี่ยน กรีน	2	1.01
คริสตัล ไวโอเลต	2	1.03
แบลงค์	-	1.01



ภาพที่ 4.13 ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

4.8.8 ศึกษาอายุการใช้งานของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก ตริป เทส

ศึกษาอายุการใช้งานของสารเคมีที่ใช้ในการสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.00 ทำการทดลองทุกๆ 1 สัปดาห์ จนกว่าผลของค่าความเข้มสีจะมีค่าลดลง จากการทดลองดังภาพที่ 4.14 พบว่า อิมมูโนโครมาโตกราฟิก-สตริป เทสมีอายุการใช้งาน 4 สัปดาห์ ทดสอบด้วยสถิติ *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าความเข้มสีลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน มีอายุการใช้งาน 4 สัปดาห์ ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้กับงานวิจัยอื่น [44]



ภาพที่ 4.14 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

4.9 ตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริงโดยใช้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เปรียบเทียบกับเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์

เมื่อทำการทดลองได้สภาวะและวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว จึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริง พบว่าอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสตรวจไม่พบสารลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ตกค้างในตัวอย่างสัตว์น้ำทั้ง 3 ตัวอย่าง เพื่อยืนยันความถูกต้องของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จึงได้ทำการเปรียบเทียบกับเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์ แอสเสย์ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐาน โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของปริมาณลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริงจำนวน 3 ตัวอย่างและเติมสารมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ ความเข้มข้น 0.9-1.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์-กรีนที่วัดได้ด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส มีค่าใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน เมื่อนำผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐานมาตรวจสอบความแตกต่างของวิธีด้วยสถิติ *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้จากตาราง (ค่าที่ได้จากตารางเท่ากับ 2.920) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณของลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยสถิติ *t*-test

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีน (ไมโครกรัมต่อลิตร)			เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน	
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	ICS*	ELISA
เนื้อสัตว์ 1	0	0.90	1.00	99±1.30	108±1.53
เนื้อสัตว์ 2	0	1.30	1.40	102±4.10	105±1.53
เนื้อสัตว์ 3	0	1.90	1.90	103±0.94	98±1.15

*ICS คือ อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำ โดยอาศัยหลักการทางอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน โดยอิมมูโนโครมาโตกราฟิก-สตริป เทสจะประกอบด้วยแผ่นตัวอย่าง เป็นบริเวณสำหรับใส่สารตัวอย่าง แผ่นคอนจูเกต เป็นบริเวณสำหรับแอนติบอดีเชื่อมอนุภาคนาโนทอง แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ประกอบด้วย 2 เส้น ได้แก่ เส้นทดสอบ เป็นบริเวณของลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมิน และเส้นควบคุม เป็นบริเวณของแอนติบอดีทุติยภูมิ และแผ่นดูดซับ เป็นบริเวณที่ช่วยให้เกิดการเคลื่อนที่อย่างคงที่ของอิมมูโนโครมาโต-กราฟิก สตริป เทส จากนั้นนำส่วนประกอบทั้งหมดไปติดไว้บนแผ่นพลาสติกรองรับเพื่อประกอบเป็นอิมมูโนโครมาโครมาโต กราฟิก สตริป เทส โดยสามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สำหรับการแปรผลในเชิงคุณภาพ เมื่อหยดสารตัวอย่างที่มีลูโคมาลาไคธ์ กรีนลงบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกตจะจับกับลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่มาจากสารตัวอย่างก่อน จึงไม่เหลือแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ว่างพอจะให้จับกับลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบได้ อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสจึงแสดงเส้นสีแดงเพียงเส้นเดียวตรงเส้นควบคุม แต่เมื่อหยดสารตัวอย่างที่ไม่มีลูโคมาลาไคธ์ กรีนลงบนแผ่นตัวอย่างของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สริป เทส แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองจะเคลื่อนที่ไปจับกับลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบและแอนติบอดีทุติยภูมิตรงเส้นควบคุม ทำให้เห็นเส้นสีแดงสองเส้น สำหรับการตรวจวัดเชิงปริมาณ นำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสที่ได้ไปสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมอ่านค่าความเข้มสี คำนวณหาอัตราส่วนค่าความเข้มสีระหว่างเส้นทดสอบและเส้นควบคุม และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของลูโคมาลาไคธ์ กรีนจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนค่าความเข้มสีและความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีน

เมื่อสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ได้แล้ว จึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีทุติยภูมิสำหรับสร้างเส้นควบคุมเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้นและปริมาตรที่เหมาะสมของแอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์-กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกต เท่ากับ 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาตรที่เหมาะสมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก-สตริป เทส เท่ากับ 140 ไมโครลิตร และเวลาที่เหมาะสมสำหรับอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เท่ากับ 5 นาที

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการศึกษาหาประสิทธิภาพของอิมมูโนโครมาโกราฟิก-สตริป เทส โดยผลการทดลองพบว่า อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส มีความเที่ยงสูง (% RSD = 3.54) มีความถูกต้องสูงโดยคำนวณจากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน เท่ากับ 94-99 เปอร์เซ็นต์

มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0.7 – 2 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9973 โดยมีความไววิเคราะห์เท่ากับ 0.5309 ไมโครกรัมต่อลิตร มีขีดจำกัดในการตรวจพบ เท่ากับ 0.24 ไมโครกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ เท่ากับ 0.80 ไมโครกรัมต่อลิตรและมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยมีอายุการใช้งาน 4 สัปดาห์

สุดท้ายนำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสไปตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริง โดยสกัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนจากตัวอย่างด้วยอะซิโตไนไตรล์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าตรวจไม่พบลูโคมาลาไคธ์ กรีนในตัวอย่างจริง เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธี จึงได้ทำการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ความเข้มข้น 0.9 – 1.9 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบกับวิธีเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์ แอสเสย์ พบว่าวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน เท่ากับ 99 – 103 เปอร์เซ็นต์ และวิธีเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์ แอสเสย์ เท่ากับ 98 – 108 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทดสอบความแตกต่างของทั้งสองวิธีด้วยสถิติ *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (*P = 0.05*) พบว่า ผลการทดลองที่ได้ของทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัย สำคัญ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้ในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยมีข้อดีคือ ง่าย รวดเร็ว สามารถใช้งานได้ในภาคสนามและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงในการตรวจวัด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากในงานวิจัยนี้มีการใช้แอนติเจนและแอนติบอดีในความเข้มข้นที่ต่ำและปริมาณน้อย จึงต้องมีความระมัดระวังอย่างมากในขั้นตอนการสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส หากใช้สภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลให้การทดลองคลาดเคลื่อนได้

5.2.2 สารละลายที่ใช้สำหรับสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก จำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชทุกขั้นตอน เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีการทำงานในพีเอชที่เหมาะสมต่างกัน หากไม่มีการควบคุมพีเอชอาจส่งผลให้การแปรผลไม่ถูกต้อง

5.2.3 แสงและอุณหภูมิเป็นสิ่งที่ต้องพึงระวังอย่างมาก เนื่องจากมีผลต่อการทำงานของแอนติบอดีและสเถียรภาพของอนุภาคนาโนทอง หากไม่ควบคุมให้ดี อาจทำให้เสื่อมสภาพได้

บรรณานุกรม

[1] R. Rahkonen and P. Koski, “Post malachite green: Alternative strategies for fungal infections and white spot disease,” *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, vol. 22, pp. 152-157, Jan 2002.

[2] S.J. Culp *et al*, “Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green,” *Journal of Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, vol. 506, pp. 55-63, Mar 2002.

[3] X. Zeng, L. Zhu, F. Zhang, and L. Feng, “Spectroscopic investigations on the binding of leucomalachite green to bovine serum album,” *Journal of Luminescence*, vol. 138, pp. 44-47, Jan 2013.

[4] G. Dowling, P. P. Mulder, C. Duffy, L. Regan, and M. R. Smyth, “Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet in salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Analytica Chimica Acta,* vol. 586, no. 1-2, pp. 411-9, Mar 2007.

[5] N. Hidayah *et al*, “Detection of malachite green and leuco-malachite green in fishery industry,” *Journal of International Food Research*, vol. 20, pp. 1511-1519, Jan 2013.

[6] K. Mitrowska, A. Posyniak, and J. Zmudzki, “Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection,” *Journal of Chromatography A,* vol. 1089, no. 1-2, pp. 187-192, Jul 2005.

[7] J. Ascari, S. Dracz, F. A. Santos, J. A. Lima, M. H. Diniz, and E. A. Vargas, “Validation of an LC-MS/MS method for malachite green (MG), leucomalachite green (LMG), crystal violet (CV) and leucocrystal violet (LCV) residues in fish and shrimp,” *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, vol. 29, no. 4, pp. 602-8, Jan 2012.

[8] T. Le Goff and S. Wood, “Production of malachite green oxalate and leucomalachite green reference materials certified for purity,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 391, no. 6, pp. 2035-2045, Apr 2008.

[9] Y. Jiang, L. Chen, K. Hu, W. Yu, X. Yang, and L. Lu, “Development of a fast ELISA for the specific detection of both leucomalachite green and malachite green,” *Journal of Ocean University of China,* vol. 14, no. 2, pp. 340-344, Jul 2014.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[10] G. Singh *et al*, "Design and characterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green," *Food Additives and Contaminants*, vol. 28, no. 6, pp. 731-739, May 2011.

[11] J. Silva, "Foreword," in 2016 the state of world fisheries and contributing to food security and nutrition for all, Ed. Rome, 2016, pp. 4-5.

[12] J. Silva, "Projections of fisheries, aquaculture and markets," in the state of world fisheries and aquaculture meeting the sustainable development goals, Ed. Rome, 2018, pp. 198-209

[13] M. Mathiesen, "World production of aquatic plants," in the state of world fisheries and aquaculture 2010, Ed. Rome, 2010, pp. 37-39

[14] เกวลิน หนูฤทธิ์, "สถานการณ์การผลิต," ในสถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ในปี 2558, กองพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง, 2558, pp. 1-14.

[15] S. F. Snieszko, "Bacterial Diseases of Fishes and Their Control," *Marine Fisheries Review*, vol. 40, no. 10, pp. 1-2, Oct 1978.

[16] C. Yang and D. Ghosh, LC-MS/MS Analysis of Malachite Green, Leucomalachite Green, Ciprofloxacin, and Tetracycline in Food Samples using a TurboFlow Method, Application Note: 442, 2008

[17] G. Chen and S. Miao, "HPLC Determination and MS Confirmation of Malachite Green, Gentian Violet, and Their Leuco Metabolite Residues in Channel Catfish Muscle," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 58, pp. 7109-7114, May 2010.

[18] A. Bergwerff and P. Scherpenisse, "Determination of residues of malachite green in aquatic animals," *Journal of Chromatography B,* vol. 788, pp. 351-359, Jan 2003.

[19] M. Kaplan, E. O. Olgun, and O. Karaoglu, "A rapid and simple method for simultaneous determination of triphenylmethane dye residues in rainbow trouts by liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A,* vol. 1349, pp. 37-43, May 2014.

[20] G. Stoev and A. Stoyanov, "Comparison of the reliability of the identification with diode array detector and mass spectrometry," *Journal of Chromatography A,* vol. 1150, no. 1-2, pp. 302-311, May 2007.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[21] M. C. Yang *et al.*, "Production of Antibodies for Selective Detection of Malachite Green and the Related Triphenylmethane Dyes in Fish and Fishpond Water," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 55, pp. 8851-8856, Jul 2007.

[22] B. Luppa, J. Sokoll and W. Chan, "Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry," *Clinica Chimica Acta,* vol. 314, pp. 1-26, Jul 2001.

[23] C. Li *et al.*, "Development of an immunochromatographic assay for rapid and quantitative detection of clenbuterol in swine urine," *Food Control,* vol. 34, pp. 725-732, Jun 2013.

[24] X. Liu et al., "Colloidal gold nanoparticle probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of chromium ions in water and serum samples," *Analytica Chimica Acta*, vol. 745, pp. 99-105, Oct 2012.

[25] W. C. Andersen *et al.*, "Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green," *Analytica Chimica Acta,* vol. 637, no. 1-2, pp. 279-289, Apr 2009.

[26] E. B. Bahadır and M. K. Sezgintürk, "Lateral flow assays: Principles, designs and labels," *Trends in Analytical Chemistry,* vol. 82, pp. 286-306, Sep 2016.

[27] J. Singh, S. Sharma, and S. Nara, "Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water," *Food Chemistry,* vol. 170, pp. 470-83, Mar 2015.

[28] R. Tovey and A. Baldo, "Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods,* vol. 19, pp. 169-184, Apr 1989.

[29] L. Wang *et al.*, "An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 26, pp. 3059-3062, Feb 2011.

[30] J. Hu *et al.*, "Advances in paper-based point-of-care diagnostics," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 54, pp. 585-597, Apr 2014.

[31] M. Sajid, A. Kawde and M. Daud, "Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review," *Journal of Saudi Chemical Society,* vol. 19, pp. 689-705, Nov 2015.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[32] S. H. Ang, M. Rambeli, T. M. Thevarajah, Y. B. Alias, and S. M. Khor, "Quantitative, single-step dual measurement of hemoglobin A1c and total hemoglobin in human whole blood using a gold sandwich immunochromatographic assay for personalized medicine," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 78, pp. 187-193, Apr 2016.

[33] J. Shen *et al.*, "Immunochromatographic assay for quantitative and sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen using highly luminescent quantum dot-beads," *Talanta,* vol. 142, pp. 145-149, Sep 2015.

[34] P. Preechakasedkit *et al.*, "Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of Salmonella typhi in human serum," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 31, pp. 562-466, Jan 2012.

[35] S. Sakamoto, G. Yusakul, B. Pongkitwitoon, H. Tanaka, and S. Morimoto, "Colloidal gold-based indirect competitive immunochromatographic assay for rapid detection of bioactive isoflavone glycosides daidzin and genistin in soy products," *Food Chemistry,* vol. 194, pp. 191-195, Mar 2016.

[36] B.-H. Liu, K. C. Chu, and F.-Y. Yu, "Novel monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M1 in milk," *Food Control,* vol. 66, pp. 1-7, Aug 2016.

[37] L. Panawala. (2017, Oct 30). Difference Between Monoclonal and Polyclonal Antibodies [Online]. Available: https://pediaa.com

[38] W.Burry, "Controls for Immunocytochemistry: An Update," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry,* vol. 59, pp. 6-12, Feb 2011.

[39] A. R. Prado *et al.*, "Comparison between the synthesis of gold nanoparticles with sodium citrate and sodium tetraboreto," *BMC Proceedings,* vol. 8, no. 4, Oct 2014.

[40] W. Shim *et al.*, "Development of immunochromatographic strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the Rapid Detection of alfratoxin B1 in grain and feed samples," *Journal of microbiology and biotechnology,* vol. 17, pp. 1629-1637, Jun 2007.

[41] Y. Jiang, L. Chen, K. Hu, W. Yu, X. Yang, and L. Lu, "Development of a fast ELISA for the specific detection of both leucomalachite green and malachite green," *Journal of Ocean University of China,* vol. 14, no. 2, pp. 340-344, 2014.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[42] V. O. Santos *et al.*, "A novel immunochromatographic strip test for rapid detection of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins in genetically modified crops," *Analytical Methods,* vol. 7, no. 21, pp. 9331-9339, Sep 2015.

[43] C. Feraudet-Tarisse *et al.*, "Highly sensitive sandwich immunoassay and immunochromatographic test for the detection of *Clostridial* epsilon toxin in complex matrices," *Public Library of Science One,* vol. 12, no. 7, p.1-23, Jul 2017.

[44] Y. Zhou *et al.*, "Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 24, pp. 2744-2747, Apr 2009.

[45] Y. Wang *et al.*, "Novel haptens synthesis and development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for leuco-malachite green in fish," *Food and Agricultural Immunology,* vol. 28, no. 6, pp. 1460-1476, Jul 2017.

[46] M. Jazayeri, H. Amani, A. Pourfatollah, H. Toroudi and B. Sedighimoghaddam, "Various method of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies," *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 9, pp. 17-22, Apr 2016

ภาคผนวก
ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ Pure and Applied Chemistry International Conference 2019 (PACCON 2019) ระหว่างวันที่ 7-8 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค แขวงบางนาใต้ เขตบางนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร

Pure and Applied Chemistry International Conference PACCON 2019

The development of competitive immunochromatographic strip test for detection of leucomalachite green residual in aquatic animals

Uraiwan Wongtongdee[1], Siriwan Teepoo[1]* and Pongsathon Phapugrangkul[2]

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology Rajamangala, University of Technology Thanyaburi, Thanyaburi, Pathumthani 12110, Thailand*

[2]*Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Khlong Luang, PathumThani, 12120, Thailand*

**E-mail: siriwan@mail.rmutt.ac.th*

Abstract

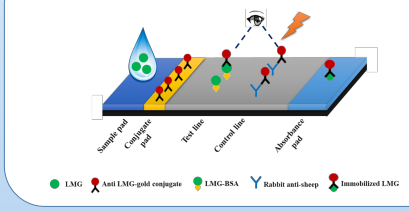
Development of competitive immunochromatographic strip test was developed for detection of leucomalachite green (LMG) in aquatic animals. To achieve a qualitative and semi-quantitative immunochromatographic strip test analytical ability, two test lines were designed on NC membrane to form the test line and control line. The carboxy LMG-bovine serum albumin and rabbit anti-sheep were immobilized on test line and control line, respectively. Anti-LMG polyclonal-gold conjugate was added onto the conjugate pad to fabricate competitive immunochromatographic strip test. The appearance of red color resulting from anti-LMG gold conjugate binding with LMG on the test zone was observed by naked eyes as a qualitative and semi-quantitative signal. This immunochromatographic strip test can be completed within 5 min after dipping the strip into analytes with a limit of detection of 2 µg/L. The developed competitive immunochromatographic strip test provided several advantages such as rapid, cost-effective and convenient tool for the determination of LMG without special instrumentation.

Objective

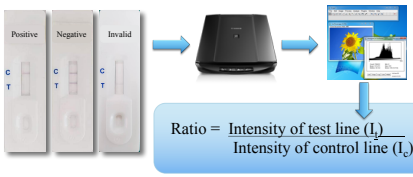
- To develop a competitive immunochromatographic strip test for detection of LMG

Methodology

- Composition of immunochromatographic strip test

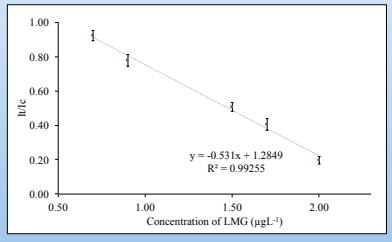


- The detection of LMG



$$\text{Ratio} = \frac{\text{Intensity of test line } (I_t)}{\text{Intensity of control line } (I_c)}$$

Result and Discussion



Conclusion

The development of competitive immunochromatographic strip test for detection of LMG has a standard curve indicated linear range from 0.7 to 2.0 µg/L, the linear equation was $y = -0.531x + 1.2849$ and a reliable correlation of coefficient ($R^2 = 0.99255$). The proposed strip test was alternative tool for semi-quantitative detection of LMG on-site.

Acknowledgment

- Science and Technology faculty, Rajamangala University of Technology Thanyaburi
- Thailand Institute of Scientific and Technological Research
- Separation and Trace analysis laboratory, RMUTT

PACCON
Pure and Applied Chemistry International Conference 2019
TOGETHER FOR THE BENEFIT OF MANKIND

This is to certify that

Miss Uraiwan Wongtongdee

has participated in

The Pure and Applied Chemistry International Conference 2019
'Together for the Benefit of Mankind'
February 7 - 8, 2019, Bangkok, THAILAND

Supa Hannongbua
Professor Dr. Supa Hannongbua
President of the Chemical Society of Thailand

Pranee Phinyocheep
Associate Professor Dr. Pranee Phinyocheep
Conference Chair
Head of Department of Chemistry, Mahidol University, Thailand

เข้าร่วมประกวดผลงานสิ่งประดิษฐ์ระดับอุดมศึกษาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ครั้งที่ 8 (The 8th RMUTT Young Talent Inventor Awards 2019) วันที่ 8 พฤษภาคม พ.ศ. 2562 ณ ห้องประชุมสงค์ธนาพิทักษ์ อาคารสำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟสำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำ

อุไรวรรณ วงษ์ทองดี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ลักษณะผลงาน

ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน เป็นอุปกรณ์ที่อาศัยหลักการของอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส แบบแข่งขัน ประกอบด้วยเส้นทดสอบและเส้นควบคุม โดยเส้นทดสอบจะเป็นเส้นของแอนติเจนลูโคมาลาไคธ์ กรีน และเส้นควบคุมจะเป็นเส้นของเซคันแดรี่ แอนติบอดี สำหรับการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน อิมมูโนโครมาโตกราฟิก-สตริป เทส จะแสดงผลการตรวจสอบแบบแปลผกผัน คือ หากสารตัวอย่างที่ไม่มีลูโคมาลาไคธ์ กรีน อิมมูโนโครมา-โตกราฟิก สตริป เทส จะแสดงผลการตรวจสอบมีเส้นสีแดง 2 เส้นที่บริเวณเส้นทดสอบและเส้นควบคุม หากตัวอย่างที่มีลูโคมาลาไคธ์ กรีน อิมมูโนโครมาโต-กราฟิก สตริป เทส จะแสดงเส้นสีแดงเพียง 1 เส้นตรงบริเวณเส้นควบคุม โดยพบว่าชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโท-กราฟ สามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ได้ในความเข้มข้นที่กฎหมายกำหนด ที่ความเข้มข้น 2 µg/kg

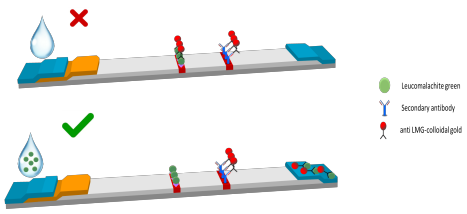
ความเป็นนวัตกรรม

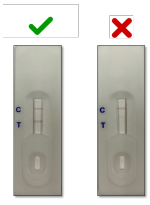
ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟสามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ได้ในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ มีข้อดีคือ

- สามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ได้ตามกฎหมายกำหนด อย่างแม่นยำและรวดเร็ว
- ใช้งานง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงในการตรวจวัด
- สามารถใช้งานได้ในภาคสนาม
- ราคาถูก

การนำผลงานไปใช้ในเชิงพาณิชย์

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำของประเทศไทยมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำอาจมีการปนเปื้อนของสารลูโคมาลาไคธ์-กรีน ซึ่งสหภาพยุโรปได้มีการกำหนดห้ามตรวจพบสารลูโคมาลาไคธ์ กรีน ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำเกิน 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป-เทสที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้ต่ำกว่าที่เกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด โดยงานวิจัยนี้สามารถเป็นทางเลือกหนึ่งให้กับผู้เลี้ยงสัตว์น้ำหรือบริษัทส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ เพื่อตรวจสอบการตกค้างของสารลูโคมาลาไคธ์ กรีนก่อนการส่งออกได้





อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ศิริวรรณ ตี้กู่ และ ดร.พงศธร ประภักรางกูล

ข้อมูลสอบถามเพิ่มเติม (Email) : siriwan@mail.rmutt.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ขอมอบเกียรติบัตรนี้ไว้เพื่อแสดงว่า

นางสาวอุไรวรรณ วงษ์ทองดี

ได้นำผลงานเข้าร่วมประกวดผลงานสิ่งประดิษฐ์ระดับอุดมศึกษา
The 8th RMUTT Young Talent Inventor Awards 2019
ผลงานเรื่อง

ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟ สำหรับตรวจหาลูโคมาลาไคท์ กรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำ

ในวันพุธที่ 8 พฤษภาคม 2562
ณ ห้องประชุมสงค์ธนาพิทักษ์ ชั้น 1 อาคารสำนักงานอธิการบดี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ปิ่นปฐมรัฐ)
อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 11 การประชุมวิชาการระดับนานาชาติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 10 “วิถีราชมงคลขับเคลื่อนนวัตกรรมเพื่อสร้างสรรค์เศรษฐกิจและสังคม” ระหว่างวันที่ 24 – 26 กรกฎาคม 2562 ณ ศูนย์ประชุมและแสดงสินค้านานาชาติเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลครั้งที่ 11
และการประชุมวิชาการระดับนานาชาติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 10
"วิถีราชมงคลขับเคลื่อนนวัตกรรม...เพื่อสร้างสรรค์เศรษฐกิจและสังคม"
ระหว่างวันที่ 24 – 26 กรกฎาคม 2562 ณ ศูนย์ประชุมและแสดงสินค้านานาชาติ เชียงใหม่

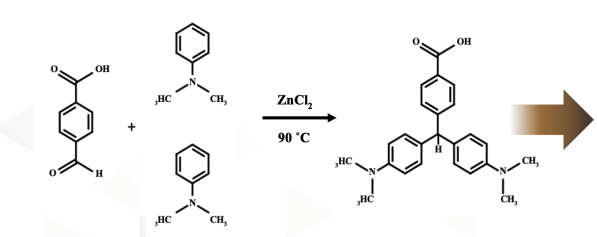
The synthesis of carboxy-leucomalachite green for the fabrication of immunochromatographic strip test to detect leucomalachite green

Uraiwan Wongtongdee, Pongsathon Phapugrangkul and Siriwan Teepoo

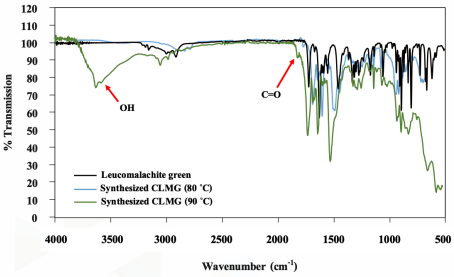
ABSTRACT

Malachite green has been widely used in the aquaculture industry as anti-parasitic and anti-fungal because of its high efficiency and low cost. Malachite green is easily reduced into its reducing form, a leucomalachite green in meat tissue. Leucomalachite green may pose a potential hazard to human health because it is carcinogenic and mutagenic. Therefore, in this research we developed an immunochromatographicstrip test for detection of leucomalachite green. Frist step, The carboxy-leucomalachite green was synthesized using 4-formylbenzoic acid, N,N-dimethylaniline and zinc chloride. According to the results, it was found that the optimal condition for synthesis of carboxy-leucomalachite green was 90 ºC. The chemical structure of carboxy leucomalachite green was characterized by fourier-transform infrared spectroscopy. Then synthesized carboxy leucomalachite green was conjugated with bovine serum albumin to fabricate immunochromatographic strip test. The developed immunochromatographic strip test can detect leucomalachite green at the lowest concentration of 2 µg/kg.

Characterization of synthesized CLMG

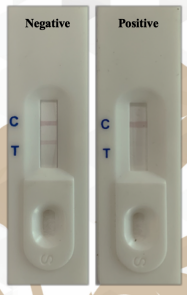


4-formylbenzoic acid N,N-dimethyl aniline Carboxy-leucomalachite green



The advantages of synthesis carboxy-leucomalachite green method for detection of leucomalachite green with immunochromatographic strip test

- Easy method for synthesis of CLMG
- Not used the complicated synthesis equipment
- Qualitative detection of LMG
- Rapid test
- On-site detection



รหัสสาขา (session) S6

รหัสนำเสนอบทความ: PN1-224-007

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา
ขอมอบเกียรติบัตรฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

อุไรวรรณ วงษ์ทองดี

ได้เข้าร่วมการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์เรื่อง

การสังเคราะห์คาร์บอกซีลูโคมาลาไดธ์กรีนสำหรับสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป
เทสเพื่อตรวจวัดลูโคมาลาไดธ์กรีน

ในการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 11 (11th RMUTNC)
ระหว่างวันที่ 24 – 26 กรกฎาคม 2562
ณ ศูนย์ประชุมและแสดงสินค้านานาชาติเฉลิมพระเกียรติ 7 รอบพระชนมพรรษา เชียงใหม่

(รองศาสตราจารย์ศิลศิริ สง่าจิตร)
ผู้ปฏิบัติหน้าที่อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

ตีพิมพ์งานวิจัยในวารสารการประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 10 ประจำปี 2562 เลขที่บทความ 224 ในหัวข้อเรื่อง การสังเคราะห์คาร์บอกซีลูโคมาลาไคธ์กรีนสำหรับสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสเพื่อตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์กรีน

การสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนสำหรับสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสเพื่อตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

(The synthesis of carboxy-leucomalachite green for the fabrication of immunochromatographic strip test to detect leucomalachite green)

อุไรวรรณ วงษ์ทองดี[1], พงศธร ประภักรางกูล[2] และศิริวรรณ ตี๋ภู่[1*]
(Uraiwan Wongtongdee[1], Pongsathon Phapugrangkul[2] and Siriwan Teepoo[1*])

บทคัดย่อ

มาลาไคธ์ กรีนนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อราและกำจัดพยาธิที่เกิดในสัตว์น้ำ เนื่องจากมาลาไคธ์ กรีนมีประสิทธิภาพสูงและราคาถูก มาลาไคธ์ กรีนสามารถถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็นลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้ง่ายในเนื้อเยื่อสัตว์ ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเป็นสารอันตรายต่อร่างกายทำให้เป็นมะเร็งและเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เพื่อตรวจหาลูโคมาลาไคธ์ กรีน ขั้นแรกสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนโดยใช้ 4-ฟอร์มิลเบนโซอิค แอซิด N,N –ไดเมทิลอะนิลีน และสังกะสีคลอไรด์ ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์คือที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี จากนั้นนำคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่สังเคราะห์ได้มาเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน เพื่อสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ผลการทดลองพบว่าอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ที่ได้พัฒนาขึ้นมาสามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

คำสำคัญ : คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน, อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส, ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

ABSTRACT

Malachite green has been widely used in the aquaculture industry as anti-parasitic and anti-fungal because of its high efficiency and low cost. Malachite green is easily reduced into its reducing form, a leucomalachite green in meat tissue. Leucomalachite green may pose a potential hazard to human health because it is carcinogenic and mutagenic. Therefore, in this research we developed an immunochromatographicstrip test for detection of leucomalachite green. Frist step, The carboxy-leucomalachite green was synthesized using 4-formylbenzoic acid, N,N-dimethylaniline and zinc chloride. According to the results, it was found that the optimal condition for synthesis of carboxy-leucomalachite green was 90 ºC. The chemical structure of carboxy leucomalachite green was characterized by fourier-transform infrared spectroscopy. Then synthesized carboxy leucomalachite green was conjugated with bovine serum albumin to fabricate immunochromatographic strip test. The developed immunochromatographic strip test can detect leucomalachite green at the lowest concentration of 2 µg/kg.

Keywords : carboxy-leucomalachite green, immunochromatographicstrip test**,** leucomalachite green

---

[1] สาขาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ตำบลคลองหก อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12110

[1] Department of applied chemistry, Faculty of science and technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Klong Hok, Khlong Luang, Pathum Thani 12110, Thailand

[2] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ตำบลคลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

[2] Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Khlonk Hok, Khlong Luang, PathumThani, 12120, Thailand

ผู้นิพนธ์ประสานงานไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail) : siriwan@mail.rmutt.ac.th

1. บทนำ

มาลาไคธ์ กรีน (Malachite green) เป็นสารเคมีชนิดสีย้อมในกลุ่มของไตรฟีนิลมีเทน (Triphenylmethane dye) ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาโรคระบาดที่เกิดในสัตว์น้ำ เช่น โรคจากเชื้อรา (Saprolegniasis) โรคติดเชื้อปรสิต (Parasitosis) และโรคเหงือกเน่า (Rotten gill disease) เมื่อสัตว์น้ำได้รับมาลาไคธ์ กรีนเข้าไปจะถูกเปลี่ยนเป็นลูโคมาลาไคธ์ กรีน (Leucomalachite green) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และจะสะสมอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำเป็นเวลานานถึง 40 วัน [1] หากมนุษย์รับประทานสัตว์น้ำที่มีการตกค้างของลูโคมาลาไคธ์ กรีนเข้าไป จะส่งผลให้เป็นโรคมะเร็ง ทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ และอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อร่างกายมนุษย์ [2] ดังนั้นสหภาพยุโรปจึงได้มีการกำหนดห้ามตรวจพบสารลูโคมาลาไคธ์ กรีนในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ โดยจะต้องมีปริมาณไม่เกิน 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม [3]

การตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ สามารถตรวจวัดได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography : HPLC) [4] เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) [5] และเทคนิคทางสี (Colorimetric) [6] เทคนิคดังกล่าวมีความไวในวิเคราะห์และมีความแม่นยำสูง แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ จึงได้มีการนำเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor) มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ เทคนิคเอนไซม์-ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์-แอสเสย์ (Enzyme- linked immunosorbent assay : ELISA) [7,8] เป็นเทคนิคที่อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของแอนติเจนและแอนติบอดี แต่เทคนิคนี้ต้องใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน โดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ซึ่งเป็นอุปกรณ์อย่างง่ายที่ใช้สำหรับตรวจสอบในด้านคุณภาพวิเคราะห์หรือด้านปริมาณวิเคราะห์ของสารตัวอย่างโดยไม่จำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการซึ่งจะอาศัยหลักการทางอิมมูโนเซนเซอร์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อโรค ยา สารเสพติด ฮอร์โมน สารชีวทางการแพทย์ อาหารและสิ่งแวดล้อม ซึ่งนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส เป็นเทคนิคที่ตรวจวัดได้รวดเร็ว ใช้เวลาในการตรวจวัดน้อย ใช้งานง่ายในภาคสนามและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

สำหรับการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนโดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ต้องนำลูโคมาลาไคธ์ กรีนไปเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมินเพื่อสร้างเป็นเส้นทดสอบ ซึ่งลูโคมาลาไคธ์ กรีนไม่สามารถเชื่อมติดกับไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนผ่านแรงดึงดูดทางไฟฟ้าได้ (Electrostatic repulsion) [9] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน โดยการเพิ่มหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ทำให้ลูโคมาลาไคธ์ กรีนสามารถเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน เพื่อสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสได้

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมี

สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนและเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน ได้แก่ 4-ฟอร์มิลเบนโซอิกแอซิด N,N-ไดเมทิลอะนิลีน แอนไฮดรัสสังกะสีคลอไรด์ เอทานอล เมทานอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1-[3-(ไดเมทิลอะมิโน)โพรพิล]-3-เอทิลคาร์โบดิไมด์ เมไธโอไดด์ (EDC) จาก Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) และโบวินซีรั่มอัลบูมิน (BSA) จาก EMD Millipore (Billerica, MA, USA)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้สำหรับตรวจสอบโครงสร้างของคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนและตรวจสอบการเชื่อมติดกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน ได้แก่ เครื่องฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, FTIR) รุ่น iD7 ATR NICOLET iS5 จาก Thermo scientific (Waltham, MA, US) และเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมีเตอร์ รุ่น UV-1601 ยี่ห้อ Shimadzu (Kyoto, Tokyo, Japan)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ได้แก่ แผ่นตัวอย่าง แผ่นดูดซับ ยี่ห้อ EMD Millipore (Billerica, MA, USA) แผ่นคอนจูเกตจาก Whatman (Maidstone, Kent, UK) แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน จาก UniSart® (Concord, CA, USA) และแผ่นพลาสติกรองรับจาก Lohmann (Hebron, KY, USA).

2.3 การสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

สังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์กรีน ดัดแปลงจาก [10] โดยผสม 4-ฟอร์มิลเบนโซอิกแอซิด ปริมาณ 450 มิลลิกรัม N,N-ไดเมทิลอะนิลีน ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และแอนไฮดรัสสังกะสีคลอไรด์ ปริมาณ 1.2 กรัม ละลายในเอทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปรีฟรักซ์ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมเมทานอล ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 5.00 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะเกิดตะกอนสีเขียวขึ้นมาและกรองตะกอนออก จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 การเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน

เชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมินโดยใช้ คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ได้จากการสังเคราะห์จากข้อ 2.3 ปริมาณ 20 มิลลิกรัม โบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาณ 8 มิลลิกรัม และ 1-[3-(ไดเมทิลอะมิโน) โพรพิล]-3-เอทิลคาร์โบดิไมด์ เมไทโอไดด์ ปริมาณ 240 มิลลิกรัม ผสมลงใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กวนต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง [11] จากนั้นนำไปไดอะไลซีสในสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ที่อุณหภูมิ 4 องศา-

เซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำสารละลายคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมินมาทดสอบการเชื่อมติดด้วยเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay) โดยใช้สารละลายคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ 0.1 โมลาร์ คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในไมโครเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างไมโครเพลทด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักของโบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง บล็อกพื้นที่ว่างของไมโครเพลทด้วย 1 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักของโบวินซีรั่มอัลบูมินที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักของโบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมไบโอติน ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างไมโครเพลทด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักของโบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง เติม 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที ล้างด้วย 0.05 เปอร์เซ็น ทวีน 80 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง เติม 3,3',5,5' เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและ 0.5 โมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายสีฟ้า จากนั้นเติม 0.5 โมลาร์ กรดซัลฟูริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดการเกิดปฏิกิริยา จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร [12]

2.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนสำหรับเชื่อมโบวินซีรั่ม-อัลบูมิน

สังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์กรีนโดยผสม 4-ฟอร์มิลเบนโซอิกแอซิด ปริมาณ 450 มิลลิกรัม N,N-ไดเมทิลอะนิลีน ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และแอนไฮดรัสสังกะสีคลอไรด์ ปริมาณ 1.2 กรัม ที่ละลายในเอทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปรีฟรักซ์ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยศึกษาอุณหภูมิสำหรับการสังเคราะห์ที่ 80 และ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมเมทานอล ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 5.00 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะเกิดตะกอนสีเขียวและกรองตะกอนออก ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนของคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนมาเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน โดยใช้คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ได้จากการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียสปริมาณ 20 มิลลิกรัม โบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาณ 8 มิลลิกรัมและ 1-[3-(ไดเมทิลอะมิโน)โพรพิล]-3-เอทิลคาร์โบดิไมด์ เมไทโอไดด์ ปริมาณ 240 มิลลิกรัม ผสมลงใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ปริมาตร

2 มิลลิลิตรและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กวนต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไดอะไลซีสในสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.00 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำสารละลายคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน มาทดสอบการเชื่อมติดด้วยเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ โดยใช้สารละลายคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ 0.1 โมลาร์ คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในไมโครเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างไมโครเพลทด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักของโบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง บล็อกพื้นที่ว่างของไมโครเพลทด้วย 1 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักของโบวินซีรั่มอัลบูมินที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักของโบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมไบโอติน ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างไมโครเพลทด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มี 1 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักของโบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง เติม 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที ล้างด้วย 0.05 เปอร์เซ็น ทวีน 80 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง เติม 3,3',5,5' เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและ 0.5 โมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายสีฟ้า จากนั้นเติม 0.5 โมลาร์ กรดซัลฟูริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยเกณฑ์การพิจารณา เลือกคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์-กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินในสภาวะการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิเหมาะสมที่ให้ค่าดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด

2.6 การตรวจวัดโครงสร้างทางเคมีของคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

การวิเคราะห์หาหมู่คาร์บอกซีลิกที่ได้จากการสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน สามารถตรวจสอบหมู่ฟังก์ชั่นได้โดยใช้เทคนิคฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี สแกนโดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้

Cell : Diamond cell

Number of scan : 64 ครั้ง

Collection length : 102.4 วินาที

Scan range : 4,000 – 400 ต่อเซนติเมตร

Resolution : 4 ต่อเซนติเมตร

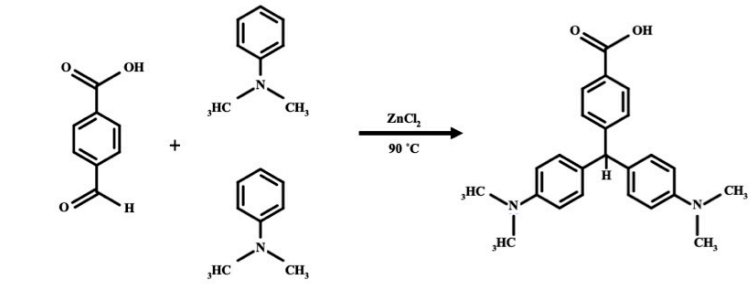
2.7 การสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน

อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส ประกอบด้วย 1) แผ่นตัวอย่าง (Sample pad) เป็นบริเวณสำหรับใส่สารตัวอย่างและช่วยให้เกิดการกระจายตัวของสารตัวอย่างให้แพร่ไปยังบริเวณถัดไป 2) แผ่นคอนจูเกต (Conjugate pad) เป็นบริเวณสำหรับแอนติบอดีเชื่อมกับอนุภาคนาโนทอง 3) แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) เป็นบริเวณสำหรับการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งจะประกอบด้วยสองเส้น ได้แก่ เส้นทดสอบ (Test line) เป็นบริเวณสำหรับแอนติเจน และเส้นควบคุม (Control line) เป็นบริเวณสำหรับแอนติบอดีทุติยภูมิ (Secondary antibody) 4) แผ่นดูดซับ (Absorption pad) เป็นบริเวณสำหรับควบคุมสารตัวอย่างให้มีอัตราการไหลคงที่ด้วยแรงแคพิลลารี (Capillary force) และ 5) แผ่นพลาสติกรองรับ (Backing card) โดยอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จะมีขนาดเท่ากับ 4x60 มิลลิเมตร โดยเริ่มจากนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน มาสร้างเส้นทดสอบด้วยคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเส้นควบคุมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่สร้างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมแล้วไปบล็อกด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มีโบวินซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นสร้างแผ่นคอนจูเกตโดยนำแผ่นคอนจูเกต ขนาด 4x10 มิลลิเมตร มาบล็อกด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.20 ที่มีโบวินซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นำสารละลายแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทอง ความเข้มข้น 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่นคอนจูเกตที่บล็อกแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แผ่นคอนจูเกต แผ่นดูดซับและแผ่นตัวอย่าง ขนาด 4x18 มิลลิเมตร มาวางลงบนแผ่นพลาสติกรองรับ ตามลำดับ จะได้อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส สำหรับตรวจวัดลูโคมาลา-ไคธ์ กรีน จากนั้นนำอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสไปตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 ไมโครกรัมต่อลิตร

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

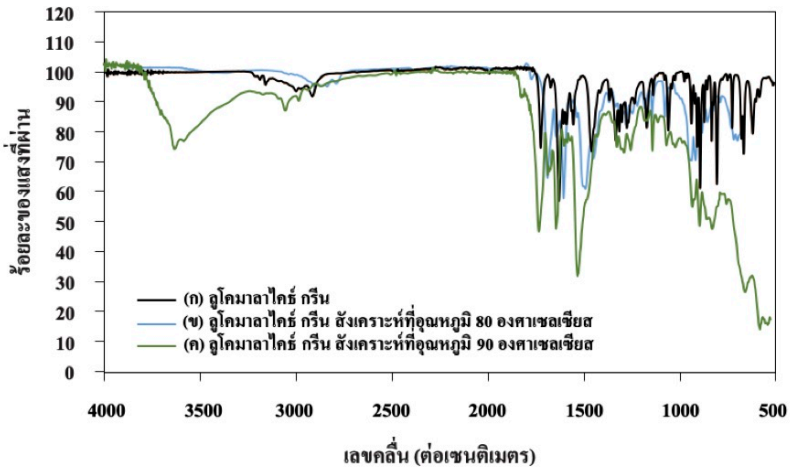
3.1 การสังเคราะห์และตรวจสอบคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

สังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 4-ฟอร์มิลเบนโซอิค แอซิด และ N,N-ไดเมทิลอะนิลีนในอัตราส่วน 1:2 ดังภาพที่ 1 โดยแอนไฮดรัสสังกะสีคลอไรด์ที่ละลายในเอทานอลทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลการสังเคราะห์พบว่าได้สารละลายสีน้ำเงิน ซึ่งมีพีเอชประมาณ 3 จากนั้นปรับสารละลายให้มีพีเอชเท่ากับ 5.00 พบว่าจะเกิดตะกอนของ คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน จากนั้นนำตะกอนที่สังเคราะห์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่ 80 และ 90 องศาเซลเซียสไปตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานฟอร์ม-อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แสดงให้เห็นถึงหมู่ฟังก์ชั่นของหมู่คาร์บอกซิลิก ($-CO_2H$) ได้แก่ หมู่คาร์บอนิล (C=O double bond) ที่ช่วงเลขคลื่น 1,500 – 1,800 cm^{-1} และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ช่วงเลขคลื่น 3,200 – 3,600 cm^{-1} แสดงว่าสามารถสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน โดยเพิ่มหมู่คาร์บอกซิลิกได้ [8] ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีน ซึ่งไม่ปรากฏร้อยละของแสงที่ผ่านในช่วงดังกล่าว เนื่องจากสารมาตรฐานลูโคมาลาไคธ์ กรีนไม่มีหมู่ฟังก์ชั่นของหมู่คาร์บอกซิลิก



4-ฟอร์มิลเบนโซอิค แอซิด N,N –ไดเมทิลอะนิลีน คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน

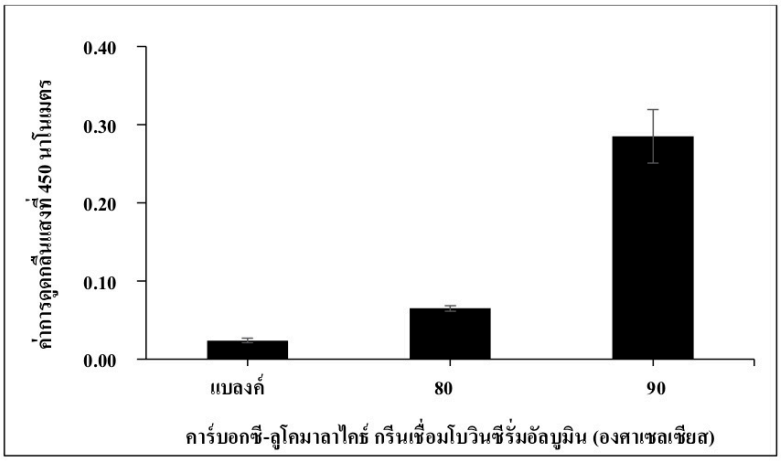
ภาพที่ 1 แสดงกระบวนการสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีน



ภาพที่ 2 แสดงสเปกตรัมของ (ก) ลูโคมาลาไคธ์ กรีน (ข) คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 80 และ (ค) 90 องศาเซลเซียส

3.2 การเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน

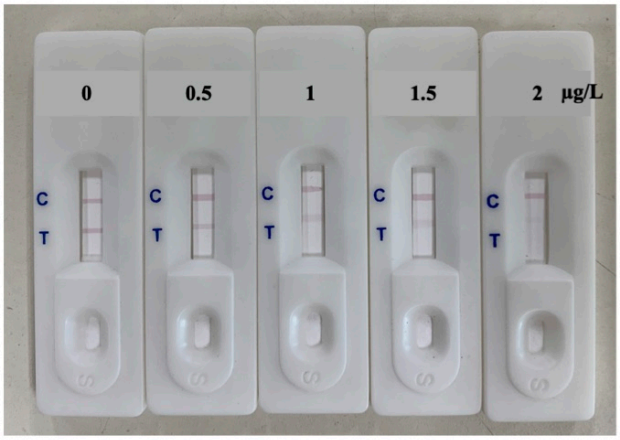
นำสารคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่สังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียสมาเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน โดยทดสอบการเชื่อมติดด้วยเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ พบว่าคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ได้จากการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่ได้จากการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เนื่องจากในการสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนจำเป็นต้องใช้สังกะสีคลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยา เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้อนุภาคมีพลังงานจลน์มากขึ้น ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสและสามารถเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนกับโบวินซีรั่มอัลบูมินได้ แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงผลของการเชื่อมคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินด้วยเทคนิคเอนไซม์-ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์ โดยเปรียบเทียบระหว่างสารละลายแบลงค์ (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์-กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินที่สังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจสอบลูโคมาลาไคธ์ กรีนด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จะประกอบด้วยเมมเบรนที่มีสองเส้น คือเส้นทดสอบ (T) และเส้นควบคุม (C) โดยเส้นทดสอบเป็นเส้นของคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมิน และเส้นควบคุมเป็นเส้นของแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนทองซึ่งอยู่บนแผ่นคอนจูเกต ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงการตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 ไมโครกรัมต่อลิตร ด้วยอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส

ผลการทดลองพบว่า เมื่อหยดสารตัวอย่างที่ไม่มีลูโคมาลาไคธ์ กรีน อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จะแสดงเส้นสีแดง 2 เส้นตรงเส้นทดสอบและเส้นควบคุม เนื่องจากสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ด้วยแรงแคพิลแลรี่ ทำให้แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกตเคลื่อนที่ไปจับกับลูโคมาลาไคธ์-กรีนเชื่อมโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบ และแอนติบอดีทุติยภูมิตรงเส้นควบคุม และเมื่อหยดสารตัวอย่างลูโคมาลาไคธ์ กรีน ความเข้มข้น 0 - 2 ไมโครกรัมต่อลิตร อิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส จะแสดงเส้นสีแดงตรงเส้นควบคุมแต่จะแสดงเส้นสีแดงตรงเส้นทดสอบจางลงตามความเข้มข้นของลูโคมาลาไคธ์ กรีนที่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก ลูโคมาลาไคธ์ กรีนจากสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ไปจับกับแอนติบอดีของลูโคมาลาไคธ์กรีนที่เชื่อมอนุภาคนาโนทองบนแผ่นคอนจูเกตก่อน จึงทำให้แอนติบอดีลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมอนุภาคนาโนทองไม่สามารถจับกับลูโคมาลาไคธ์ กรีนเชื่อมกับโบวินซีรั่มอัลบูมินตรงเส้นทดสอบได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สามารถสร้างอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทสสำหรับตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้

4. สรุปผลการวิจัย

การสังเคราะห์คาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนประสบความสำเร็จได้โดยใช้ 4-ฟอร์มิลเบนโซอิค แอซิด N,N–ไดเมทิลอะนิลีน และสังกะสีคลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิยา โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์คือ 90 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน จากการศึกษาพบว่าวิธีการสังเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีข้อดี คือ ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ในการสังเคราะห์ที่ยุ่งยาก เมื่อนำคาร์บอกซี-ลูโคมาลาไคธ์ กรีนไปเชื่อมกับโบวินซีรั่ม-อัลบูมินด้วยพันธะโควาเลนต์ และนำไปสร้างเป็นอิมมูโนโครมาโตกราฟิก สตริป เทส พบว่าสามารถตรวจวัดลูโคมาลาไคธ์ กรีนได้ในเชิงคุณภาพ ใช้งานง่าย รวดเร็ว และสามารถใช้งานในภาคสนามได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิต ระดับปริญญาโท-เอก จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ขอขอบคุณหน่วยวิจัยฟิสิกส์วัสดุและเครื่องมือวัดที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] X. Zeng, L. Zhu, F. Zhang, and L. Feng, "Spectroscopic investigations on the binding of leucomalachite green to bovine serum album," *Journal of Luminescence*, vol. 138, pp. 44-47, 2013.

[2] J. Yang et al., "Simultaneous detection of malachite & leucomalachite green based on dual template CdTe@MIP via normal and synchronous fluorescence quenching," *Dyes and Pigments*, vol. 155, pp. 171-178, 2018.

[3] Z. Hall, C. Hopley, and G. O'Connor, "High accuracy determination of malachite green and leucomalachite green in salmon tissue by exact matching isotope dilution mass spectrometry," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 874, no. 1-2, pp. 95-100, Oct 15 2008.

[4] Z. Lin, Y. Zhang, H. Peng, D. Lin, L. Li, Y. Huang, "Determination of malachite green in aquatic products based on magnetic molecularly imprinted polymers, " *Food Chemistry*, vol. 200, pp. 32-37, 2016.

[5] M. Sacara, C. Cristea, and M. Muresan, "Electrochemical detection of Malachite Green using glassy carbon electrodes modified with CeO_2 nanoparticles and Nafion, " *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 792, pp. 23-30, 2017.

[6] R. Shalaby, H. Emam, and M. Anwar, "Mini-column assay for rapid detection of malachite green in fish, " *Food Chemistry*, vol. 226, pp. 8-13, 2017.

[7] L. Li, H. Peng, Z. Lin, P. Zhong, M. Chen, and Y. Huang, "Biomimetic ELISA detection of malachite green based on molecularly imprinted polymer film, " *Food Chemistry*, vol. 229, pp. 403-408, 2017.

[8] C.Yang et al., "Production of antibodies for selective detection of malachite green and the related triphenylmethane dyes in fish and fishpond water, " *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, pp. 8851-8856, 2007.

[9] S.C. Lowa, R. Shaimia, Y. Thandaithabanya, J.K. Lima, A.L. Ahmada, and A. Ismailb, "Electrophoretic interactions between nitrocellulose membranes and proteins: Biointerface analysis and protein adhesion properties," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 110, pp. 248-253, 2013.

[10] H. Xu et al., "Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total malachite green and crystal violet residues in fishery products," *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, vol. 93, no. 9, pp. 959-969, 2013.

[11] Y. Jiang, L. Chen, K. Hu, W. Yu, X. Yang, and L. Lu, "Development of a fast ELISA for the specific detection of both leucomalachite green and malachite green," *Journal of Ocean University of China*, vol. 14, no. 2, pp. 340-344, 2014.

[12] W. Xing et al., "Development of a sensitive and group-specific polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of malachite green and leucomalachite green in water and fish samples," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 89, no. 13, pp. 2165-2173, 2009.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวอุไรวรรณ วงษ์ทองดี

วัน เดือน ปีเกิด 26 ตุลาคม 2536

ที่อยู่ 5/5 ถนนโสภณธรรมประชา ตำบลหนองแค อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี 18140

การศึกษา ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

เบอร์โทรศัพท์ 098-2784159

อีเมล์ praewerchem@gmail.com