



## รายงานการวิจัย

### ชื่อโครงการ

การพัฒนาเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนต์เพื่อตรวจสอบเชื้อโรคในอาหารอย่างรวดเร็ว  
Development of Rapid Fluorogenic Methods for Foodborne Pathogens

### จัดทำโดย

รศ.ดร.ประเวทย์ ต้อยเต็มวงศ์  
ดร.กิตติศักดิ์ชัย แนนจันทร์  
ดร.อารี ทัตติยพงษ์  
ผศ.ดร.ภณทิรา เกตุแก้ว  
รศ.ดร.ฉรณี ต้อยเต็มวงศ์  
ดร.อรรวรรณ ชุณหชาติ  
รศ.ชัยวัฒน์ กิติกุล

ศูนย์ความปลอดภัยอาหาร สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี  
และ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนต์เพื่อตรวจสอบเชื้อโรคในอาหารอย่างรวดเร็ว (Development of Rapid Fluorogenic Methods for Foodborne Pathogens) ได้รับการสนับสนุนทุนจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2555 ในประเภททุน การวิจัยที่มุ่งเป้าตอบสนองความต้องการในการพัฒนาประเทศ 11 กลุ่มเรื่องและ 9 กลุ่มเรื่องด่วน ในกลุ่มเรื่อง เทคโนโลยีใหม่และเทคโนโลยีที่สำคัญเพื่ออุตสาหกรรม

คณะผู้ทำวิจัย

## บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อเพิ่มสัญญาณแทนการเพิ่มจำนวนเชื้อเป้าหมายทำให้ตรวจหาเชื้อก่อโรคได้อย่างรวดเร็ว ทดแทนวิธีดั้งเดิมซึ่งเน้นการเพิ่มจำนวนเชื้อที่ทำให้ใช้เวลานาน มีความไวต่ำ ใช้เครื่องมืออุปกรณ์จำนวนมาก ในขณะเดียวกันได้สังเคราะห์อนุภาคเฟอร์ไรต์แมกเนติก เพื่อใช้จับแยกเชื้อโรคหรืออนุภาคซิลิกา ออกจากสารละลายเพื่อสะดวกในการวิเคราะห์

การสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาใช้วิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจลทำได้สำเร็จ ได้อนุภาคที่มีรูปร่างกลม มีความคงตัวสูง เรืองแสงได้นาน และง่ายต่อการติดฉลากด้วยสารชีวโมเลกุล และขนาดของอนุภาคขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำกับสารลดแรงตึงผิว ( $W_o$ ) อัตราส่วนโดยโมล ของตัวช่วยของสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว ( $P$ ) ปริมาณสารตั้งต้น (TEOS) และปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา ( $NH_4OH$ ) โดยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อขนาดอนุภาค อนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นมีโมเลกุลสีฟลูออเรสเซนซ์ (RubPy dye) นับพันโมเลกุลแทรกอยู่ในโครงร่างซิลิกา ซึ่งช่วยปกป้องโมเลกุลสีจากการถูกชะล้างโดยออกซิเจนจากสิ่งแวดล้อมทำให้สามารถคงการเรืองแสงได้นาน เมื่อตัดแปรพารามิเตอร์ที่ผิวอนุภาคทำให้เกิดหมู่เอมีน และแทนที่ด้วยหมู่คาร์บอกซิล เพื่อติดฉลากแอนติบอดีที่ผิวอนุภาค แล้วนำไปทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรค *Salmonella*, *Campylobacter* และ *Vibrio cholera* O139 พบว่าการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์และจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีอนุภาค FDS-NPs จำนวนมากเกาะที่ผิวของเชื้อตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย

กรณีการสังเคราะห์อนุภาคเฟอร์ไรต์แมกเนติกใช้วิธี polyol technique พบว่า สามารถสังเคราะห์อนุภาค amino-MNPs ได้ที่อุณหภูมิ 121 °C, 2 ชั่วโมง/รอบ จำนวน 3 รอบ การศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคด้วยเทคนิคการกระจายแสงรังสีเอกซ์ (XRD/EDS) ยืนยันได้ว่าอนุภาค amino-MNPs เป็นอนุภาคแม่เหล็กบริสุทธิ์ขนาด  $43 \pm 9$  nm ที่มีสมบัติเข้าใกล้ super-paramagnetic ผลวิเคราะห์จาก FT-IR แสดงว่ามีหมู่เอมีนบนอนุภาคจริง ทำให้สามารถยึดเกาะกับแอนติบอดีได้ประมาณ 7.20  $\mu g/mg$  โดยมีกลูตาไรลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมต่อ สามารถจับเชื้อเป้าหมายเข้มข้น 1.6 cells/ml ได้ ทำให้เพิ่มความสะดวกในการตรวจพบเชื้อด้วยการลดเวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อ

โดยสรุป การวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาที่มีสารสีฟลูออเรสเซนซ์ในอนุภาคปริมาณมาก และสังเคราะห์อนุภาคเฟอร์ไรต์แมกเนติกได้ ตามวัตถุประสงค์ พร้อมกับศึกษาสมบัติด้านต่างๆ ของอนุภาค ปรับพื้นผิวเพื่อติดฉลากด้วยแอนติบอดีทำให้เข้าเกาะกับเชื้อเป้าหมายเป็นจำนวนมากได้ ทำให้เชื้อโรคนั้นมีสารฟลูออเรสเซนซ์เข้าเกาะรวมกว่า  $10^6$  โมเลกุล/เซลล์ จึงเห็นได้ชัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ การใช้อนุภาคฟลูออเรสเซนซ์ซิลิกานาโนมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีที่ใช้กันอยู่เดิมมาก วิธีนี้จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคอย่างรวดเร็ว มีความไวต่อเชื้อสูง นอกจากนี้ยังสามารถนำอนุภาคไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ในลักษณะเดียวกัน เช่นการใช้ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้อนุภาคจับโปรตีน หรือสารสำคัญอื่นๆ ออกจากสารละลายได้ด้วย

คำสำคัญ : อนุภาคซิลิกาฟลูออเรสเซนซ์/ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน/ เทคนิคโซลเจล/ แอนติบอดี/ อะมิโนฟังก์ชันัลไลส์ เฟอร์ไรต์แมกเนติก / ซาลโมเนลลา อี โคไล โอ 157 เอช 7

## Abstract

The objectives of this study were to develop fluorescent dye-doped silica and ferromagnetic particles (FDS-NPs) to be used as signal reporter and capturer of pathogens to replace the time consuming conventional method which the target cells were means to increase.

Silica fluorescent particles (FDS-NPs) was successfully synthesized using sol-gel with water in oil microemulsion technique. The particles were round with high photostability. The surfaces of these nanoparticles were modified to enable bioconjugation with antibodies. Mole ratio of water to surfactant ( $W_o$ ), surfactant (P), precursor (TEOS), and catalyst (NaOH) affected formation of the particles.  $NH_4OH$  played an important role on the size of particles. Thousands of fluorescent dye (Rubpy) molecules were encapsulated in the silica matrix, which protected the dye from photodamaging oxidation. The FDS-NPs were extremely bright and photostable. Thousands of the antibody labeled FDS-NPs attached themselves to the surface of the pathogens and could be detected easily under the fluorescence microscopy.

The synthesis of antibody conjugated amino-functionalized magnetic particles (amino-MNPs) for enhancing sensitivity of the detection of foodborne pathogens was also carried out. The amino-MNPs were successfully synthesized using modified polyol technique at 121 °C, 2 hours/cycle for 3 cycles. The XRD and FTIR patterns identified the particles as faced center cubic with amino functional groups on the surface and average  $43 \pm 9$  nm in diameter. Amounts of NaOH affected to the rates of MNP formation. Results indicated that MNPs coated directly with purified IgGs against the pathogen could separate a very low amount of cells of *E. coli* O157:H7 (1.6 CFU/ml).

In conclusion, the dye doped bioconjugated silica fluorescent and ferromagnetic particles were successfully synthesized. The target bacteria were swarmed by the particles resulting in coated with about  $10^6$  of fluorescent dye molecules. They were easily observed under a fluorescent microscope. It is envisaged that the FDS-NPs were promising for detection of pathogens in food samples with great sensitivity than that of the conventional. The particles could also be employed in the similar tasks for detection and separation.

Keywords : Fluorescent doped-Silica Nanoparticles / Water in Oil Microemulsion / Sol-Gel / Antibody / Amino functionalized ferromagnetic particles

## สารบัญเรื่อง Table of Contents

เรื่อง	หน้า
<b>ส่วนประกอบตอนต้น</b>	
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
Abstract	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
บทนำรวมของแผนงานวิจัย	11
<b>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</b>	<b>12</b>
<b>ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ</b>	<b>13</b>
<b>ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง</b>	
<b>โครงการที่ 1 บทคัดย่อภาษาไทย</b>	<b>14</b>
Abstract	15
บทนำโครงการ	16
การทบทวนวรรณกรรม	16
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	17
ระเบียบและวิธีดำเนินการวิจัย	17
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	20
เอกสารอ้างอิง	51
สรุปผลและข้อเสนอแนะ	52
รายนามผู้วิจัย โครงการที่ 1	53
<b>โครงการที่ 2 บทคัดย่อภาษาไทย</b>	<b>54</b>
Abstract	54
บทนำโครงการ Introduction	55
การทบทวนวรรณกรรม Review of Literatures	55
ระเบียบและวิธีดำเนินการวิจัย Materials and Methods	69
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล Results and Discussion	73
สรุปผลการวิจัย Conclusion	90
เอกสารอ้างอิง References	91
รายนามผู้วิจัย โครงการที่ 2	92

## สารบัญตาราง List of Tables

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
1.1	ปัจจัยที่มีผลต่อรูปร่าง และขนาดของอนุภาค FDS-NPs	32
1.2	ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ $W_o = 6$	34
1.3	ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ $P = 5$	35
1.4	ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ TEOS เท่ากับ 0.05 ml	36
1.5	ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ $NH_4OH$ เท่ากับ 0.09 ml	36
1.6	ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปัจจัยร่วมของ $W_o = 6$ , $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ $NH_4OH = 0.09$ ml	36
2.1	Immunoglobulin types (isotypes)	66
2.2	Chemical and physical forces involved in antigen-antibody bonding	67
2.3	Parameters and size of amino-MNPs at various conditions	77
2.4	Elemental components of amino-MNPs	79
2.5	Capture efficiency of IgG coated MNPs to <i>E. coli</i> O157:H7	87
2.6	Capture of uncoated MNPs to <i>E. coli</i> O157:H7	88
2.7	Capture of IgG coated MNPs to non- <i>E. coli</i> O157:H7	89

## สารบัญรูป List of Figures

รูปที่	เรื่อง	หน้า
1.1	การสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ด้วยไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เสถียร	22
1.2	การตกตะกอนของอนุภาค FDS-NPs มีลักษณะเป็นเจลใสสีส้ม	22
1.3	อนุภาค FDS-NPs มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีส้ม	22
1.4	อนุภาค FDS-NPs (ก) ก่อน และ (ข) หลังทำให้กระจายใน 95% เอทานอล	23
1.5	การเรืองแสงของอนุภาค FDS-NPs ใน 95% เอทานอล เมื่อถูกกระตุ้นด้วยblack light ที่ความยาวคลื่น 354 nm	23
1.6	อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo) เท่ากับ 6 (ก), 9 (ข) และ 12 (ค) 100 kV (Scale bar = 100 nm)	24
1.7	การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo) เท่ากับ 6, 9 และ 12	25
1.8	ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo) เท่ากับ 6, 9 และ 12	25
1.9	อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ (ก) 3, (ข) 5 และ (ค) 7 100 kV (Scale bar = 100 nm)	26
1.10	การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ 3, 5 และ 7	27
1.11	ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ 3, 5 และ 7	27
1.12	อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่ปริมาณของ TEOS เท่ากับ (ก) 0.05 ml (ข) 0.10 ml และ (ค) 0.15 ml 100 kV (Scale bar = 100 nm)	28
1.13	การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณของ TEOS เท่ากับ 0.1 ml, 0.5 ml และ 0.15 ml	29
1.14	ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณของ TEOS เท่ากับ 0.1 ml, 0.5 ml และ 0.15 ml	29
1.15	อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่ปริมาณของ $\text{NH}_4\text{OH}$ เท่ากับ (ก) 0.03 ml, (ข) 0.06 ml 100 kV (Scale bar = 100 nm) และ (ค) 0.09 ml (Scale bar = 50 nm)	30
1.16	การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณของ $\text{NH}_4\text{OH}$ เท่ากับ 0.03 ml, 0.06 ml และ 0.09 ml	31
1.17	ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ $\text{NH}_4\text{OH}$ เท่ากับ 0.03 ml, 0.06 ml และ 0.09 ml	31
1.18	อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM จากผลของปัจจัยร่วม (Wo = 6, P = 5,	33

	TEOS = 0.05 ml และ $\text{NH}_4\text{OH}$ = 0.09 ml) 100 kV (Scale bar = 50 nm)	
1.19	การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs จากผลของปัจจัยร่วม $W_o = 6$ , $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ $\text{NH}_4\text{OH}$ = 0.09 ml	33
1.20	ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ $W_o = 6$	34
1.21	ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ $P = 5$	35
1.22	ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ TEOS เท่ากับ 0.05 ml	35
1.23	ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ $\text{NH}_4\text{OH}$ เท่ากับ 0.09 ml	36
1.24	ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปัจจัยร่วมของ $W_o = 6$ , $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ $\text{NH}_4\text{OH}$ = 0.09 ml	37
1.25	ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs จากการสังเคราะห์ที่ (ก) $W_o = 6$ , (ข) $P = 5$ , (ค) TEOS = 0.05 ml, (ง) $\text{NH}_4\text{OH}$ = 0.09 ml และ (จ) ปัจจัยร่วมของ $W_o = 6$ , $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ $\text{NH}_4\text{OH}$ = 0.09 ml	38
1.26	ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุภาค FDS-NPs ที่ $W_o = 6$ (A), $P = 5$ (B), TEOS = 0.05 ml (C), $\text{NH}_4\text{OH}$ = 0.09 ml (D) และปัจจัยร่วมของ $W_o = 6$ , $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ $\text{NH}_4\text{OH}$ = 0.09 ml (E)	39
1.27	ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (excitation wavelength) ของสารละลายสีฟลูออเรสซิน (Rubpy dye)	39
1.28	ความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง ออกมา (emission wavelength) ของสารละลายสีฟลูออเรสซิน (Rubpy dye)	40
1.29	ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (excitation wavelength) ของอนุภาค FDS-NPs	40
1.30	ความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง (emission wavelength) ของอนุภาค FDS-NPs	41
1.31	ความคงอยู่ของการเรืองแสงของสารละลายสีฟลูออเรสซิน	41
1.32	ความคงอยู่ของการเรืองแสง ของสารละลายสีฟลูออเรสซินเปรียบเทียบกับอนุภาค FDS-NPs	42
1.33	FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs ก่อนดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค	42
1.34	FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีน	43
1.35	FTIR Spectrum ของ อนุภาค FDS-NPs (ก) ก่อน และ (ข) หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคด้วย (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTS)	44
1.36	FT-Raman spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีนที่ผิวอนุภาค	45
1.37	FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล	46
1.38	FTIR spectrum ของอนุภาค FDS-NPs (ก) ก่อน และ (ข) หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคด้วย trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) และ succinic anhydride	46



1.39	FT-Raman spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล	47
1.40	แสดงการกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการสังเคราะห์ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x	48
1.41	การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการดัดแปลงหมู่เอมีนภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x	48
1.42	การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิลภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 40,000x	49
1.43	การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการติดแอนติบอดี ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x	49
1.44	การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการติดแอนติบอดี ภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 25,000x	50
1.45	แสดงความเข้มข้นของ NaCl ในระดับต่างๆ ตั้งแต่ 5 mM – 25 mM โดยกำหนดที่ 0 mM เป็นความเข้มข้นตัวอย่างมาตรฐาน	50
2.1	Cyano group modification and coating of antibodies onto silica nanoparticles.	62
2.2	Amino group modification and coating of antibodies onto silica	63
2.3	Schematic showing the distribution of ions around a charged particle	64
2.4	Time, temperature and pressure of the reaction cycles during the amino-MNP synthesis	73
2.5	Amino-MNP powder at various amounts of NaOH and 2 h reaction cycles. Letters denote amount of NaOH at A = 1.25%, B = 2.50% and C = 3.75% while numbers indicate reaction cycle	74
2.6	TEM images at 150000x showing the amino-MNPs prepared at various amounts of NaOH and 2 h reaction cycles. Letters denote amount of NaOH at A = 1.25%, B = 2.50% and C = 3.75% while numbers indicate reaction cycle. The bar in each TEM image represents 100 nm.	75
2.7	Parameters and size of amino-MNPs at various conditions	78
2.8	Elemental components of amino-MNPs	79
2.9	EDS spectrum showed elemental components of amino-MNPs	80
2.10	XRD pattern of (A) amino-MNPs and (B) standard XRD pattern of Magnetite	80
2.11	Magnetization curves of (A) amino-MNPs and (B) hysteresis loop of magnetization curve	81
2.12	Photographs of amino-MNPs dispersed in water and after were	82

	separated from the solution by attraction to a magnet	
2.13	FT-IR spectrum of amino-MNPs	83
2.14	Amount of IgGs on MNPs after incubation at different conditions. “Glu treated” refers to Glutaraldehyde treated MNPs and “Untreated” refers of MNPs without any treatments	84
2.15	Zeta potential at various ionic strength of amino-MNPs (uncoated MNPs) and IgG coated MNPs	85
2.16	Effects of incubation time on the binding of IgG coated MNPs onto <i>E. coli</i> O157:H7. The initial concentration of bacteria was $1.3 \times 10^3$ CFU/ml	86
2.17	Capture of IgG coated MNPs to non- <i>E. coli</i> O157:H7	90

## บทนำรวมของแผนงานวิจัย

ปัจจุบันมีความพยายามในการพัฒนาปรับปรุงวิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคให้มีความรวดเร็ว และมีความไวสูง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ ซึ่งมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไปหลายหลักการ ได้แก่ Immunofluorescent antibody technique (Brayton *et al.*, 1987; Nakamura *et al.*, 1993) Time-resolved immunofluorometric assay (Soukka *et al.*, 2001; Valanne *et al.*, 2005), Immunomagnetic separation (Bruce and Sen, 2005), Quantum dot (Medintz *et al.*, 2005; Michalet *et al.*, 2008), Plasmon resonance immunosensors (Brynda *et al.*, 1999), Flow cytometry (Gunasekera *et al.*, 2002), และ bioconjugated particles (Zhao *et al.*, 2004) เป็นต้น

อนุภาค ฟลูออเรสเซนต์ และ เฟอร์โรแมกเนติก เป็นทางเลือกสำคัญอันหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในอาหารได้รวดเร็ว เทคนิคนี้เป็นการใช้จุดแข็งของศาสตร์การวิเคราะห์เชื้อก่อโรค เพราะเมื่อดีนีมีสมบัติในการเข้ายึดจับสารชีวโมเลกุลที่ต้องการตรวจสอบอย่างเฉพาะเจาะจง โดยการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาขนาดเล็กที่หุ้มสารเรืองแสงจำนวนมากไว้ภายใน จากนั้นใช้โมเลกุลของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อโรคเป้าหมายมาเกาะ (bioconjugate) ไว้กับตัวอนุภาค เมื่อนำอนุภาคเหล่านั้นไปใช้ตรวจหาเชื้อโรคนั้นในวัตถุดิบอาหาร อนุภาคที่มีแอนติบอดีเชื่อมอยู่จะเข้าไปยึดจับกับแอนติเจนบนตัวของเชื้อโรคเป้าหมาย และสามารถตรวจจับหรือวัดสัญญาณการเรืองแสงให้เห็นได้อย่างชัดเจน ในขณะที่เดียวกันอนุภาคเฟอร์โรแมกเนติกทำให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เป้าหมายได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องรอการเจริญของเชื้อ

## ความสำคัญและที่มาของปัญหา

วิธีการวิเคราะห์เชื้อทั่วไปสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคในอาหารได้ตั้งแต่ ประมาณ  $10^3$ - $10^5$  cells/g ขึ้นไป จึงต้องเสียเวลาไม่น้อยกว่า 18-24 ชั่วโมงหรือมากกว่าในการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ให้มีปริมาณอยู่ในระดับที่เครื่องมือหรือชุดทดสอบ สามารถตรวจวัดได้ (detection limit) ปัจจุบันวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อหรือสารพันธุกรรมของเชื้ออย่างรวดเร็วเพื่อให้ตรวจวัดได้ในเวลารวดเร็ว แต่ก็ยังใช้เวลานานไม่น้อยกว่า 18 ชั่วโมงในการเพิ่มจำนวนเชื้อ และ 4 ชั่วโมงในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ทั้งยังใช้เครื่องมือซับซ้อน ราคาแพง และใช้สารเคมีราคาสูงในปริมาณมาก

การวิจัยนี้เน้นการใช้เทคโนโลยีที่สามารถปฏิวัติวิธีการวิเคราะห์เชื้อโรคในอาหารโดยไม่เน้นการเพิ่มจำนวนเชื้อที่ต้องใช้เวลานาน แต่หันไปเพิ่มสัญญาณจากการเข้ารวมเกาะเชื้อโรคของอนุภาคขนาดเล็กจำนวนมาก และพัฒนาอนุภาคแม่เหล็กที่สามารถใช้จับยึดจุลินทรีย์เป้าหมายออกจากสารละลายได้ง่าย วิธีนี้ช่วยให้สามารถเพิ่มความไว หรือตรวจสอบเชื้อโรคในปริมาณต่ำได้ เพราะเพิ่มสัญญาณเป็นล้านเท่าโดยไม่ต้องเพิ่มจำนวนเชื้อเป้าหมาย ซึ่งปกติต้องใช้เวลานานอย่างน้อย 18-24 ชั่วโมง จึงใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าวิธีดั้งเดิมมาก โดยจะใช้เวลาวิเคราะห์ไม่เกิน 1 ชั่วโมงเท่านั้น

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการนี้ประกอบด้วยโครงการย่อย 2 โครงการใหญ่ มีความสอดคล้องและสนับสนุนเกื้อกูลกัน มีเทคโนโลยีการสังเคราะห์อนุภาคที่เป็นเทคโนโลยีร่วมกัน แต่มีการผลิตอนุภาคและแอนติบอดีต่างชนิดกัน และอาจนำมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพได้ ทำให้ได้การทดสอบที่เหมาะสม ครอบคลุมเชื้อสำคัญในด้านความปลอดภัยอาหาร นำไปสู่การพัฒนาต่อไปได้โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือ

1. เพื่อพัฒนาวิธีการผลิตและทดสอบสมบัติอนุภาคซิลิกาและอนุภาคแม่เหล็กเฟอร์ไรต์แมกเนติก
2. เพื่อศึกษาการเคลือบด้วยแอนติบอดีคุณภาพสูงสำหรับการเคลือบแอนติบอดีบนอนุภาค ที่มีความเสถียรและจำเพาะต่อเชื้อโรคเป้าหมายที่มีแอนติบอดีจำเพาะ
3. เพื่อลดเวลาวิเคราะห์ทดสอบเชื้อโรคให้น้อยกว่า 1 ชั่วโมง

### รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

งานวิจัยนี้ประกอบด้วยการพัฒนาอนุภาค 2 ชนิดคือ ซิลิกาฟลูออเรสเซนต์และอนุภาคแม่เหล็กเฟอร์ไรต์แมกเนติก อนุภาคทั้งสองนี้มีความแตกต่างและสามารถใช้ประโยชน์ในเชิงสนับสนุนกันดังนี้คือ อนุภาคซิลิกามีเม็ดสีฟลูออเรสเซนต์จำนวนมาก เมื่อติดสลาด้วยแอนติบอดี สามารถเข้าจับเกาะกับแบคทีเรียเป้าหมายได้นับพันอนุภาค ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อโรคเป้าหมายได้ง่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ในขณะที่อนุภาคเฟอร์ไรต์แมกเนติก ได้รับการสังเคราะห์มาโดยมีหมู่เอมิโนติดอยู่ สามารถติดแอนติบอดีจำเพาะได้โดยตรง สามารถใช้จับแบคทีเรียก่อโรค แล้วแยกออกมาเพื่อล้าง หรือ เพิ่มจำนวนได้โดยไม่ต้องอาศัยการเจริญของเชื้อ ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนที่จะวิเคราะห์ได้ในเวลารวดเร็ว อนุภาคนี้อย่างสามารถใช้จับเกาะอนุภาคซิลิกาที่เกาะเชื้อโรคอยู่ ออกมาเพื่อนำไปตรวจสอบยืนยันเพิ่มเติมได้อีกด้วย หากสามารถจัดหาแอนติบอดีที่จำเพาะและเกาะคนละจุดกันได้ งานวิจัยนี้จึงครอบคลุมวิธีการวิเคราะห์อย่างรวดเร็วและการจับแยกเชื้อเป้าหมายออกมาเพื่อตรวจสอบยืนยันต่อไปได้ด้วย

### สรุปผลการวิจัย ภาพรวมทั้งโครงการ

การวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า สามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาฟลูออเรสเซนต์ และอนุภาคเฟอร์ไรต์แมกเนติกได้สำเร็จ พร้อมศึกษาสมบัติของอนุภาค ตลอดจนการปรับสภาพผิวอนุภาคเพื่อให้มีหมู่คาร์บอกซิลและหมู่เอมิโน เพื่อเป็นที่ยึดเกาะของแอนติบอดีได้ ทำให้สามารถจับเกาะแบคทีเรียเป้าหมายได้ อนุภาคทั้งสอง สามารถแยกใช้งานในการจับยึดเชื้อโรค หรือสามารถใช้ร่วมกันในการจับยึดเชื้อโรคด้วยอนุภาคซิลิกา แล้วจับแยกออกจากสารละลายหรืออาหาร ด้วยอนุภาคเฟอร์ไรต์แมกเนติก ร่วมกับแรงแม่เหล็ก เพื่อตรวจสอบยืนยันต่อไปได้ด้วย ทำให้มีศักยภาพในการนำไปใช้งานด้านการวิเคราะห์เชื้อได้อย่างกว้างขวาง  
ประโยชน์ที่ได้รับ/

## ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- Songvorawit, N., K. Tuitemwong, and P. Tuitemwong, 2011. Single step synthesis of amino-functionalized magnetic nanoparticles with polyol technique at low temperature. ISRN Nanotechnology. Volume 2011, Article ID 483129, 6 pages, doi:10.5402/2011/483129.  
<http://www.isrn.com/journals/nanotechnology/2011/483129/>
- Tansub, W., K. Tuitemwong, P. Limsuwan, S. Theparoonrat, and P. Tuitemwong, 2012. Synthesis of antibodies-conjugated fluorescent dye-doped silica nanoparticles for a rapid single step detection of *Campylobacter jejuni* in live poultry. J. Nanomaterials, Vol 2012, Article ID 865186, 7 pages, doi: 10.1155/2012/865186.
- Tuitemwong, P., N. Sognvorawit, and K. Tuitemwong, 2013. Facile and sensitive epifluorescent silica nanoparticles for the rapid screening of EHEC. J. Nanomaterials, Vol 2013, Article ID 706354, 8 peages, dio: 10.1155/2013/706354.
- Songvorawit, N., P. Tuitemwong, K. Tuchinda and K. Tuitemwong, 2013. Fluorescent Dye-Doped Silica Nanoparticles with Polyclonal Antibodies for the Rapid Detection of *Salmonella* spp., CMU Journal of Natural Science, 12(1): 25-34.

## ส่วนประกอบเนื้อเรื่องของแต่ละโครงการย่อย

### โครงการย่อยที่ 1

(ภาษาไทย) การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติฟลูออเรสเซนซ์ในอนุภาคซิลิกาเพื่อพัฒนาเทคนิควิเคราะห์เชื้อโรคในอาหารอย่างรวดเร็ว

(ภาษาอังกฤษ) Synthesis and characterization of dye-doped silica particles for the development of rapid detection technique for foodborne pathogens

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้วิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจลเพื่อสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนซ์ซิลิกานาโนโดยอนุภาคที่ได้มีรูปร่างกลม และขนาดของอนุภาคขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำกับสารลดแรงตึงผิว (Wo) อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยของสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) ปริมาณสารตั้งต้น (TEOS) และปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา(NH<sub>4</sub>OH) ในการสังเคราะห์ซิลิกา ผลการทดลองภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อขนาดอนุภาค โดยเมื่อปริมาณแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้นจะทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง อนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นมีโมเลกุลสีฟลูออเรสเซนซ์เป็นพื้นโมเลกุลแทรกอยู่ในโครงร่างซิลิกา ซึ่งช่วยปกป้องโมเลกุลสีจากการถูกชะล้างโดยออกซิเจนจากสิ่งแวดล้อมทำให้สามารถคงการเรืองแสงได้นาน เมื่อตัดแปรพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคทำให้เกิดหมู่เอมีน และแทนที่ด้วยหมู่คาร์บอกซิลโดยผ่านการทำปฏิกิริยากับ succinic anhydride หลังจากนั้นทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ควบคู่คือ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) เพื่อติดฉลากแอนติบอดีที่ผิวอนุภาค แล้วนำไปทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. cholerae* O139 พบว่ามีการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์และจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีอนุภาค FDS-NPs จำนวนมากเกาะที่ผิวของเชื้อ *V. cholerae* O139 จึงมีความคาดหวังว่าวิธีนี้สามารถดัดแปลงเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่างอาหารได้

คำสำคัญ : อนุภาคฟลูออเรสเซนซ์ซิลิกานาโน / ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน / เทคนิคโซลเจล / แอนติบอดี / วิบริโอ คอเลอรี โอ139

## Abstract

The objective of this research was to optimize the synthesis of FDS-NPs to produce small and uniform size of nanoparticles. The surfaces of these nanoparticles were also modified to make them more compatible for bioconjugation. By chemical combining sol-gel with water in oil microemulsion, it was possible to produce monodisperse, spherical particles with a designed microstructure based on: water to surfactant molar ratio ( $W_o$ ), co-surfactant to surfactant molar ratio ( $P$ ), precursor (TEOS) and catalyst ( $NH_4OH$ ) parameters. The FDS-NPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM). The results showed that the size of the FDS-NPs decreased as the concentration of ammonium hydroxide was increased. The ammonium hydroxide was the main factor to produce smaller and uniform size nanoparticles. The FDS-NPs generated by doping the thousands of fluorescent dye (Rubby) molecules were encapsulated in the silica matrix that also served to protect the Rubby dye from photodamaging oxidation. The FDS-NPs were extremely bright and photostable. Further, the surface of the nanoparticles was modified by using amine-modification followed by carboxyl-modification through a succinic anhydride reaction. Carboxyl-modified FDS-NPs reacted with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) to immobilize with antibody on their surface. The antibody labeled FDS-NPs attaches themselves to the surface of the antigen. Under the fluorescence microscopy the emission of fluorescein was bright. Under the scanning electron microscopy (SEM) thousands of FDS-NPs on surface of *V. cholerae* O139 could be detected. It is envisaged that the so-developed method is promising for detection of *V.cholerae* O139 as well as other foodborne pathogens in food samples.

Keywords : Fluorescent doped-Silica Nanoparticles / Water in Oil Microemulsion / Sol-Gel / Antibody / *Vibrio cholerae* O139

## 1.ความสำคัญ และที่มาของปัญหา และทบทวนเอกสาร

ปัจจุบันมีความพยายามในการพัฒนาปรับปรุงวิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคให้มีความรวดเร็ว และมีความไวสูง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ ซึ่งมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไปหลายหลักการ ได้แก่ Immunofluorescent antibody technique, Time-resolved immunofluorometric assay, Immunomagnetic separation (พัชร แก้วดวง, 2549), Quantum dot, Plasmon resonance immunosensors, Flow cytometry และ bioconjugated particles (Zhao *et al.*, 2004) เป็นต้น

อนุภาค ฟลูออเรสเซนต์ เป็นทางเลือกสำคัญอันหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในอาหารได้รวดเร็ว เทคนิคนี้เป็นการใช้จุดแข็งของศาสตร์การวิเคราะห์เชื้อก่อโรค เพราะเม็ดสีนี้มีสมบัติในการเข้ายึดจับสารชีวโมเลกุลที่ต้องการตรวจสอบอย่างเฉพาะเจาะจง โดยการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาขนาดเล็กที่หุ้มสารเรืองแสงจำนวนมากไว้ภายใน จากนั้นใช้โมเลกุลของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อโรคเป้าหมายมาเกาะ (bioconjugate) ไว้กับตัวอนุภาค เมื่อนำอนุภาคเหล่านั้นไปใช้ตรวจหาเชื้อโรคชนิดนั้นในวัตถุดิบอาหาร อนุภาคที่มีแอนติบอดีเชื่อมอยู่จะเข้าไปยึดจับกับแอนติเจนบนตัวของเชื้อโรคเป้าหมาย และสามารถตรวจจับหรือวัดสัญญาณการเรืองแสงให้เห็นได้อย่างชัดเจน ในขณะที่เดียวกันอนุภาคเฟอร์โรแมกเนติกทำให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เป้าหมายได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องรอการเจริญของเชื้อ

เทคโนโลยีนี้ปฏิวัติวิธีการวิเคราะห์เชื้อโรคในอาหารโดยไม่เน้นการเพิ่มจำนวนเชื้อที่ต้องใช้เวลานาน แต่หันไปเพิ่มสัญญาณจากการเข้ารวมเกาะเชื้อโรคของอนุภาคขนาดเล็กจำนวนมาก วิธีนี้ช่วยให้สามารถเพิ่มความไว หรือตรวจสอบเชื้อโรคในปริมาณต่ำได้ เพราะเพิ่มสัญญาณเป็นล้านเท่าโดยไม่ต้องเพิ่มจำนวนเชื้อเป้าหมาย ซึ่งปกติต้องใช้เวลานานอย่างน้อย 18-24 ชั่วโมง จึงใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าวิธีดั้งเดิมมาก โดยจะใช้เวลาวิเคราะห์ไม่เกิน 1 ชั่วโมงเท่านั้น

## ทบทวนเอกสาร

Rapid method เริ่มมีการศึกษาตั้งแต่ปี 1980 มีการประยุกต์ใช้ความรู้ในหลากหลายแขนง ซึ่งรวมไปถึงหลักการทางจุลชีววิทยา เคมี ชีวเคมี ชีวฟิสิกส์ ระบบวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunology) และระบบน้ำเหลืองวิทยา (serology) เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการจัดจำแนก และการนับเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่าง ได้สะดวกรวดเร็วและมีความถูกต้องเชื่อถือได้ โดยลดเครื่องมืออุปกรณ์ และขั้นตอนที่ใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ (Tansub *et al.*, 2011) วิธีที่รวดเร็วในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์มีอยู่หลายวิธีซึ่งแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้ การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์โดยวิธี Modified conventional methods, เทคนิคอิมมิวโนโครมาโตกราฟีและไมโครแอแรย์ (immune chromatography and microarray technique), เทคนิคทางระบบวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunological technique), เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (Molecular biology technique), การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ (Automation)

เทคโนโลยีและการออกแบบหรือการใช้เครื่องมือในการสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กมากๆ หรือ เรียงอะตอมและโมเลกุลในตำแหน่งที่ต้องการได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ส่งผลให้โครงสร้างของวัสดุมีคุณสมบัติพิเศษขึ้นทั้งทางด้านกายภาพ เคมี หรือชีวภาพ และสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้เช่น การตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ (diagnosis) เวชกรรมทางยา และเครื่องสำอางค์ การตรวจวิเคราะห์



หาเชื้อจุลินทรีย์ (อรุณ บำตระกุลนนท์, 2540; Zhao *et al.*, 2004) งานทางด้านอิเล็กทรอนิกส์ (Wang *et al.*, 2007) และงานด้านอื่นๆ วัสดุนี้มีหลายประเภทเช่น particles, tubes, wires, fibers, rods จึงถูกนำมาใช้ในงานที่แตกต่างกันได้

อนุภาคขนาดเล็กที่นิยมนำมาใช้ในงานวิจัยด้านการตรวจวิเคราะห์ทางชีวภาพหรือการตรวจวินิจฉัยโรค นั้นมีหลากหลายชนิด (Bruce and Sen, 2005) ซึ่งอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกาขนาดเล็ก เหมาะแก่การนำมาใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ทางชีวภาพเนื่องจากสามารถนำไปใช้งานได้จริงโดยไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ มีความเข้มของการเรืองแสงสูง สามารถคงการเรืองแสงได้นาน สักระยะที่ไ้ง่าย และเพิ่มปริมาณได้มาก สามารถตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ได้แม้มีปริมาณน้อยๆ โดยอาศัยความเข้มของการเรืองแสงในการตรวจวัด และมีความสามารถในการเข้าจับกับสารชีวโมเลกุลได้ดี (Sherma and Whiting, 2005)

## 2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็ก สม่ำเสมอไม่เกาะกัน และมีสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นวิธีทดสอบรวดเร็วที่มีความไวสูง
- 2.2 ศึกษาสมบัติของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นในด้านรูปร่างขนาด ธาตุองค์ประกอบโครงสร้างของอนุภาคความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (excitation wavelength) ความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง (emission wavelength) และความคงอยู่ของการเรืองแสง (photostability) ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้
- 2.3 พัฒนาแอนติบอดีต่อเชื้อโรคเป้าหมาย
- 2.4 ศึกษาการดัดแปลงพื้นระเคมีที่ผิว (surface modification) อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา และศึกษาการติดโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) บนผิวอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา (antibody immobilization)
- 2.4 ศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคในการตรวจวิเคราะห์ เชื้อเป้าหมาย เช่น *Salmonella* spp., *Vibrio cholera* O139, *E. coli* O157:H7 และ *C. Jejuni*

## 3. ระเบียบและวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 การสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาฟลูออเรสเซนต์

การสังเคราะห์อนุภาค ได้ดัดแปลงวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันของ Bagwe *et al.* (2004) และ Sukhuthachart *et al.* (2007) ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในระบบไมโครอิมัลชันประกอบด้วย 7.5 ml cyclohexane, 1.80 ml n-Hexanol, 1.77 ml Triton X-100, 0.48 ml 20 mMRubpy dye solution, 0.10 ml TEOS และ 0.06 ml NH<sub>4</sub>OH ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา ให้อนุภาคมีขนาดเล็ก และขนาดสม่ำเสมอ โดยศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ 4 ปัจจัย ดังนี้

- 1) การปรับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo) เท่ากับ 6, 9 และ 12 โดยให้ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวคงที่

- 2) การปรับอัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ 3, 5 และ 7 โดยให้ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวคงที่
- 3) การปรับปริมาณของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา (TEOS) เท่ากับ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิลิตร
- 4) การปรับปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ซิลิกา ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) เท่ากับ 0.03, 0.06 และ 0.09 มิลลิลิตร

ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

#### การสังเคราะห์อนุภาคซิลิกา

1. นำอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้มาหยดลงบน formvar carbon coated copper grid และปล่อยให้แห้งในอากาศ หลังจากนั้นถ่ายภาพภายใต้กล้อง TEM
2. ตรวจวิเคราะห์รูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs โดยวัดขนาดของอนุภาคอย่างน้อย 30 อนุภาค จากภาพถ่าย TEM (Jeol Model JEM-1230, USA) เพื่อหาค่าเฉลี่ย (X) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของขนาดอนุภาค และสร้างแผนภาพการกระจายตัวของขนาดอนุภาคโดยใช้ Program Origin 7 (USA, 1991-2002)

### 3.2 การวิเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา

#### วิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบในอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา

การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในอนุภาค FDS-NPs โดยนำอนุภาคที่เป็นผงแห้งมาเกลี่ยบน carbon tape และติดบน holder และตรวจวิเคราะห์โดยใช้กล้อง SEM-EDS (Leo Model 1455P, Germany)

#### วิเคราะห์โครงสร้างของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา

นำอนุภาค FDS-NPs ประมาณ 5 mg วิเคราะห์ด้วยเครื่อง X-ray Diffractometer (Bruker Model D8 Advance, Germany) ที่ 40 kV โดยใช้ stepsize เท่ากับ 0.4 วินาทีและ stepsize เท่ากับ 0.02 องศา

#### วิเคราะห์ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นและความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง

การตรวจวิเคราะห์ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง (emission wavelength) ของสารละลายสีฟลูออเรสเซนต์เปรียบเทียบกับอนุภาค FDS-NPs โดยนำอนุภาค FDS-NPs 3 mg ทำให้กระจายใน 3 ml 95% เอทานอลและนำสารละลายสีฟลูออเรสเซนต์ 20 mM มาเจือจาง 10 เท่าด้วย 95% เอทานอล นำส่วนใสที่อยู่อย่างเสถียรด้านบนของอนุภาค FDS-NPs และสารละลายสีฟลูออเรสเซนต์ ตรวจวิเคราะห์ excitation และ emission wavelength โดยใช้เครื่อง spectrofluorometer (Hitachi Model F-2500, Japan)

#### การวิเคราะห์ความคงอยู่ของการเรืองแสง (Photostability)

การตรวจวิเคราะห์ความคงอยู่ของการเรืองแสงของสารละลายสีฟลูออเรสเซนต์เปรียบเทียบกับอนุภาค FDS-NPs มีขั้นตอนดังนี้คือ นำอนุภาค FDS-NPs 3 mg มาทำให้กระจาย (disperse) และนำสารละลายสีฟลูออเรสเซนต์ 20 mM เจือจาง 10 เท่าด้วย 95% เอทานอล นำส่วนใสที่อยู่อย่างเสถียรด้านบนของอนุภาค FDS-NPs และสารละลายสีฟลูออเรสเซนต์ ตรวจวิเคราะห์หาความเข้มของการเรือง

แสงทุกๆ 5 นาที่เป็นระยะเวลา 60 นาที (ใช้ mode photometry) โดยเครื่อง spectrofluorometer หลังจากการวัดความเข้มของการเรืองแสงในแต่ละครั้ง นำตัวอย่างใส่ในบีกเกอร์ใส ให้สัมผัสกับ ออกซิเจน และแสงสว่างในสภาวะปกติ

### 3.3 การดัดแปลงพันธะเคมีเพื่อให้เกิดหมู่ฟังก์ชัน และติดแอนติบอดีที่ผิวอนุภาค

งานวิจัยนี้ศึกษาการดัดแปลงพันธะเคมีเพื่อให้เกิดหมู่ฟังก์ชันและติดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผิวอนุภาค FDS-NPs ซึ่งศึกษาทดลอง 2 วิธี ดังนี้

#### 3.3.1 การดัดแปลงผิวอนุภาคที่ดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีน

วิธีนี้เป็นการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค FDS-NPs ให้เกิดหมู่เอมีน (amine functionalized group) โดยใช้ (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTS) หลังจากนั้นใช้ glutaraldehyde เป็นตัวเชื่อมระหว่างอนุภาค FDS-NPs และแอนติบอดี โดยนำอนุภาค FDS-NPs 32 mg ล้างด้วย deionized water 2 ครั้งและ 1 mM acetic acid 1 ครั้ง (โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที) ทำให้อนุภาคกระจายตัวกันใน 20 ml ของ 1mM acetic acid ที่มี 10% (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTS) และกวนอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เกิดหมู่เอมีนจากนั้นล้างอนุภาค FDS-NPs ที่ผิวมีหมู่เอมีนแล้วด้วย deionized water 2 ครั้งและ 0.1 M PBS (pH 7.3) 1 ครั้งเก็บอนุภาค FDS-NPs ที่ประกอบด้วยหมู่เอมีนใน 0.1 M PBS (pH 7.3) ที่อุณหภูมิ 4 °C ตรวจวิเคราะห์หมู่เอมีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง FTIR (Perkin Elmer Model Spectrum One, USA) ที่อินฟราเรดช่วงกลาง (450-4500 cm<sup>-1</sup>)

#### การติดแอนติบอดีบนผิวอนุภาคที่มีหมู่เอมีน

ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่ประกอบด้วยหมู่เอมีนด้วย 10 ml 0.1 M PBS (pH 7.3) 2 ครั้งแล้ว ทำให้อนุภาคกระจายใน 3 ml 0.1 M PBS (pH 7.3) ที่มี 10% glutaraldehyde และเขย่าอย่างสม่ำเสมอที่ 200 รอบต่อนาทีโดยใช้ shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงล้างอนุภาคด้วย 0.1 M PBS 2 ครั้ง กระจายอนุภาคใน 1.5 ml 0.1M PBS (pH 7.3) และเจือจางแอนติบอดีความเข้มข้น 120 µg/ml ใน 1.5 ml 0.1 M PBS (pH 7.3) และเขย่าอย่างสม่ำเสมอที่ 200 รอบต่อนาทีโดยใช้ shaking water bath ที่อุณหภูมิ 18 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมงล้างอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่ด้วย quenching solution 1 ครั้ง กระจายอนุภาคใน 5 ml quenching solution และเขย่าอย่างสม่ำเสมอโดยใช้ shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 30 นาทีล้างอนุภาคด้วย storage buffer 1 ครั้งเก็บอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่ใน 3 ml storage buffer (ความเข้มข้นของอนุภาค เท่ากับ 10 mg/ml)

#### การติดแอนติบอดีบนผิวอนุภาคที่ดัดแปลงให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

วิธีนี้เป็นการดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณรอบๆผิวของอนุภาค FDS-NPs โดยทำให้เกิดหมู่เอมีน (amine functionalized group) ในขั้นแรก และแทนที่ด้วยหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl functionalized group) หลังจากนั้นกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลด้วยรีเอเจนต์ควบคูล์ N-hydroxysuccinimide (NHS) และ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) และติดแอนติบอดีบนผิวอนุภาคโดยดัดแปลงวิธีของ Zhao *et al.* (2004) ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

#### 3.3.2 การดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

นำอนุภาค FDS-NPs 32 mg ล้างด้วย deionized water 2 ครั้งและ 1 mM acetic acid 1 ครั้งหลังจากการล้างอนุภาคแล้ว ทำให้อนุภาคกระจายทั่วกันโดยใช้ ultrasonic bath ใน 20 ml ของ 1 mM acetic acid ที่มี 10% trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) และกวนอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เกิดหมู่เอมีนล้างอนุภาค FDS-NPs ที่ผิวทำให้เกิดหมู่เอมีนแล้ว ด้วย deionized water 2 ครั้งและ N,N-dimethylformamide 1 ครั้ง กระจายอนุภาคใน 20 ml N,N-dimethylformamide ที่มี 10% succinic anhydride และกวนอย่างสม่ำเสมอ ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน ( $N_2$  purge) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงล้างอนุภาค FDS-NPs ที่บริเวณผิวทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลแล้ว ด้วย deionized water 2 ครั้งและ 0.1 M MES buffer (pH 5.5) 1 ครั้งเก็บอนุภาค FDS-NPs ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลแล้วใน 0.1 M MES buffer (pH 5.5) ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}C$  วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง FTIR ที่อินฟราเรดช่วงกลาง ( $450-4500\text{ cm}^{-1}$ )

#### การติดแอนติบอดีบนผิวอนุภาคที่มีหมู่คาร์บอกซิล

ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลด้วย 0.1 M MES buffer (pH 5.5) 2 ครั้งหลังจากการล้างอนุภาคแล้ว ทำให้อนุภาคกระจายใน 3 ml 0.1 M MES buffer (pH 5.5) ที่มี 10 mg/ml ของ EDC และ 10 mg/ml ของ N-hydroxysuccinimide (ความเข้มข้นของอนุภาคเท่ากับ 10 mg/ml) และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอที่ 200 รอบต่อนาทีโดยใช้ shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่  $18^{\circ}C$  เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อเป็นการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลล้างอนุภาคด้วย 0.1 M PBS 2 ครั้ง กระจายอนุภาคใน 1.5 ml 0.1M PBS (pH 7.3)

เตรียมแอนติบอดีต่อเชื้อ Salmonella และ Campylobacter ที่ซื้อจากผู้ผลิต โดยการผ่านคอลัมน์ affinity column ตามวิธีของ พัทรี (2549) จากนั้นเจือจางแอนติบอดีความเข้มข้น  $120\text{ }\mu\text{g/ml}$  ใน 1.5 ml 0.1 M PBS (pH 7.3)ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่ด้วย quenching solution 1 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $18^{\circ}C$ กระจายอนุภาคใน 5 ml quenching solution และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอ ล้างอนุภาคด้วย storage buffer 1 ครั้งโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $18^{\circ}C$ เก็บอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่ใน 3 ml storage buffer ตรวจสอบการเกาะของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกาที่ผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

## 4. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

### การสังเคราะห์และวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา

#### 4.1. ผลการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน

การสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจล โดยได้ศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ 4 ปัจจัย ดังนี้

- 1) การปรับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ( $W_o$ ) เท่ากับ 6, 9 และ 12 โดยให้ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวคงที่

- 2) การปรับอัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ 3, 5 และ 7 โดยให้ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวคงที่
- 3) การปรับปริมาณของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา (TEOS) เท่ากับ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิลิตร
- 4) การปรับปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ซิลิกา ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) เท่ากับ 0.03, 0.06 และ 0.09 มิลลิลิตร

การสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน (FDS-NPs) โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ร่วมกับเทคนิคโซลเจล โดยใช้วิธีการสังเคราะห์ของ ัญญัก สุวรรณชาติ (2551) จากการทดลองพบว่า ปัจจัยที่ประกอบด้วย cyclohexane, n-Hexanol, Triton X-100, 20 mM RuBpy dye solution, TEOS และ  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\text{NH}_3$  30; wt%) ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ในระบบไมโครอิมัลชัน ชนิดน้ำในน้ำมัน มีลักษณะเป็นสารสีส้มใสสามารถมองเห็นทะลุผ่านได้ และมีความเสถียร คือสามารถคง ความเป็นไมโครอิมัลชันได้นานในระบบปิด หลังจากการเติมอะซิโตน (Acetone) เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทั้งหมดในระบบไมโครอิมัลชัน พบว่าในระบบอิมัลชันที่เสถียร จะเกิดการตกตะกอนของอนุภาค FDS- NPs มีลักษณะคล้ายเจลใสสีส้ม จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอน และล้างอนุภาค FDS-NPs เพื่อ กำจัดสารลดแรงตึงผิว และสีส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ปลอยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน หรือนำไปอบที่อุณหภูมิ  $120^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บดให้ละเอียดโดยใช้แท่งแก้ว พบว่าอนุภาค FDS-NPs มีลักษณะเป็นผงสีส้มละเอียด ก่อนนำอนุภาค FDS-NPs ไปวิเคราะห์ จะต้องละลายใน 95% Ethanol และทำให้กระจายตัวออกจากกัน (Disperse) โดยใช้เครื่อง Ultrasonic probe จะได้ อนุภาค FDS-NPs ที่มีความเสถียร กระจายตัวอยู่ใน 95% Ethanol อย่างคงตัว สามารถนำไป วิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆของอนุภาค FDS-NPs หลังจากนั้นนำอนุภาค FDS-NPs ทำการดัดแปลง พื้นที่ผิวเพื่อให้เกิดหมู่ฟังก์ชันเอมีน, หมู่คาร์บอกซิล หลังจากขั้นตอนการเติมไนโตรเจน ทำการล้าง อนุภาค FDS-NPs ด้วยน้ำ Deionized และเก็บในสารละลาย MES buffer เพื่อนำไปตรวจ วิเคราะห์ขนาด และการกระจายตัวภายใต้กล้อง TEM และตรวจวิเคราะห์ค่า Zeta potential นำ อนุภาค FDS-NPs ไปทำแห้งอีกครั้งโดยการปั่นเหวี่ยง เพื่อให้ได้อนุภาค FDS-NPs ที่เป็นผงและนำไป ตรวจวิเคราะห์โครงสร้าง, วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันและวิเคราะห์ธาตุ

จากผลทดลองพบว่า ทุกๆปัจจัยที่ทดลองสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ในระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำ ในน้ำมัน มีลักษณะเป็นสารสีส้มใสจนสามารถมองเห็นทะลุผ่านได้และมีความเสถียร คือสามารถคงความ เป็นไมโครอิมัลชันได้นานในระบบปิด (รูปที่ 1.1)



**รูปที่ 1.1** การสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ด้วยไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เสถียร

หลังจากเติมอะซิโตน (acetone) ลงไปเพื่อหยุดระบบไมโครอิมัลชันที่เสถียร และตกตะกอนอนุภาค FDS-NPs ซึ่งตกตะกอนจะมีลักษณะคล้ายเจลใสสีส้ม (รูปที่ 1.2)



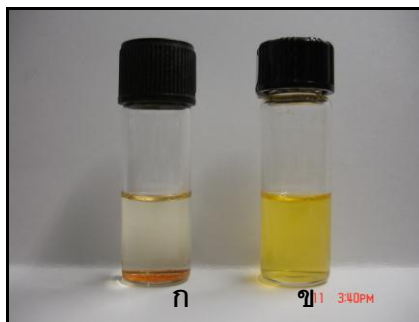
**รูปที่ 1.2** การตกตะกอนของอนุภาค FDS-NPs มีลักษณะเป็นเจลใสสีส้ม

เมื่อผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บ และล้างอนุภาค FDS-NPs โดยล้างสารลดแรงตึงผิว และสีส่วนเกินออกและทำให้อนุภาคแห้งในอากาศ หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ  $120^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และบดให้ละเอียดโดยใช้แท่งแก้ว จะมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีส้ม (รูปที่ 1.3)



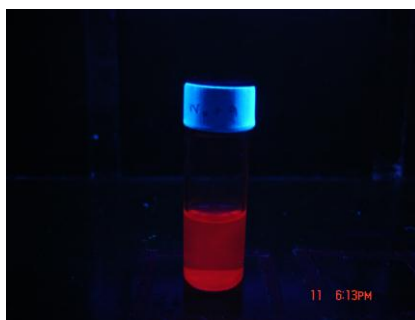
**รูปที่ 1.3** อนุภาค FDS-NPs มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีส้ม

อนุภาค FDS-NPs ก่อนวิเคราะห์ในด้านต่างๆ ต้องทำให้อนุภาคกระจายตัวออกจากกัน (disperse) ใน 95% เอทานอลโดยใช้เครื่อง ultrasonicator จึงได้อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนที่มีความเสถียรแขวนลอยใน 95% เอทานอลอย่างคงตัว (รูปที่ 1.4)



รูปที่ 1.4 อนุภาค FDS-NPs (ก) ก่อน และ (ข) หลังทำให้กระจายใน 95% เอทานอล

เมื่อนำอนุภาค FDS-NPs ที่มีลักษณะเสถียรแขวนลอยอยู่ใน 95% เอทานอลอย่างเสถียร นำมาทดสอบการเรืองแสงภายใต้ black light ที่ความยาวคลื่น 354 nm จะเกิดการเรืองแสงขึ้น (รูปที่ 1.5)



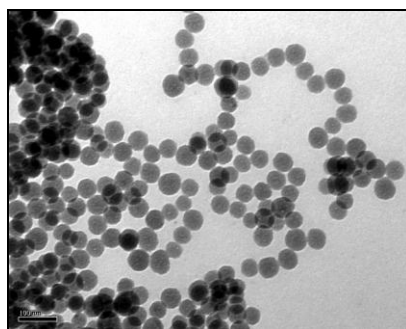
รูปที่ 1.5 การเรืองแสงของอนุภาค FDS-NPs ใน 95% เอทานอล เมื่อถูกกระตุ้นด้วย black light ที่ความยาวคลื่น 354 nm

## 2. การวิเคราะห์คุณสมบัติอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน

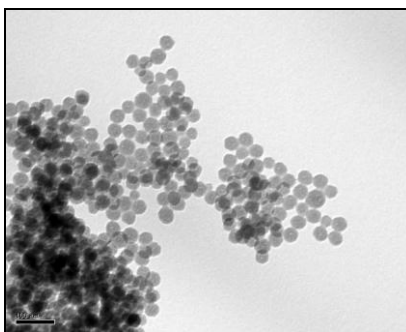
### 2.1 การวิเคราะห์รูปร่างและขนาดของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน

#### 2.1.1 การศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo)

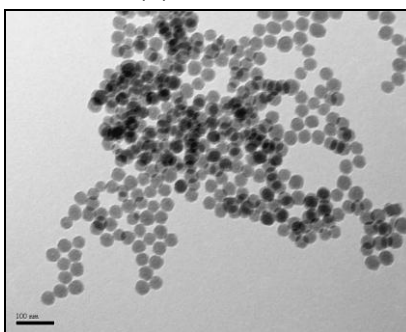
การศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo) เท่ากับ 6, 9 และ 12 ที่มีผลต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า (รูปที่ 1.6) พบว่าอนุภาค FSD-NPs มีรูปร่างกลม และจุดเล็กๆสีดำอยู่ภายในอนุภาคซึ่งเป็นสี Rubpy ที่แทรกอยู่ภายในโครงร่างของซิลิกา และรูปที่ 1.7-1.8 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ Wo เท่ากับ 6, 9 และ 12 มีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคเท่ากับ 35, 40 และ 51 nm ตามลำดับ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ



(ก)  $Wo = 6$



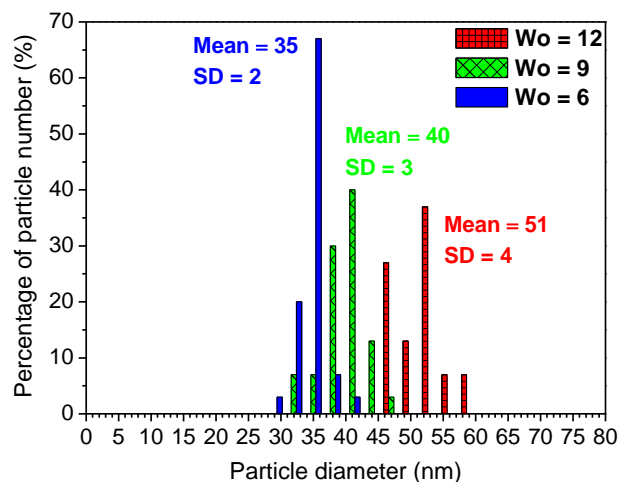
(ข)  $Wo = 9$



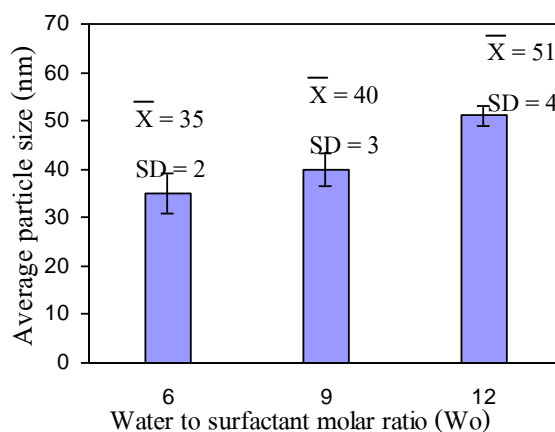
(ค)  $Wo = 12$

รูปที่ 1.6 อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ( $Wo$ ) เท่ากับ 6 (ก), 9 (ข) และ 12 (ค) 100 kV (Scale bar = 100 nm)





รูปที่ 1.7 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo) เท่ากับ 6, 9 และ 12



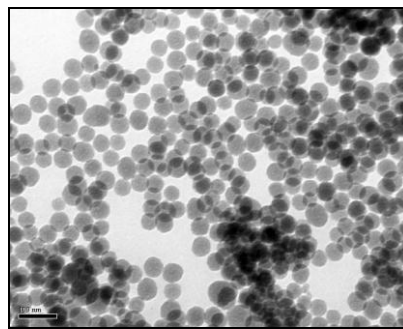
รูปที่ 1.8 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo) เท่ากับ 6, 9 และ 12

จากการศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (P) ที่มีต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs พบว่าเมื่ออัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (Wo) มีค่าลดลง มีผลทำให้อนุภาค FDS-NPs มีขนาดเล็กลง และการกระจายตัวของขนาดอนุภาคลดลง เนื่องจากเมื่อปริมาณของน้ำในระบบไมโครอิมัลชันลดลง และปริมาณสารลดแรงตึงผิวมีมากพอแล้ว น้ำจะสามารถมีเสถียรภาพอยู่ได้ โดยกระจายตัวเป็นอนุภาคเล็กๆ เพราะมีสารลดแรงตึงผิวเพียงพอที่จะล้อมรอบอนุภาคน้ำนั้น จึงส่งผลให้ขนาดของอนุภาคน้ำ (droplet size) เริ่มต้นในระบบไมโครอิมัลชันมีขนาดเล็กทำให้อนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กลง ซึ่งให้ผลการทดลองที่ขัดแย้งกับงานวิจัยของ Bagwe et al. (2004) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของ Wo ที่ 5, 10 และ 15 พบว่า

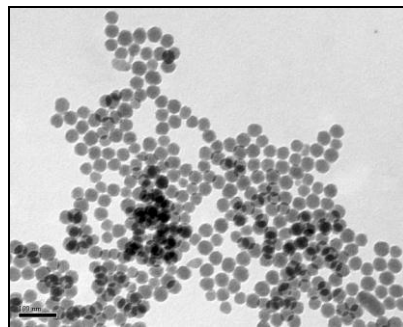
ขนาดอนุภาคเท่ากับ 178, 82 และ 69 nm ตามลำดับ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 29, 14 และ 4 ตามลำดับ (รูปที่ 1.7-1.8) แต่ให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abarken et al. (2006)

### 2.1.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P)

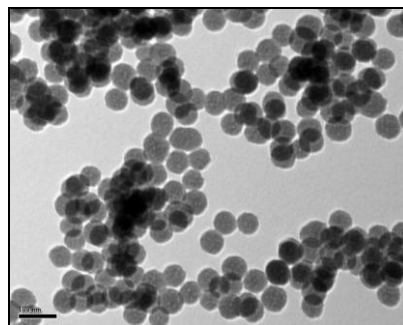
การศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ 3, 5 และ 7 ที่มีผลต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า ดังรูปที่ 1.9 พบว่าอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนมีรูปร่างกลม และสี Rubpy แทรกอยู่ในอนุภาค และ จากรูปที่ 1.10-1.11 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ P = 3, 5 และ 7 มีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค เท่ากับ 48, 36 และ 61 nm ตามลำดับ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 3, 3 และ 5 ตามลำดับ



(ก) P = 3

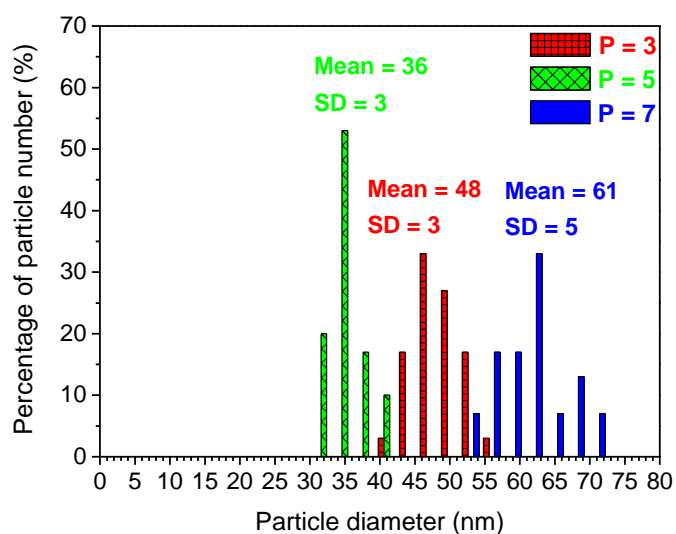


(ข) P = 5

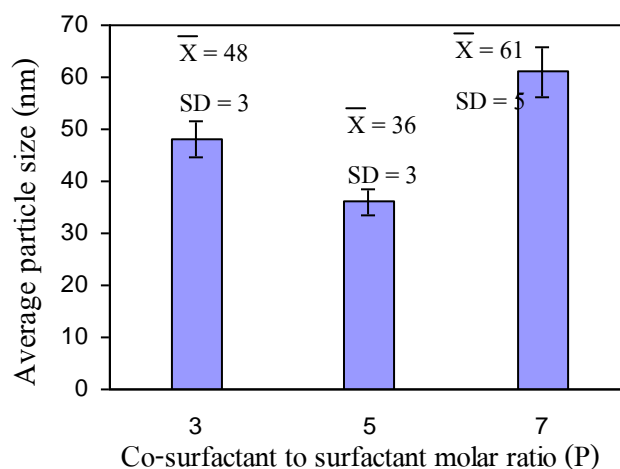


(ค) P = 7

**รูปที่ 1.9** อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ (ก) 3, (ข) 5 และ (ค) 7 100 kV (Scale bar = 100 nm)



รูปที่ 1.10 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPS ที่อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ 3, 5 และ 7

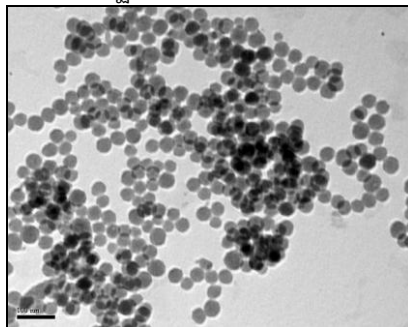


รูปที่ 1.11 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ 3, 5 และ 7

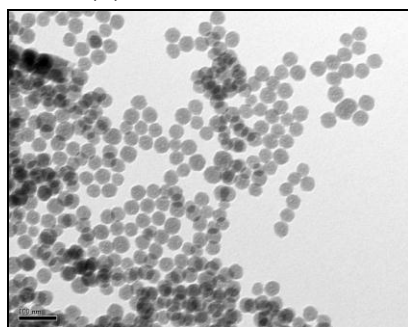
จากการศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) ที่มีต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs พบว่าปัจจัยดังกล่าวไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ต่อขนาด และการกระจายตัวของอนุภาคได้ แต่ในงานวิจัยของ Bagwe *et al.* (2004) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของ P ที่ 2.7, 5.5 และ 7.7 พบว่าขนาดอนุภาคเท่ากับ 97, 82 และ 72 nm ตามลำดับ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 14, 13 และ 6 ตามลำดับ คือขนาดอนุภาคจะเล็กลงเมื่อค่า P เพิ่มขึ้น

### 2.1.3 ผลของปริมาณสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา (TEOS)

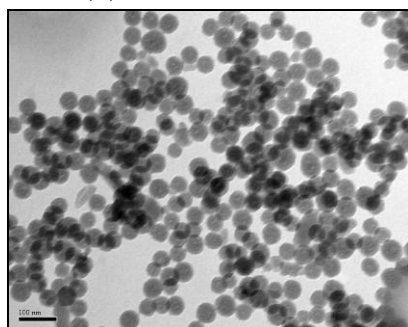
การศึกษาผลของปริมาณสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา (TEOS) ที่ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิลิตร ที่มีผลต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่วิเคราะห์โดยใช้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า ดังรูปที่ 1.12 พบว่าอนุภาค FDS-NPs มีรูปร่างกลม และสี Rubpy แทรกอยู่ในอนุภาค และ จากรูปที่ 1.13-1.14 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ TEOS = 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค เท่ากับ 37, 40 และ 50 nmตามลำดับ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 4, 3 และ 9 ตามลำดับ



(ก) TEOS = 0.05 ml

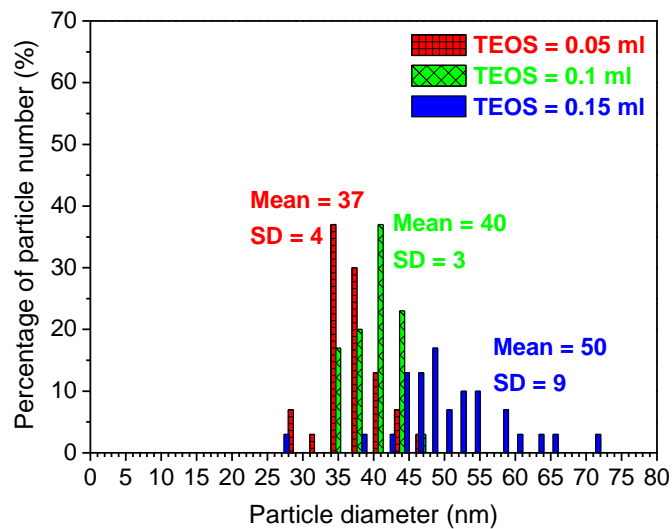


(ข) TEOS = 0.10 ml

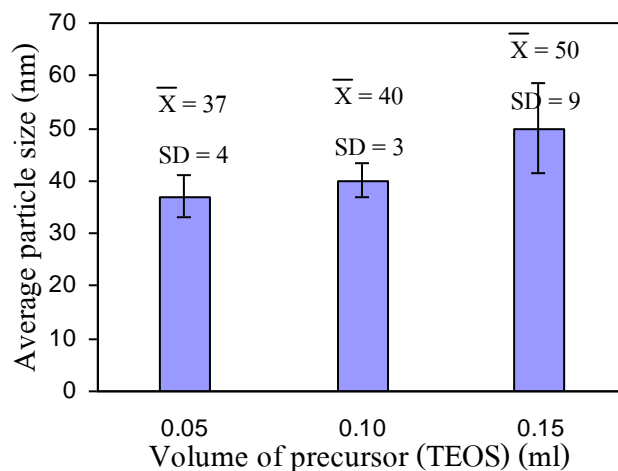


(ค) TEOS = 0.15 ml

**รูปที่ 1.12** อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่ปริมาณของ TEOS เท่ากับ (ก) 0.05 ml, (ข) 0.10 ml และ (ค) 0.15 ml 100 kV (Scale bar = 100 nm)



รูปที่ 1.13 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณของ TEOS เท่ากับ 0.1 ml, 0.5 ml และ 0.15 ml



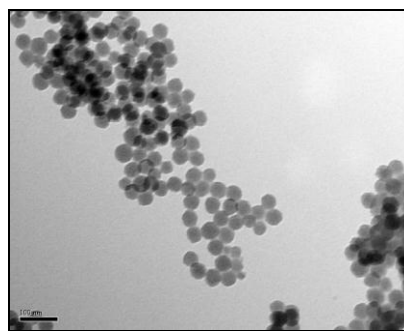
รูปที่ 1.14 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณของ TEOS เท่ากับ 0.1 ml, 0.5 ml และ 0.15 ml

จากการศึกษาผลของปริมาณสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา (TEOS) ที่มีต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs พบว่าเมื่อปริมาณของ TEOS มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจาก TEOS เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา ดังนั้นเมื่อมีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาผลปริมาณ TEOS และให้ผลที่แตกต่างกัน ดังนี้ Stober *et al.* (1968) รายงานว่าปริมาณของ TEOS ไม่มีผลต่อขนาดของอนุภาค แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ TEOS จะส่งผลให้ขนาดอนุภาค

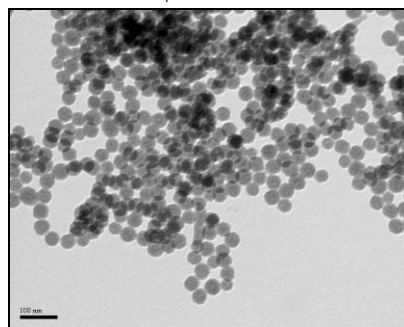
เล็กลง อย่างไรก็ตาม รายงานว่าขนาดอนุภาคจะใหญ่ขึ้นเมื่อปริมาณ TEOS มากขึ้น (Bogush *et al.*, 1988)

#### 2.1.4 ผลของปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ ซิลิกา ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )

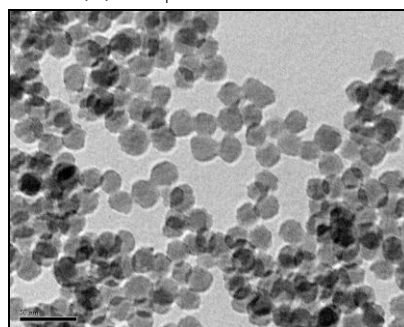
การศึกษาผลของปริมาณแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ 0.03, 0.06 และ 0.09 มิลลิลิตร ที่มีผลต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่วิเคราะห์ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 100,000 และ 300,000 เท่า ดังรูปที่ 1.15 พบว่าอนุภาค FDS-NPs มีรูปร่างกลม และสี Rubpy แทรกอยู่ในอนุภาค และ จากรูปที่ 1.16-1.17 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ  $\text{NH}_4\text{OH}$  เท่ากับ 0.03, 0.06 และ 0.09 มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคเท่ากับ 43, 39 และ 22 nm ตามลำดับ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 4, 4 และ 3 ตามลำดับ



(ก)  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 0.03 ml

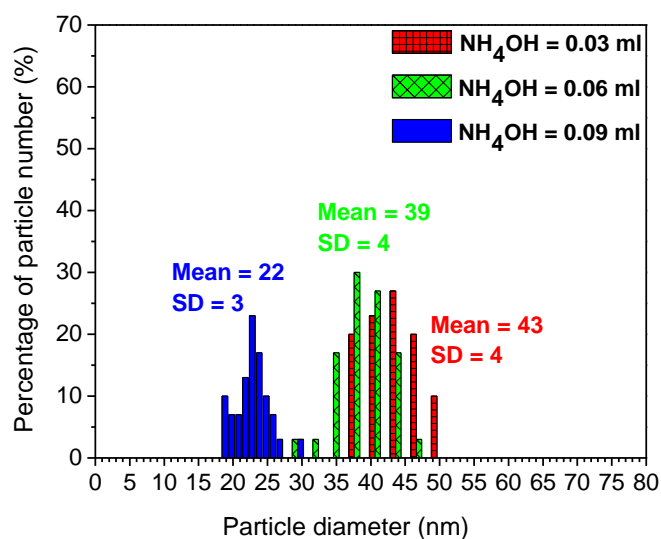


(ข)  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 0.06 ml

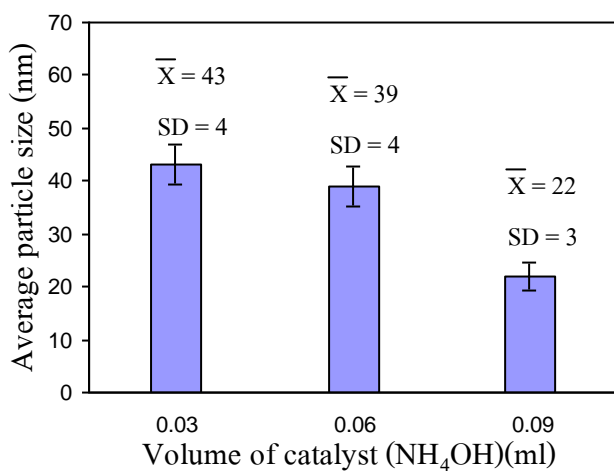


(ค)  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 0.09 ml

รูปที่ 1.15 อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่ปริมาณของ  $\text{NH}_4\text{OH}$  เท่ากับ (ก) 0.03 ml, (ข) 0.06 ml 100 kv (Scale bar = 100 nm) และ (ค) 0.09 ml (Scale bar = 50 nm)



รูปที่ 1.16 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณของ NH<sub>4</sub>OH เท่ากับ 0.03 ml, 0.06 ml และ 0.09 ml



รูปที่ 1.17 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ NH<sub>4</sub>OH เท่ากับ 0.03 ml, 0.06 ml และ 0.09 ml

จากการศึกษาผลของปริมาณแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH<sub>4</sub>OH) ที่มีต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs พบว่าเมื่อปริมาณ NH<sub>4</sub>OH มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง เนื่องจาก NH<sub>4</sub>OH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา hydrolysis และ condensation ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกา ดังนั้นเมื่อปริมาณของ NH<sub>4</sub>OH เพิ่มมากขึ้นจึงส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น อนุภาคจึงมีขนาดเล็กลง ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bagwe *et al.*

(2004) ซึ่งศึกษาผลของความเข้มข้น  $\text{NH}_4\text{OH}$  ที่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% พบว่าขนาดอนุภาคเท่ากับ 82, 54, 52 และ 50 ตามลำดับ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 13, 5, 6 และ 4 ตามลำดับ จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อรูปร่าง ขนาดและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในการสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs โดยศึกษาผลของอัตราโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ( $W_o$ ) อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว ( $P$ ) ปริมาณของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา (TEOS) และปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ซิลิกา ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) พบว่าที่  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ  $\text{NH}_4\text{OH} = 0.09$  ml มีค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาค เท่ากับ 35, 36, 37 และ 22 nmตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาค เท่ากับ 2, 3, 4 และ 3 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์จึงมีผลต่อขนาดอนุภาคมากกว่าปัจจัยอื่นๆ

**ตารางที่ 1.1** ปัจจัยที่มีผลต่อรูปร่าง และขนาดของอนุภาค FDS-NPs

ปัจจัย		ขนาดเฉลี่ย (X) (nm)	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
$W_o$	6	35	2
	9	40	3
	12	51	4
$P$	3	48	3
	5	36	3
	7	61	5
TEOS (ml)	0.05	37	4
	0.10	40	3
	0.15	50	9
$\text{NH}_4\text{OH}$ (ml)	0.03	43	3
	0.06	39	4
	0.09	22	3

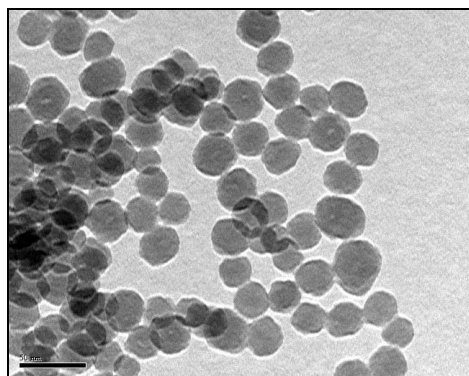
หลังจากศึกษาปัจจัยทั้ง 4 ที่มีผลต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาคแล้ว จึงเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในแต่ละปัจจัย (ตารางที่ 1.1) คือ สภาวะที่มีผลทำให้อนุภาคมีขนาดเล็ก และการกระจายตัวของขนาดอนุภาคต่ำ นำมาทำการทดลองศึกษาต่อเพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดในการนำไปใช้ในการสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ให้มีขนาดเล็ก และสม่ำเสมอ เหมาะกับการนำไปใช้ในงานตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. cholerae* O139 ต่อไป

### 2.1.5 ผลของปัจจัยร่วม

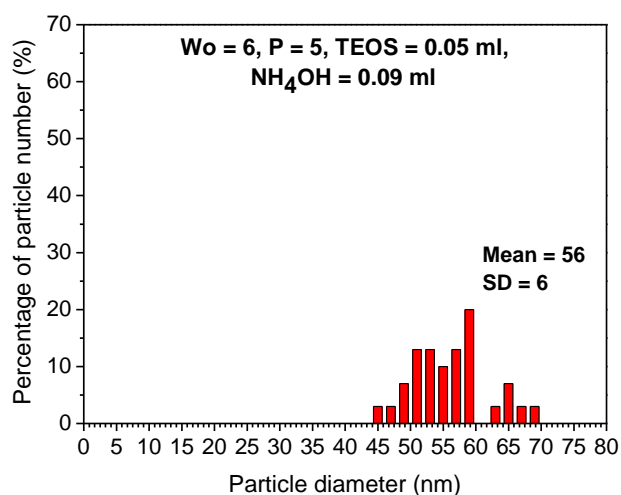
การศึกษาค้นคว้าของปัจจัยร่วม  $W_o = 6$ , TEOS = 0.05 ml. และ 0.09 ml ที่มีผลต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่วิเคราะห์ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 300,000 เท่า ดังรูปที่



1.18 พบว่าอนุภาค FDS-NPs มีรูปร่างกลมและสี Rubpy แทรกอยู่ในอนุภาค และจากรูปที่ 1.19 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs มีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคเท่ากับ 56 nm และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 6



รูปที่ 1.18 อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM จากผลของปัจจัยร่วม ( $W_o = 6$ ,  $P = 5$ ,  $TEOS = 0.05$  ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml) 100 kV (Scale bar = 50 nm)



รูปที่ 1.19 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs จากผลของปัจจัยร่วม  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ ,  $TEOS = 0.05$  ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml

จากการศึกษาผลของปัจจัยร่วมของ  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ ,  $TEOS = 0.05$  ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml ที่มีต่อรูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS-NPs พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคเท่ากับ 56 nm ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคที่  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ ,  $TEOS = 0.05$  ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml ซึ่งมีค่าเท่ากับ 35, 36, 37 และ 22 nm ตามลำดับ และขนาดอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดแตกต่างกัน ( $SD=6$ ) จึงไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ในงานตรวจวิเคราะห์เชื้อ V.

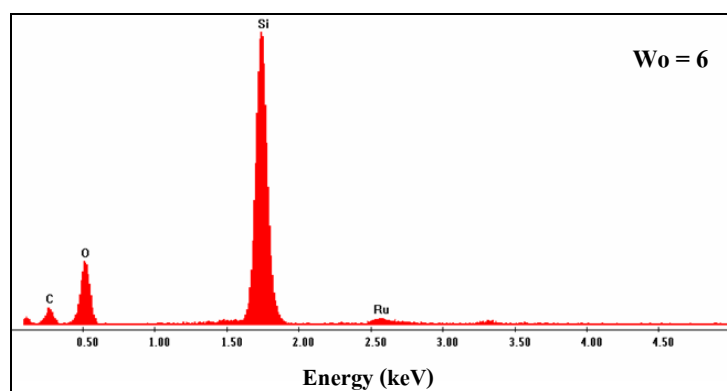
*cholerae* O139 ดังนั้นสภาวะที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs เพื่อให้อนุภาคมีขนาดเล็ก และสม่ำเสมอคือ สภาวะที่ใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 0.09 ml

## 2.2 ผลวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบในอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน

การตรวจวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs โดยทำการตรวจวิเคราะห์เฉพาะสภาวะที่ให้อนุภาคขนาดเล็กของแต่ละปัจจัย คือ  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml

### 2.2.1 ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ( $W_o$ ) เท่ากับ 6

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในอนุภาค FDS-NPs ที่  $W_o = 6$  พบว่ามี Si และ Ru เท่ากับ 79.06 และ 1.36 ขององค์ประกอบธาตุทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Ru กับ Si พบว่ามีปริมาณ Ru อยู่ประมาณ 1.72 % (รูปที่ 1.20 ตาราง 1.2)



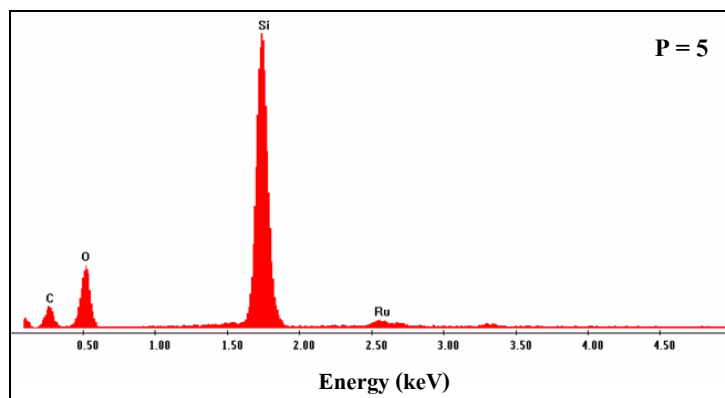
รูปที่ 1.20 ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่  $W_o = 6$

ตารางที่ 1.2 ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่  $W_o = 6$

ธาตุ	สัดส่วนปริมาณโดยน้ำหนัก (%)	สัดส่วนปริมาณโดยโมล (%)
C K	28.58	41.45
O K	32.45	35.34
Si K	36.81	22.84
Ru L	2.16	0.37
Total	100.00	100.00

### 2.2.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) เท่ากับ 5

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในอนุภาค FDS-NPS ที่ P = 5 พบว่ามี Si และ Ru เท่ากับ 74.60 และ 1.65 ขององค์ประกอบธาตุทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Ru กับ Si พบว่ามีปริมาณ Ru อยู่ประมาณ 2.21% (ตารางที่ 1.2)



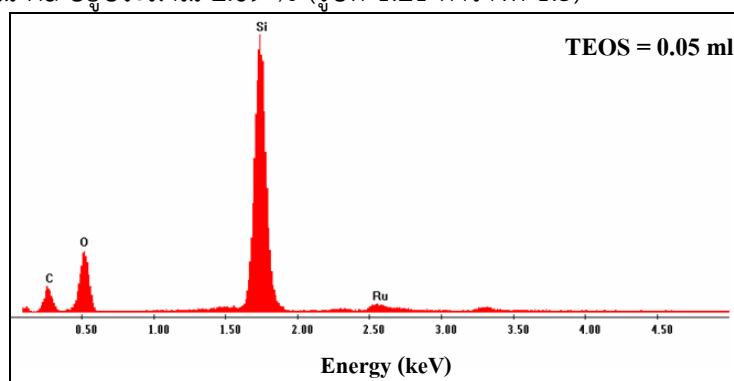
รูปที่ 1.21 ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ P = 5

ตารางที่ 1.3 ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPS ที่ P = 5

ธาตุ	สัดส่วนปริมาณโดยน้ำหนัก (%)	สัดส่วนปริมาณโดยโมล (%)
C K	33.57	47.32
O K	30.11	31.87
Si K	33.82	20.39
Ru L	2.50	0.42
Total	100.00	100.00

### 2.2.3 ผลของปริมาณสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา (TEOS) เท่ากับ 0.05 ml

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในอนุภาค FDS-NPs ที่ TEOS = 0.05 ml พบว่ามี Si และ Ru เท่ากับ 65.74 และ 1.77 ขององค์ประกอบธาตุทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Ru กับ Si พบว่ามีปริมาณ Ru อยู่ประมาณ 2.69 % (รูปที่ 1.21 ตารางที่ 1.3)



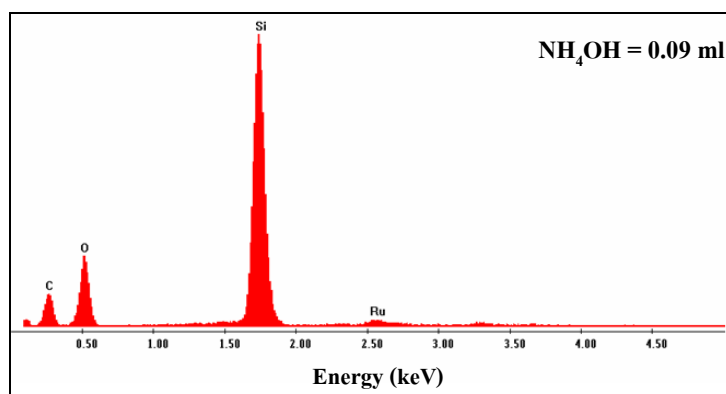
รูปที่ 1.22 ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ TEOS เท่ากับ 0.05 ml

ตารางที่ 1.4 ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ TEOS เท่ากับ 0.05 ml

ธาตุ	สัดส่วนปริมาณโดยน้ำหนัก (%)	สัดส่วนปริมาณโดยโมล (%)
C K	35.87	49.74
O K	29.94	31.17
Si K	31.41	18.63
Ru L	2.78	0.46
Total	100.00	100.00

#### 2.2.4 ผลของปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ซิลิกา (0.09 ml $\text{NH}_4\text{OH}$ )

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในอนุภาค FS-NPs ที่  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 0.09 ml พบว่ามี Si และ Ru เท่ากับ 76.81 และ 1.43 ขององค์ประกอบธาตุทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Ru กับ Si พบว่ามีปริมาณ Ru อยู่ประมาณ 1.86 %



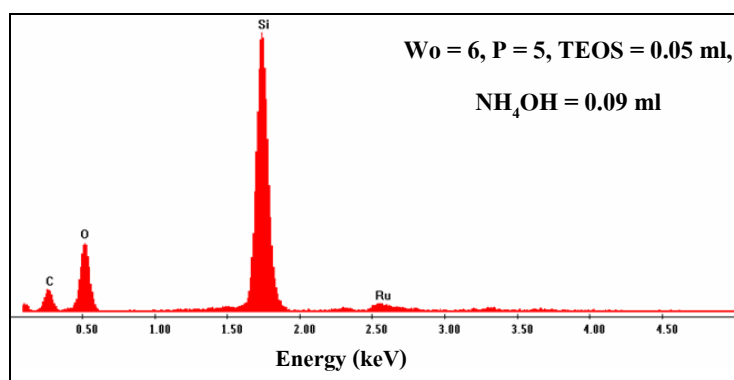
รูปที่ 1.23 ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ  $\text{NH}_4\text{OH}$  เท่ากับ 0.09 ml

ตารางที่ 1.5 ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปริมาณ  $\text{NH}_4\text{OH}$  เท่ากับ 0.09 ml

ธาตุ	สัดส่วนปริมาณโดยน้ำหนัก (%)	สัดส่วนปริมาณโดยโมล (%)
C K	39.87	53.39
O K	29.77	29.93
Si K	28.64	16.40
Ru L	1.73	0.27
Total	100.00	100.00

### 2.2.5 ผลของปัจจัยร่วม

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์โดยปัจจัยร่วมของ  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml พบว่ามี Si และ Ru เท่ากับ 63.27 และ 1.39 ขององค์ประกอบธาตุทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Ru กับ Si พบว่ามีปริมาณ Ru ประมาณ 2.19 % (รูปที่ 1.24 ตาราง 1.6)

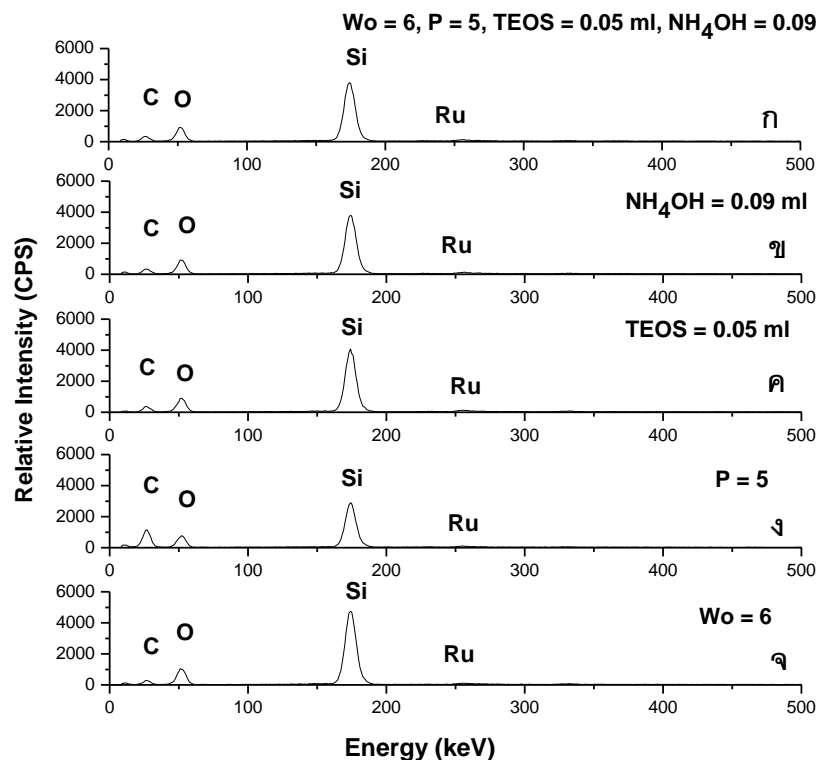


รูปที่ 1.24 ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปัจจัยร่วมของ  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml

ตารางที่ 1.6 ปริมาณธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs ที่ปัจจัยร่วมของ  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ , TEOS = 0.05 ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml

ธาตุ	สัดส่วนปริมาณโดยน้ำหนัก (%)	สัดส่วนปริมาณโดยโมล (%)
C K	35.16	48.65
O K	31.16	32.38
Si K	31.42	18.60
Ru L	2.26	0.37
Total	100.00	100.00

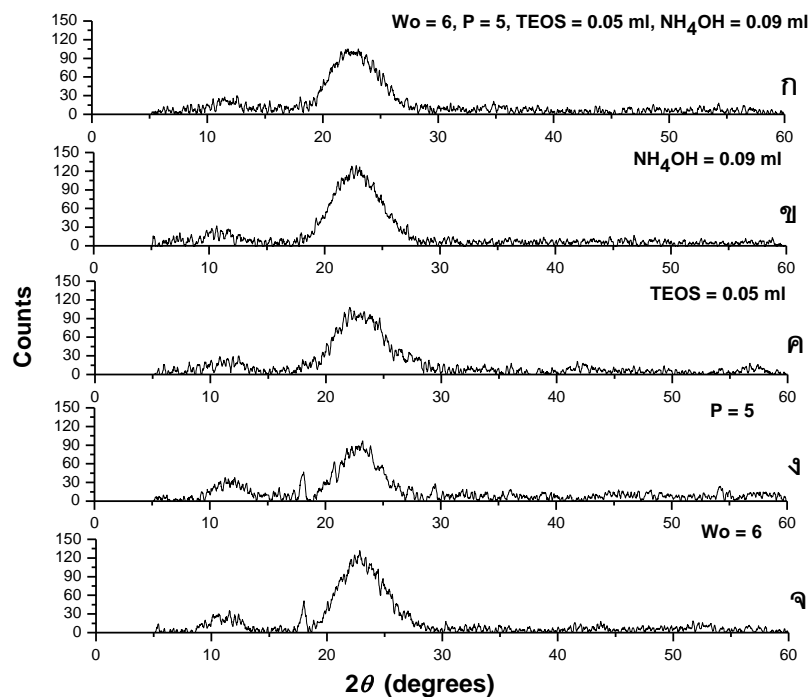
จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในอนุภาค FDS-NPs ที่ทุกๆปัจจัยพบว่า ธาตุองค์ประกอบในอนุภาคเหมือนกันคือคาร์บอน ออกซิเจน ซิลิกา และรูทีเนียม แต่มีปริมาณที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 1.25 จึงสรุปได้ว่าการสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันสามารถทำให้รูทีเนียม ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารละลายสฟลูออเรสเซนต์แทรกอยู่ในโครงร่างของซิลิกาได้



รูปที่ 1.25 ธาตุองค์ประกอบในอนุภาค FDS-NPs จากการสังเคราะห์ที่ (ก)  $W_o = 6$ , (ข)  $P = 5$ , (ค)  $TEOS = 0.05 \text{ ml}$ , (ง)  $NH_4OH = 0.09 \text{ ml}$  และ (จ) ปัจจัยร่วมของ  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ ,  $TEOS = 0.05 \text{ ml}$  และ  $NH_4OH = 0.09 \text{ ml}$

### 2.3 ผลวิเคราะห์โครงสร้างของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน

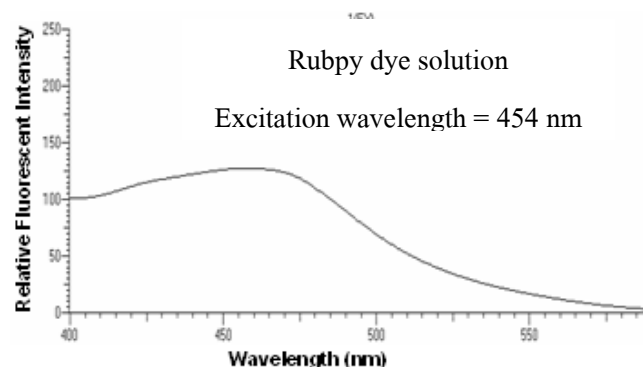
การตรวจวิเคราะห์รูปแบบโครงสร้างซิลิกาของอนุภาค FDS-NPs ด้วยเครื่อง XRD ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจลแสดงในรูปที่ 1.26 ซึ่งทั้ง 4 สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคมีองค์ประกอบในระบบไมโครอิมัลชันแตกต่างกัน จากลักษณะของเส้นกราฟของทุกสภาวะ พบว่าสารที่สังเคราะห์ได้มีโครงสร้างเป็นซิลิกาจริง เพราะตำแหน่งของเส้นกราฟที่  $2\text{-theta} = 12$  และ  $24$  เป็นตำแหน่งที่ลักษณะของเส้นกราฟชัดเจน เส้นกราฟที่ได้มีลักษณะกว้างเนื่องจากอนุภาค FDS-NPs มีขนาดเล็กมากดังนั้น X-rays จึงเลี้ยวเบนได้จากหลายมุมทำให้เส้นกราฟที่ได้ไม่มีลักษณะเป็นพีคที่ชัดเจน แต่เมื่อนำเส้นกราฟที่ได้เปรียบเทียบกับพีคมาตรฐานของ Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) ที่มีการรายงานไว้พบว่าเส้นกราฟที่ไม่ตรงกับพีคมาตรฐานของ JCPDS ใดๆ สำหรับการเตรียมอนุภาค FDS-NPs ด้วยวิธีไมโครอิมัลชันที่สภาวะ  $W_o = 6$  และ  $P = 5$  พบพีคอื่นๆเกิดขึ้นปะปนอยู่ด้วย ที่ตำแหน่งของเส้นกราฟที่  $2\text{-theta} = 18$  อาจจะเป็นผลมาจากการสังเคราะห์ซิลิกาเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์จึงมีองค์ประกอบอื่นๆในระบบไมโครอิมัลชันเกิดพีคขึ้นมา และในงานวิจัยนี้เลือกใช้สภาวะที่มีปริมาณ  $NH_4OH$  เท่ากับ 90 ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ XRD พบว่าไม่มีเฟสส่วนเกินเกิดขึ้น แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซิลิกาได้สมบูรณ์



รูปที่ 1.26 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุภาค FDS-NPs ที่  $W_o = 6$  (A),  $P = 5$  (B),  $TEOS = 0.05$  ml (C),  $NH_4OH = 0.09$  ml (D) และปัจจัยร่วมของ  $W_o = 6$ ,  $P = 5$ ,  $TEOS = 0.05$  ml และ  $NH_4OH = 0.09$  ml (E)

## 2.4 ผลวิเคราะห์ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นและความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง

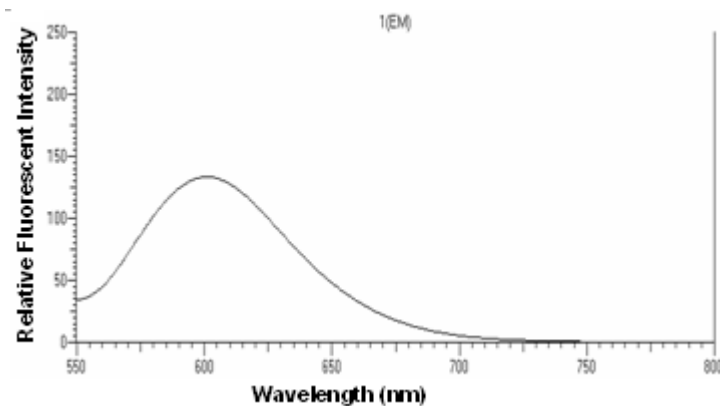
การตรวจวิเคราะห์ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง (emission wavelength) ของอนุภาค FDS-NPs เปรียบเทียบกับสารละลายสีฟลูออเรสซิน จากรูปที่ 1.27-1.30 พบว่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นและ ความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสงของ สารละลายสีฟลูออเรสซิน (Rubpy dye) มีค่าเท่ากับ 454 nm และ 603 nm ตามลำดับ



รูปที่ 1.27 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (excitation wavelength) ของสารละลายสีฟลูออเรสซิน (Rubpy dye)

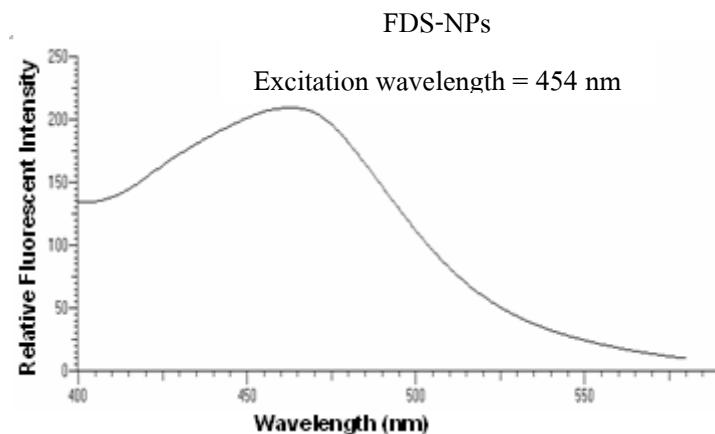
Rubpy dye solution

Emission wavelength = 603 nm



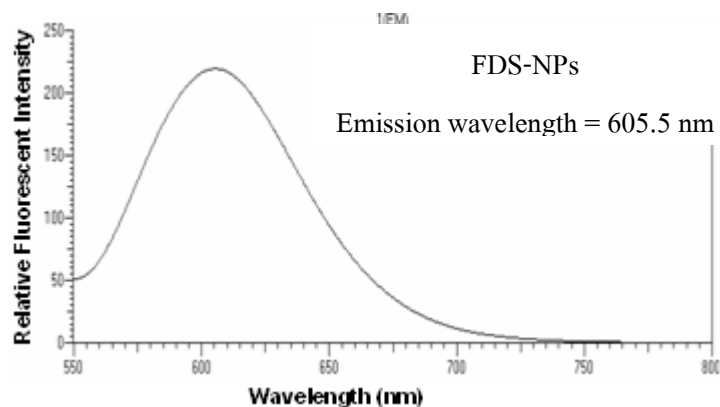
รูปที่ 1.28 ความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง ออกมา (emission wavelength) ของ สารละลายสีฟลูออเรสเซิน (Rubpy dye)

จากรูปที่ 1.29 และรูปที่ 1.30 ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น และความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสงของ อนุภาค FDS-NPs มีค่าเท่ากับ 454 nm และ 605.5 nm ตามลำดับ ซึ่งความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นมี ค่าเท่ากับสารละลายสีฟลูออเรสเซิน และความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสงไม่แตกต่างจากสารละลายสี ฟลูออเรสเซินอย่างมีนัยสำคัญ ในการทดลองนี้ใช้สารละลายสีฟลูออเรสเซินและอนุภาค FDS-NPs ที่มี ความเข้มข้นใกล้เคียงกัน แต่ความเข้มของการเรืองแสงของอนุภาค FDS-NPs สูงกว่าสารละลายสี ฟลูออเรสเซินมาก เนื่องจากโมเลกุลของสีฟลูออเรสเซินนั้นแทรกอยู่ในโครงร่างของซิลิกา



รูปที่ 1.29 ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (excitation wavelength) ของอนุภาค FDS-NPs

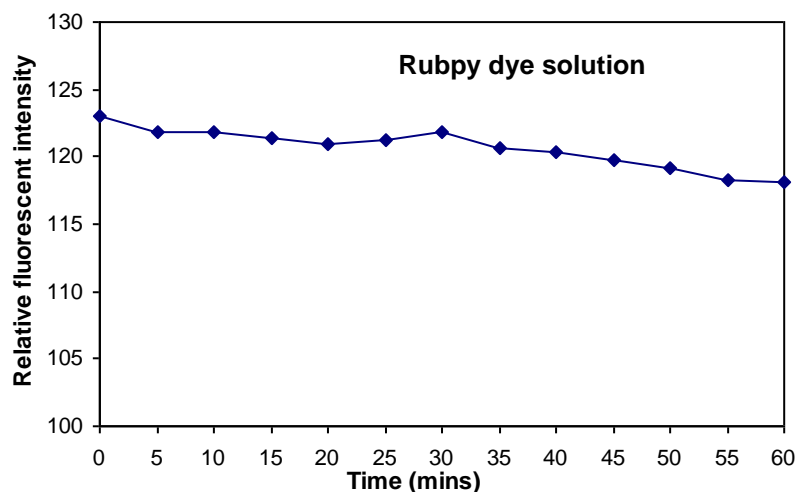




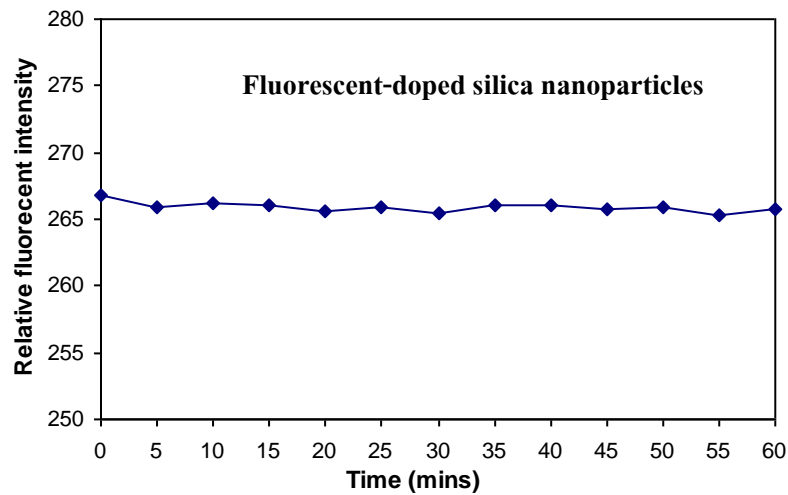
รูปที่ 1.30 ความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง (emission wavelength) ของอนุภาค FDS-NPs

## 2.5 ผลวิเคราะห์ความคงอยู่ของการเรืองแสง (photostability)

จากผลการตรวจวิเคราะห์ความคงอยู่ของการเรืองแสงของสารละลายสีฟลูออเรสซินเปรียบเทียบกับอนุภาค FDS-NPs พบว่ามีค่าการคงอยู่เท่ากับ 95% และ 99% ตามลำดับ หลังจากมีการกระตุ้นด้วย xenon lamp เป็นระยะเวลา 60 นาที โดยการเรืองแสงของอนุภาค FDS-NPs สามารถคงอยู่ได้นานกว่าสารละลายสีฟลูออเรสซิน เนื่องจากอนุภาค FDS-NPs มีโครงสร้างของซิลิกาช่วยปกป้องการชะของสีไว้ได้ และความเข้มของการเรืองแสงของอนุภาค FDS-NPs สูงกว่าสารละลายสีฟลูออเรสซินเนื่องจากโมเลกุลของสีได้แทรกอยู่ในโครงสร้างของซิลิกาในปริมาณสูงจึงทำให้มีความเข้มของการเรืองแสงสูงกว่า (รูปที่ 1.31-1.32)



รูปที่ 1.31 ความคงอยู่ของการเรืองแสงของสารละลายสีฟลูออเรสซิน

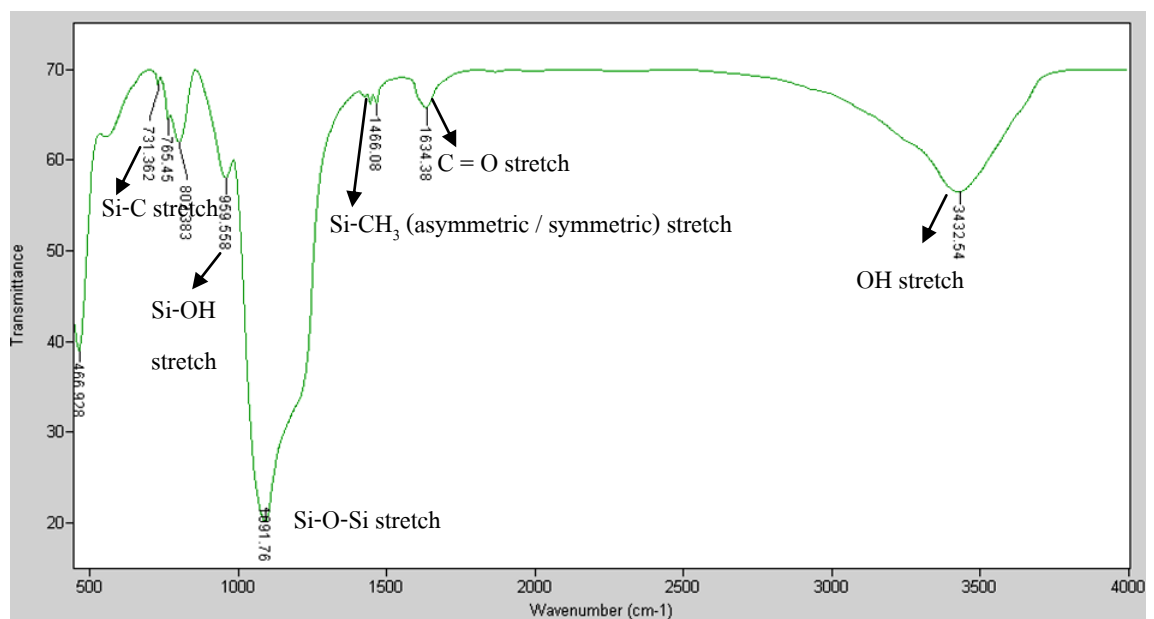


รูปที่ 1.32 ความคงอยู่ของการเรืองแสง ของสารละลายสีฟลูออเรสเซนต์  
เปรียบเทียบอนุภาค FDS-NPs

## 2.3 ผลวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน

### 2.3.1 อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนก่อนดัดแปลงพันธะเคมี

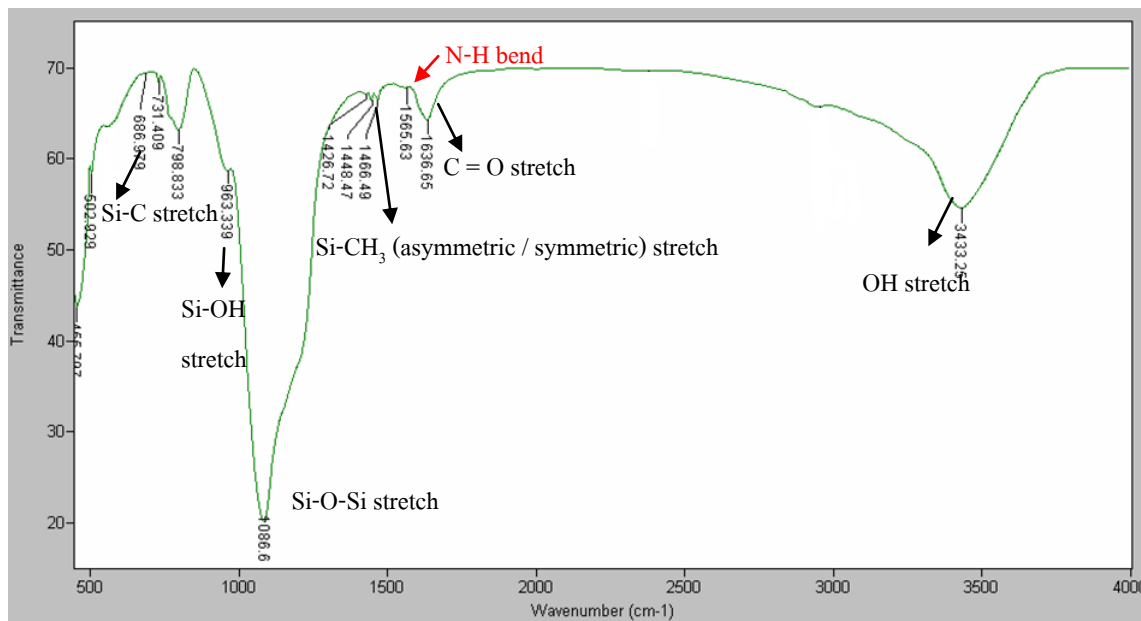
เมื่อนำอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้ และยังไม่ผ่านการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค นำมาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง FTIR พบว่าประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ซึ่งพบที่ความยาวคลื่น  $3,600\text{--}3,200\text{ cm}^{-1}$  หมู่ซิลิกา (Si-O-Si) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ  $1,091\text{ cm}^{-1}$  และหมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ  $1,634\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพิกที่แสดงถึงโครงสร้างหลักของซิลิกาแสดงดังรูปที่ 1.33 (รูปที่ 1.33)



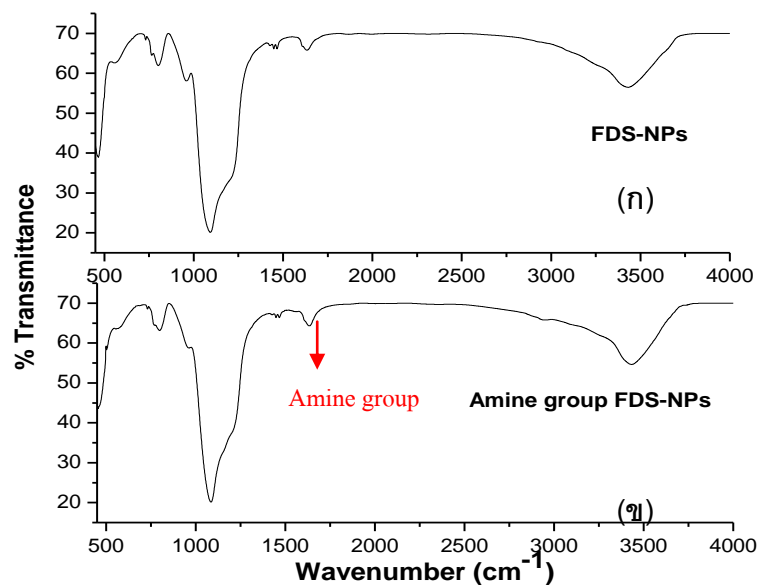
รูปที่ 1.33 FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs ก่อนดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค

### 2.3.2 อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนที่ดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีน

จากผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาค FDS-NPs หลังจกดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีนด้วย (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTS) แสดงดังรูปที่ 1.34 และ 1.35 เปรียบเทียบกับกราฟของอนุภาค FDS-NPs ที่ไม่ได้มีการดัดแปลงพันธะเคมีใดๆ พบว่ามีความแตกต่างกันที่ความยาวคลื่น  $1,565\text{ cm}^{-1}$  มีพีคเกิดขึ้นดังรูปที่ 1.36 พบว่าเป็นตำแหน่งของหมู่เอมีนชนิด primary amine (แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ APTS ทำให้เกิดหมู่เอมีนได้ตามต้องการ



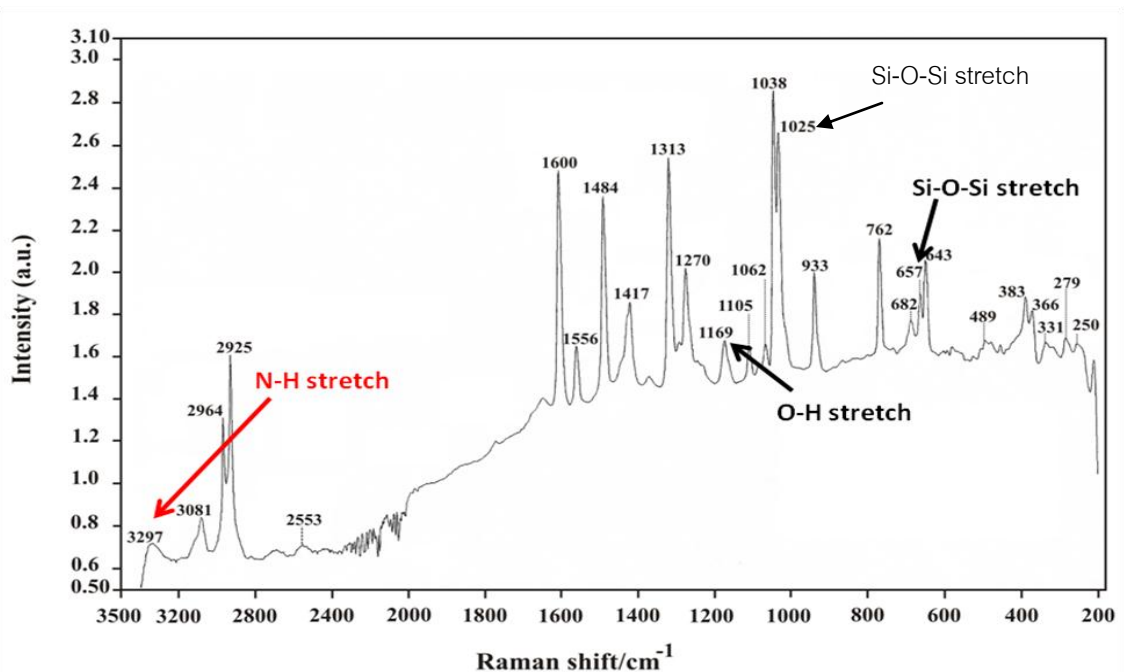
รูปที่ 1.34 FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีน



รูปที่ 1.35 FTIR Spectrum ของ อนุภาค FDS-NPs (ก) ก่อน และ (ข) หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคด้วย (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTS)

ผลการวิเคราะห์ฟังก์ชันของอนุภาค FDS-NPs หลังจากดัดแปลงหมู่พันธะเคมีที่ผิวของอนุภาค FDS-NPs ด้วย Trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) ซึ่งจะสามารถเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของอนุภาค FDS-NPs ที่ยังไม่ได้ดัดแปลงพันธะเคมีใดๆ พบว่ามีความแตกต่างของสเปกตรัมตรงบริเวณความยาวคลื่น  $1,569.10\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นตำแหน่งของหมู่เอมีน

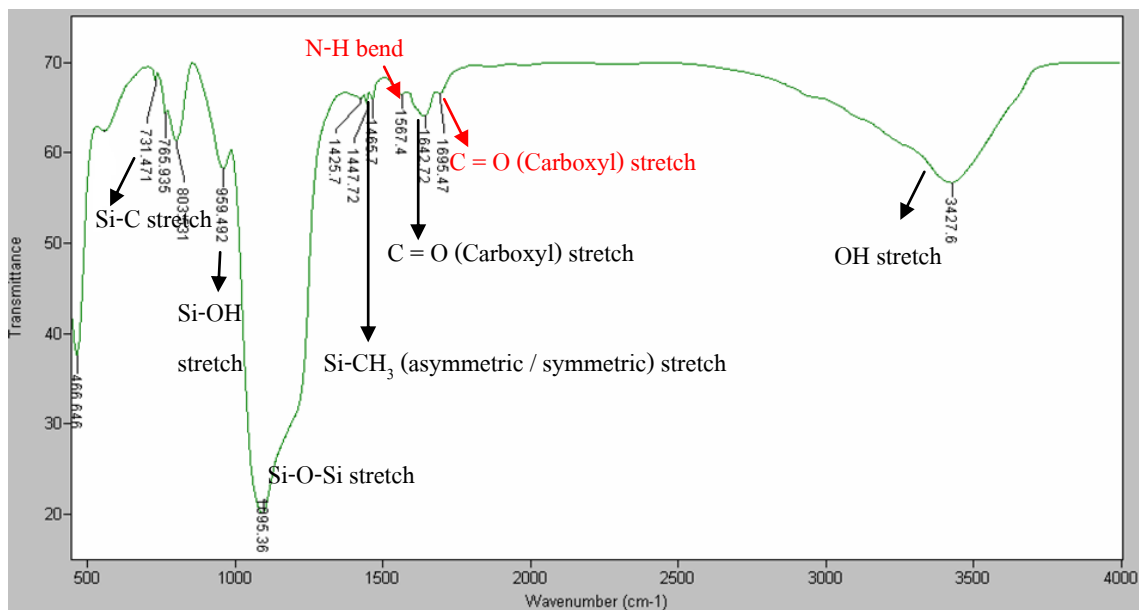
แต่ผลการทดลองดังกล่าวปรากฏ N-H stretch (Amine group) การตรวจวิเคราะห์ของเครื่อง FTIR spectrometer ไม่ชัดเจนจึงทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-Raman spectrometer (รูปที่ 1.36) เพื่อให้พบหมู่ N-H stretch (Amine group) ชัดเจนมากขึ้น โดยพบหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ที่  $1,150\text{-}1,170\text{ cm}^{-1}$  หมู่ซิลิกา (Si-O-Si) ที่  $650\text{ cm}^{-1}$  และยังพบหมู่เอมีน (N-H stretch) ที่  $3,297.88\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งพิกัดสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (แมน อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2539)



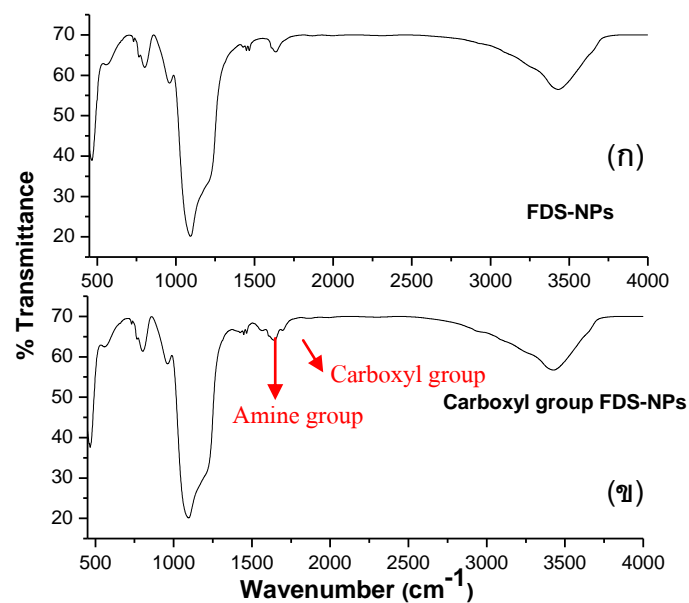
รูปที่ 1.36 FT-Raman spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีนที่ผิวอนุภาค

### 2.3.3 อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนที่ดัดแปลงให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

จากผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาค FDS-NPs หลังจากดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลโดยใช้ trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) เพื่อให้เกิดหมู่เอมีนก่อน หลังจากนั้นใช้ succinic anhydride เพื่อแทนที่หมู่เอมีนทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลแสดงดังรูปที่ 1.37 พบว่ากราฟที่เกิดขึ้นมีพีคที่แตกต่างจากอนุภาค FDS-NPs ที่ยังไม่ผ่านการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค (รูปที่ 1.38) ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น  $1,567\text{ cm}^{-1}$  เป็นหมู่เอมีนชนิด primary amine และที่ตำแหน่งความยาวคลื่น  $1,695\text{ cm}^{-1}$  เป็นหมู่คาร์บอกซิลเกิดขึ้นดังรูปที่ 1.3 (แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535) แสดงว่าสามารถติดตั้งหมู่คาร์บอกซิลที่ผิวอนุภาคได้ตามวัตถุประสงค์ แต่ยังคงเหลือหมู่เอมีนที่ไม่ได้ถูกแทนที่ด้วยหมู่คาร์บอกซิลเหลืออยู่

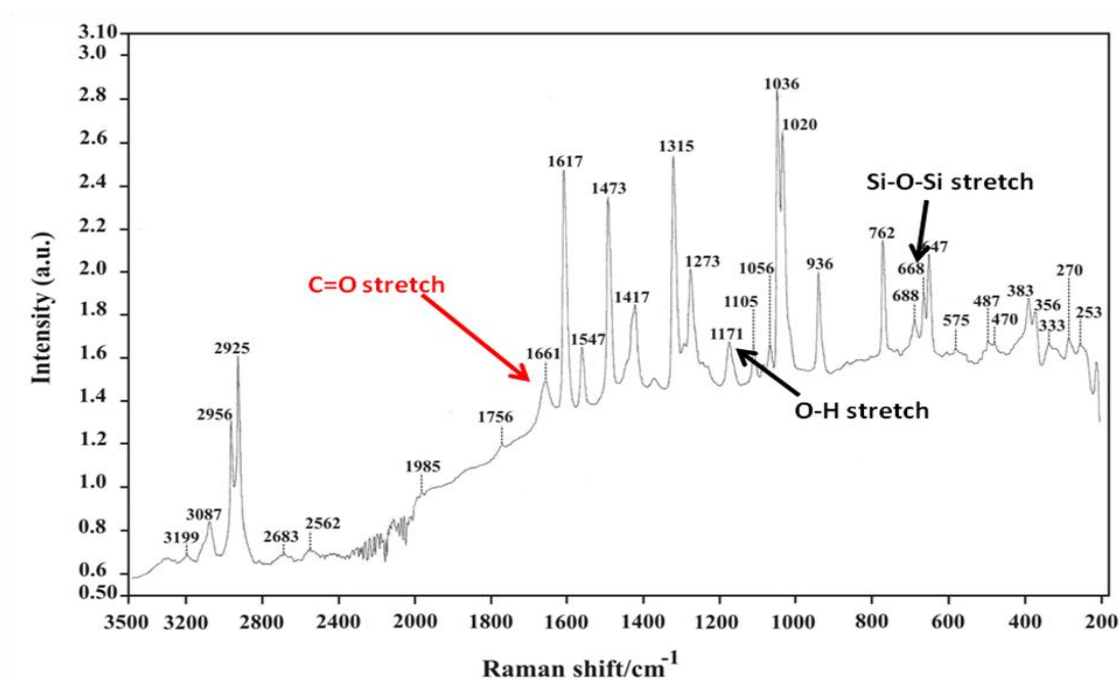


รูปที่ 1.37 FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาค ให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล



รูปที่ 1.38 FTIR spectrum ของอนุภาค FDS-NPs (ก) ก่อน และ (ข) หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคด้วย trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) และ succinic anhydride

แต่ผลการทดลองดังกล่าวปรากฏ C=O stretch (Carboxyl group) ไม่ชัดเจนในการตรวจวิเคราะห์ของเครื่อง FTIR spectrometer จึงทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-Raman spectrometer (รูปที่ 1.39) เพื่อให้พบหมู่ C=O stretch (Carboxyl group) ชัดเจนมากขึ้น ผลปรากฏว่าพบ หมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ที่  $1,150-1,170\text{ cm}^{-1}$  หมู่ซิลิกา (Si-O-Si) ที่  $688.63\text{ cm}^{-1}$  และยังพบหมู่คาร์บอกซิล (C=O stretch) ที่ความยาวคลื่นประมาณ  $1,617.34\text{ cm}^{-1}$

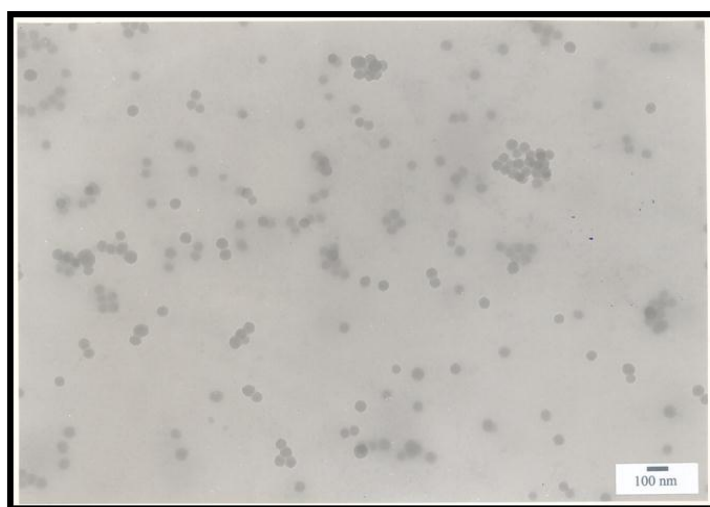


รูปที่ 1.39 FT-Raman spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

#### 4 การเกาะกลุ่มของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน และแอนติบอดี

##### 4.1 การเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนในการสังเคราะห์อนุภาค

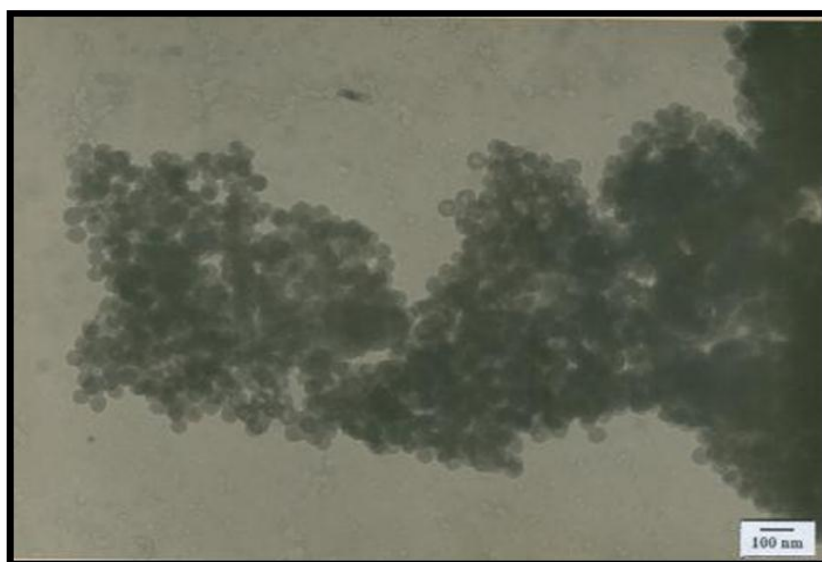
พบว่าการกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคนั้นมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แต่พบการเกาะกลุ่มบ้าง แต่สามารถทำให้กระจายได้ด้วย sonicate probe (รูปที่ 1.40)



รูปที่ 1.40 แสดงการกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการสังเคราะห์ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x

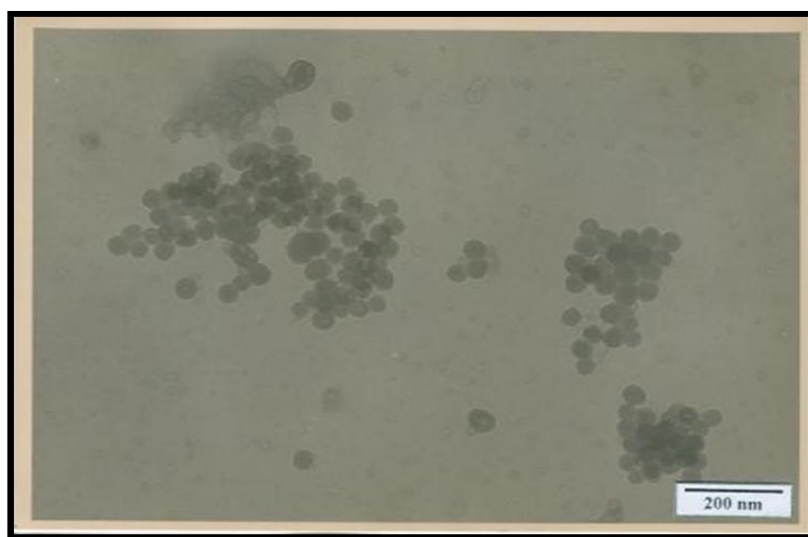
#### 4.2 การเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนในการดัดแปลงพันธะเคมี

พบว่าหลังจากการดัดแปลงพันธะเคมีเกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาค FDS-NPs (รูปที่ 1.41-1.42) การดัดแปลงพันธะเคมีโดยดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีนโดยใช้ Trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) ซึ่งทำให้ผิวของอนุภาค FDS-NPs เกิดมีประจุบวกเกิดขึ้น ทำให้การเกาะตัวกันของอนุภาค FDS-NPs เกิดขึ้น เนื่องจากการเกิดประจุบวกบริเวณผิวไม่สม่ำเสมอ จึงทำให้ยังมีประจุลบของอนุภาค FDS-NPs หลงเหลือจึงเกิดการเกาะตัวกันระหว่างอนุภาคด้วยพันธะไอออนิก (Ionic bond)



รูปที่ 1.41 การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการดัดแปลงหมู่เอมีนภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x



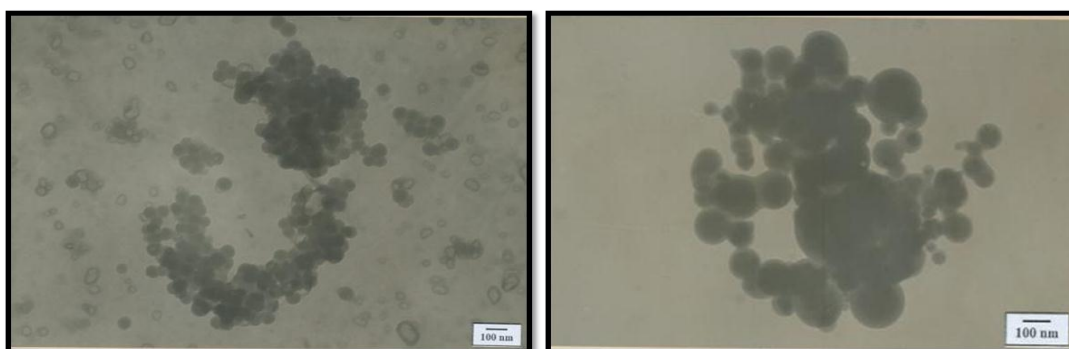


รูปที่ 1.42 การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิลภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 40,000x

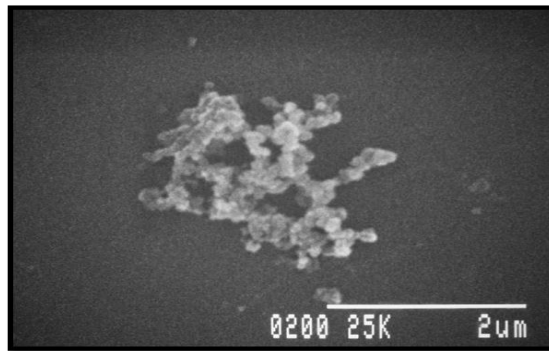
หลังจากผ่านการดัดแปลงหมู่เอมีนยังมีกระบวนการกระจายอนุภาค FDS-NPs โดยใช้เครื่อง sonicate probe และทำการดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิลโดยใช้ Succinic anhydride ซึ่งทำให้บริเวณผิวของอนุภาค FDS-NPs เกิดประจุลบ ซึ่งในขั้นตอนนี้ (รูปที่ 1.42)

#### 4.3 การเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนในการติดแอนติบอดี

พบว่าหลังจากอนุภาค FDS-NPs ติดแอนติบอดีแล้วเกิดการเกาะตัวกันระหว่างอนุภาคมีมากขึ้น โดยจะมีแอนติบอดีเคลือบอนุภาค FDS-NPs อีกชั้นหนึ่ง (รูปที่ 1.43)



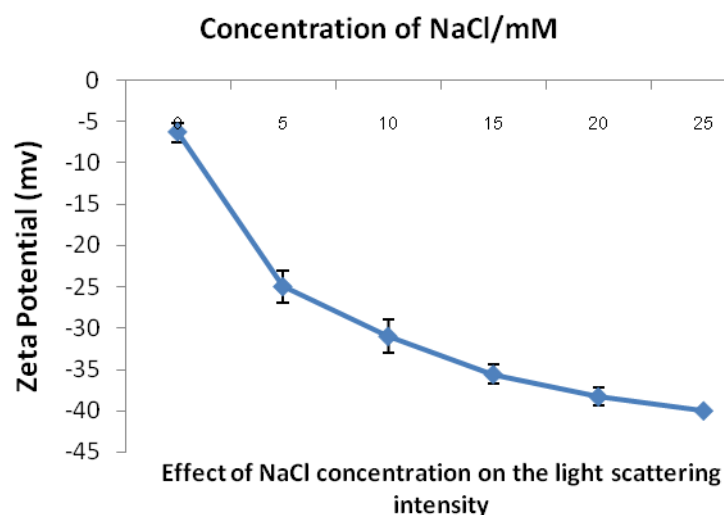
รูปที่ 1.43 การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการติดแอนติบอดี ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x



รูปที่ 1.44 การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการติดแอนติบอดี ภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 25,000x

##### 5 การเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนโดยใช้ Zeta potential

การตรวจสอบความกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs โดยเทียบจากความเข้มข้นตัวอย่างมาตรฐานกับความเข้มข้นของ NaCl ให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 mM ใน PBS buffer ในทุกสารละลายที่มี PBS buffer เกี่ยวข้อง ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Nano-sizer (Light scattering detector) (รูปที่ 1.44) พบว่าความเข้มข้นตัวอย่างมาตรฐานมีค่า zeta-potential เท่ากับ -6mv อยู่ในช่วง 30 ถึง -30 mV ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสารแขวนลอยที่ยังไม่เสถียร (ไม่เกิดแรงผลักระหว่างอนุภาค FDS-NPs) แต่ความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 10 mM ถึง 25 mM มีค่า zeta-potential น้อยกว่า -30 mV (รูปที่ 1.45) ซึ่งค่าดังกล่าวจะสามารถแสดงให้เห็นการเกาะตัวระหว่างอนุภาค FDS-NPs เป็นสารแขวนลอยที่มีความเสถียร (เกิดแรงผลักระหว่างอนุภาค FDS-NPs) ซึ่งค่าที่ให้ผลดีที่สุดคือค่า 10mM NaCl ใน PBS buffer ซึ่งใช้ในการเก็บอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดีแล้ว ทำให้ลดการเกาะตัวกันของอนุภาค FDS-NPs ลงได้ และยังสามารถคงการทำงานของแอนติบอดีได้ ส่วนความเข้มข้นมากกว่านี้จะมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดี (Baoan, 2007)



รูปที่ 1.45 แสดงความเข้มข้นของ NaCl ในระดับต่างๆ ตั้งแต่ 5 mM – 25 mM โดยกำหนดที่ 0 mM เป็นความเข้มข้นตัวอย่างมาตรฐาน

## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จเกินกว่าเป้าหมายที่วางไว้ โดยมีผลดำเนินการสำเร็จคือ

1. การสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาฟลูออเรสเซนต์ด้วยวิธีไมโครอิมัลชันร่วมกับโซลเจลเทคนิค
2. ศึกษาสมบัติด้านกายภาพของอนุภาคซิลิกาฟลูออเรสเซนต์ ด้านขนาด รูปร่าง ความคงตัวของโมเลกุลของสีในร่างแหซิลิกา
3. การเคลือบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรียก่อโรค
4. การแก้ปัญหาคาการเกาะจับกันของอนุภาคด้วยการปรับค่า zeta potential ให้เหมาะสม
5. เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์เชื้อ ด้วยการเพิ่มสัญญาณจากการใช้อนุภาคซิลิกาที่มีโมเลกุลของสี RubPy dye จำนวนมาก เกาะจับกับเชื้อได้จำนวนมากกว่า 1 พันอนุภาค ทำให้สามารถขยายสัญญาณอย่างรวดเร็ว ลดเวลาการวิเคราะห์ลงได้อย่างมาก เหลือเพียงประมาณไม่เกิน 1 ชั่วโมงเท่านั้น

## เอกสารอ้างอิง

- แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2539, หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ, ชวนพิมพ์, กรุงเทพฯ ฯ, หน้า 108-192.
- พัชรีย์ แก้วดวง, 2547, การพัฒนาวิธี Immunomagnetic Separation สำหรับการตรวจหา Salmonella ที่พบมากในประเทศไทย, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, หน้า 59-60.
- อรุณ บำตรตระกูล, 2540, การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารและผลิตภัณฑ์ : ผลการสำรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในประเทศไทย, การสัมมนาเรื่องความก้าวหน้าในการตรวจหาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ, บริษัทเมอร์ค จำกัด, กรุงเทพฯ, 215 หน้า.
- Abarkan, I., T. Doussineau and M. Smaïhi. 2006. Tailored macro/microstructural properties of colloidal silica nanoparticles via microemulsion preparation. *Polyhedron* 25 (8): 1763-1770.
- Bagwe, R. P., Yang, C., Hilliard, L. R. and Tan, W. (2004) Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method. *Langmuir* 20, 8336-8342.
- Bogush, G.H., Tracy, M.A., and Zukoski, C.F., 1988. Preparation of monodisperse silica particles, control of size and mass fraction. *Journal of Non Crystalline Solids*, 104: 95-106.
- Bruce, I.J. and Sen, T., 2005, "Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations", *Langmuir*, 21: 7029-7035.
- Sherma, S.K. and Whiting, R.C., 2005, "Methods for detection of *Clostridium botulinum* toxin in foods", *Journal of Food Protection*, 68:1256-1263.
- Stöber, W., A. Fink and E. Bohn. 1968. Controlled growth of monodisperse silica spheres in micron size range. *Colloid Interf. Sci.* 26 (1): 62-69.
- Suwanachart, T., P. Tuitemwong, P. Ketkaew and S. Angkaew, 2007, Preparation of Fluorescent-dye Doped Silica particles via W/O Microemulsion: Effect of Water-surfactant Ratio on particle Size, The First Thailand National Technology Conference, 14-16, August, 2007, Chiang Mai.
- Tansub, W., K. Tuitemwong, P. Limsuwan, S. Theparoonrat, and P. Tuitemwong, 2012. Synthesis of antibodies-conjugated fluorescent dye-doped silica nanoparticles for a rapid single step detection of *Campylobacter jejuni* in live poultry. *J. Nanomaterials*, Vol 2012, Article ID 865186, 7 pages, doi: 10.1155/2012/865186.

- Wang, L., Wang, K., Santra, S., Zhao, X., Hilliard, L.R., Smith, J.E., Wu, Y. and Tan, W., 2006, "Watching Silica Nanoparticles Glow in the Biological World", *Analytical Chemistry*, 78:646-654
- Wang, L., Zhao, W., O'Donoghue, M.B. and Tan, W., 2007, "Fluorescent Nanoparticles for Multiplexed Bacteria Monitoring", *Bioconjugate Chemistry*, 18: 297-301.
- Ye, Z., Tan, M., Wang, G. and Yuan, J., 2004, "Novel fluorescent europium chelate-doped silica nanoparticles: preparation, characterization and time-resolved fluorometric application", *Journal of Materials Chemistry*, 14: 851-856.
- Zhao, X., Hilliard, L.R., Mechery, S.J., Wang, Y., Bagwe, R.P., Jin, S. and Tan, W., 2004, "A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:15027-15032.

## รายนามคณะผู้วิจัยโครงการที่ 1 พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์

### 1.1 หัวหน้าโครงการ:

รศ.ดร. ประเวทย์ ตัญเตี้มวงศ์

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ความเสี่ยงและการตัดสินใจ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

โทรศัพท์ 0-2470-8885 โทรสาร 0-2427-8050, 0-2470-8885

E-mail: [pravate.tui@kmutt.ac.th](mailto:pravate.tui@kmutt.ac.th) ลักษณะและสัดส่วนของงาน (60%)

### 1.2 ผู้ร่วมงานวิจัย

1.2.1 ดร. กิตติศักดิ์ชัย แนนจันทร์

อาจารย์ระดับ ว.2

ภาควิชาฟิสิกส์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

โทรศัพท์ 0-2470-8873 โทรสาร 0-2427-8785

E-mail: [kittisakchai.nam@kmutt.ac.th](mailto:kittisakchai.nam@kmutt.ac.th) ลักษณะและสัดส่วนของงาน (10%)

1.2.2 ดร. อารี ทัตติยพงษ์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

โทรศัพท์ 0-2951-0000 ext. 98331 โทรสาร 0-2951-5449

E-mail: [aree.t@dmasc.mail.go.th](mailto:aree.t@dmasc.mail.go.th) ลักษณะและสัดส่วนของงาน (10%)

1.2.3 ผศ.ดร.กัญทิรา เกตุแก้ว

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

โทรศัพท์ 0-2470-8841 โทรสาร 0-2470-8843

E-mail: [pintira.ket@kmutt.ac.th](mailto:pintira.ket@kmutt.ac.th) ลักษณะและสัดส่วนของงาน (10%)

## โครงการย่อยที่ 2

(ภาษาไทย) การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติอนุภาคอะมิโนเฟอร์ไรต์แม่เหล็กสำหรับวิเคราะห์เชื้อโรคในอาหารอย่างรวดเร็ว

(ภาษาอังกฤษ) Synthesis of amino functionalized ferromagnetic particles for the rapid detection of foodborne pathogens

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กพร้อมหมู่อะมิโน (amino functionalized magnetic nanoparticle, amino-MNPs) เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 อย่างรวดเร็ว โดยการสังเคราะห์ใช้เทคนิค polyol ดัดแปลง ที่อุณหภูมิ 121°C รอบละ 2 ชั่วโมง จำนวน 1-4 รอบ พบว่าสามารถสังเคราะห์อนุภาค MNPs ได้สำเร็จ ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้เกิดสภาพต่างที่มีผลต่อการฟอร์มตัวของอนุภาค ที่ความเข้มข้น 2.50% (w/v) NaOH และทำปฏิกิริยาจำนวน 3 รอบ สามารถสังเคราะห์อนุภาค MNPs ที่มีหมู่อะมิโน มีโครงสร้างเป็นลูกบาศก์ ขนาดสม่ำเสมอ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง  $43 \pm 9$  nm อนุภาค MNPs สามารถเกาะติดแอนติบอดีต่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 (16 CFU in 10 ml) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (IgGs) ได้ พบว่าอนุภาคสามารถเกาะติดกับเชื้อเป้าหมายได้ในระดับต่ำๆ ได้ดีในเวลา 60-120 นาที จึงสรุปว่าอนุภาค MNPs นี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์เชื้อหรือชีวโมเลกุลได้อย่างรวดเร็วได้

### Abstract

The objective of this study was to synthesize amino functionalized magnetic nanoparticles (amino-MNPs) for the rapid *Escherichia coli* O157:H7 detection. The amino-functionalized magnetic nanoparticles (MNPs) were synthesized using modified polyol technique at 121 °C, 2 hours/cycle for 1-4 cycles. It was found that the MNPs were successfully synthesized. Results showed that amount of NaOH affected to the rates of MNP formation. The addition of 2.50% (w/v) NaOH for 3 reaction cycles produced desirable structure of amino-MNPs of average  $43 \pm 9$  nm in diameter with cubic shape. The MNPs were coated directly with purified polyclonal antibodies (IgGs) against *E. coli* O157:H7. Results indicated that MNPs could separate a very low amount of cells of *E. coli* O157:H7 (1.6 CFU/ml). It was concluded that MNPs were successfully developed with a high potential to be used for the detection of bacteria and other bio-molecules in the future.

## Introduction

The identification and detection of microorganisms are of great importance for medical studies, therapeutic applications, food industry and biological analysis. In food and medicine, the accuracy and rapid methods to diagnose pathogens in patients are very essential to further cure them as well as in food industry, a good microbial detection method will give confidence to the consumers on the product safety.

Traditional microbiological methods of detecting and enumerating bacteria usually require several days to yield reliable results. In many cases, the products have already been used by the consumers before the analyses are completed. Therefore, alternative assays based on different microbiological methods are constantly being developed (Vanne *et al.*, 1996). The effective testing of bacteria requires methods of analysis that meet a number of challenging criteria. Time and sensitivity of analysis are the most important limitations related to the usefulness of microbiological testing. Bacterial detection methods have to be rapid and very sensitive since the presence of even a single pathogenic organism in the body or food may be an infectious dose (Ivnitski *et al.*, 1999). To achieve good detections, rapid methods are promising one to detection of contaminated microbes in sample including foods, blood or environment. Most rapid methods utilize principle of microbiological, chemical, biochemical, or immunological methods. These methods spend short time consumption, high accuracy, high sensitivity and comfortable but still require the high number of organism to detectable level.

## Review of Literatures

From the current development of technology, nanotechnology, a new technology of this century has been a role in variety of sciences including microbiology. The researchers have changed traditional methods into nanoscale and combine different techniques to develop detection methods. Early applications of nanotechnology for detection of bacteria were based on surface plasmon resonance phenomenon of gold or metal nanoparticles. Combination of optical property and immunological method, these nanoparticles will change color when they accumulate on antigens (Daniel and Astruc, 2004). Quantum dots, semiconductor nanocrystals, are famous one in microbiological and biochemical analysis field based on immnofluorescent technique. It expresses high florescent intensity and narrow wavelength emission that increase sensitivity of detection (Dwarakanath *et al.*, 2004). This approach allows one to overcome enrichment time by increasing detection signals in stead.

By the combination of sol-gel technology and microemulsion method, Santra *et al.* (2001) have created dye-doped silica nanoparticles or sometimes so-called fluorescent dye-doped silica nanoparticles (FDS-NPs) which encapsulates many thousands of dye molecules inside the nanoparticles. Superior than quantum dots, silica nanoparticles are high intensity of the fluorescent signal and high photostability due to dye molecules were doped within silica matrix. They showed high solubility, low toxicity and easy conjugation with various biomolecules because of silica properties that allowed these nanoparticles suitable for biomedical or *in vivo* applications. Since the FDS-NPs have been developed, many experiments on synthesis, characterization and application were continually reported. For examples, Hun and Zhang (2007) use FDS-NPs for the determination of staphylococcal enterotoxin C1. Especially in microbial detection works, Zhao *et al.* (2004) used FDS-NPs combined with flow cytometry for single bacterial cell quantification and Qin *et al.* (2007) had succeeded to use these nanoparticles for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*.

Magnetic nanoparticles (MNPs) are also of interest among other nanoparticles due to its various biological applications such as contrast agent for magnetic resonance imaging (MRI), tissue repair, drug delivery, hyperthermia or magnetofection (Gupta and Gupta, 2005; Guo *et al.*, 2009). Magnetic separation is also well known for a long time as a technique to separate target cells or biomolecules from other components in samples. By the use of immunomagnetic nanoparticles, coated antibodies on their surface will lead to capture target antigens specifically. When external magnetic field is exposed, the antigens will be attracted. This technique can improve sensitivity by concentration of targets and decrease interference from undesirable substances. Recently, MNPs were made and gained more attention compared with conventional immunomagnetic beads. Unlike immunomagnetic beads which have large size over than 1  $\mu\text{m}$ , MNPs are very smaller with the size less than 100 nm (0.1  $\mu\text{m}$ ). That gives these nanoparticles high surface/volume ratio compared with immunomagnetic beads resulting in more contact surface area to coat antibodies and capture targets (Cheng *et al.*, 2009).

Therefore, the synthesise and characterize silica nanoparticle (FDS-NPs) and amino functionalized magnetic nanoparticles (amino-MNPs) for microbiological applications were attempted in this study to provide rapid alternative method of detection and identification.



## Magnetic nanoparticles

Magnetism is an interesting property of materials. Ancient human knew how to use magnet for navigation. Nowadays, magnetic property is widely used in variety applications including the nanotechnology in forms of MNPs. These particles are emerging as a class of novel contrast and tracking agents for medical imaging. When used as a contrast agent for MRI, MNPs allow researchers and clinicians to enhance the tissue contrast of an area of interest. With variations in the size, coating thickness, surface chemistry, and targeting ligands, these nanoparticles can be tailored to target specific organs, cells, or even molecular markers of different diseases (LaConte *et al.*, 2005).

MNPs have a high potential for the use in a lot of *in vitro* and *in vivo* applications. In both cases, superparamagnetic particles are of interest because they do not retain any magnetism after removal of magnetic field. The effectiveness of the particles depends upon (Gupta and Gupta, 2005) several factors: high magnetic susceptibility for an effective magnetic enrichment, size of particles which should be monosized, superparamagnetic behavior, and tailored surface chemistry for specific biomedical applications, for example.

MNPs show remarkable new phenomena such as superparamagnetism, high field irreversibility, high saturation field, extra anisotropy contributions or shifted loops after field cooling. These phenomena arise from finite size and surface effects that dominate the magnetic behavior of individual nanoparticles. The nanoparticles display a property defined as superparamagnetism because they have crystal-containing regions of unpaired spins. These magnetic domains are disordered in the absence of a magnetic field, but when a field is applied, the magnetic domains align to create a magnetic moment much greater than the sum of the individual unpaired electrons.

### 1. Magnetic behaviors

To clearly understand about MNPs, it must have a knowledge about magnetism and magnetic properties before. According to Lacheisserie *et al.* (2002), they have presented the main types of magnetic behaviors for the following:

#### 1.1 Diamagnetism

Diamagnetism characterizes substances that have only non magnetic atoms: their magnetization, induced by the field, is very weak, and is opposite to the field direction. The susceptibility, virtually independent of the field and temperature, is negative. This magnetism originates from the change in the electronic orbital

motion under the effect of the applied magnetic field. The first diamagnetic substance is bismuth that was discovered by Michael Faraday in 1846.

## 1.2 Paramagnetism

In a large number of cases the magnetism of paramagnetic substances originates from the permanent magnetic moment of some or all of the constituent atoms or ions. If these moments have negligible interactions with each other, and can orient themselves freely in any direction, this is called paramagnetism of free atoms.

On applying a magnetic field, the average direction of the moments is modified, and an induced magnetization parallel to the field appears. This magnetization is lower the higher the temperature, i.e. the larger thermal agitation. When increasing temperature the variations of magnetization as a function of the field become more and more linear. The low field susceptibility is positive, become infinite at 0 kelvin, and decreases when temperature is increased.

## 1.3 Antiferromagnetism

Antiferromagnetism, macroscopically similar to paramagnetism, is a weak form of magnetism, namely with a weak and positive susceptibility. However the thermal variation of the reciprocal susceptibility, measured on a polycrystalline sample, exhibits a minimum at the so called Néel temperature ( $T_N$ ), of an antiparallel arrangement of the magnetic moments. The latter are distributed, in the most simple cases, into two sublattices, with their magnetization equal and opposite, in such a way that, in the absence magnetic field, the resulting magnetization is zero. Antiferromagnetic substances are metal oxide compounds of iron, nickel, cobalt or manganese.

## 1.4 Ferromagnetism

A ferromagnet, like a paramagnetic substance, has unpaired electrons. However, in addition to the electrons' intrinsic magnetic moments tendency to be parallel to an applied field, there is also in these materials a tendency for these magnetic moments to orient parallel to each other to maintain a lowered energy state. Thus, even when the applied field is removed, the electrons in the material maintain a parallel orientation.

Every ferromagnetic substance has its own individual temperature, called the Curie temperature, or Curie point, above which it loses its ferromagnetic properties. This is because the thermal tendency to disorder overwhelms the energy-lowering due to ferromagnetic order.

Ferromagnetic substances comprise of 5 elements such as iron, cobalt, nickel, gadolinium and dysprosium.

### 1.5 Ferrimagnetism

Like ferromagnetism, ferrimagnets retain their magnetization in the absence of a field. However, like antiferromagnets, neighboring pairs of electron spins like to point in opposite directions. These two properties are not contradictory, because in the optimal geometrical arrangement, there is more magnetic moment from the sublattice of electrons that point in one direction, than from the sublattice that points in the opposite direction.

The first discovered magnetic substance, magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), was originally believed to be a ferromagnet; Louis Néel disproved this, however, with the discovery of ferrimagnetism. Other ferromagnetic substances are in the form of ferrite ( $\text{XOFe}_3\text{O}_4$ ), when X are Fe, Mn, Co, Ni, Cu, Mg, Zn or Cd.

### 1.6 Superparamagnetism

Superparamagnetism is a form of magnetism, which appear in small ferromagnetic or ferrimagnetic nanoparticles. In small enough nanoparticles, magnetization can randomly flip direction under the influence of temperature. The typical time between two flips is called the Néel relaxation time. In the absence of external magnetic field, when the time used to measure the magnetization of the nanoparticles is much longer than the Néel relaxation time, their magnetization appears to be in average zero: they are said to be in the superparamagnetic state. In this state, an external magnetic field is able to magnetize the nanoparticles, similarly to a paramagnet. However, their magnetic susceptibility is much larger than the one of paramagnets.

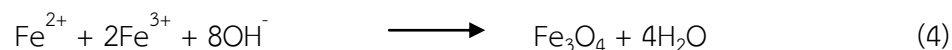
## 2. Synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles

In the last decade, increased investigations with several types of metal oxides have been carried out in the field of nanosized magnetic particles (mostly maghemite,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  and magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), among which magnetite is a very promising candidate since its biocompatibility has already proven. From many researches about iron oxide nanoparticles, there are several ways for synthesis depend on the purpose of applications. However, it could be summarized some of the favor methods as follows:

### 2.1 Coprecipitation technique

This is an easy and facile method to generate either  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  or  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  magnetic nanoparticles. The nanoparticles are prepared by aqueous of ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) and ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) salt at an appropriate molar ratio in base solution (Chatterjee *et al.*,

2003; Sipos, 2006; Hua *et al.*, 2008) The overall reaction may be written as follows (Gupta and Gupta, 2005):



While the reaction is operating, the environment of reactor should be free-oxygen. Otherwise,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  might also be oxidized as



Although this conventional method is easy but it is difficult to control sizes. Moreover, the particles that obtain usually polydisperse and size distributions (Sun *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2009).

## 2.2 Microemulsion technique

Microemulsions are transparent, isotropic and thermodynamically stable synthesis medium. In particular, water-in-oil microemulsions are formed by well-defined nanodroplets of the aqueous phase, dispersed by the assembly of surfactant molecules in a continuous oil phase (Vidal-Vidal *et al.*, 2006). In water-in-oil microemulsions, the aqueous phase is dispersed as nanodroplets (typically 1–50 nm in size) surrounded by a monolayer of surfactant molecules in the continuous hydrocarbon phase. When a soluble metal salt is incorporated in the aqueous phase of the microemulsion, it will reside in the aqueous nanodroplets surrounded by oil. These nanodroplets will continuously collide, coalesce, and break again (Gupta and Gupta, 2005). Water-in-oil microemulsions have successfully been used to produce a variety of nanoparticle shapes and sizes. Nevertheless, it is not known how such templates control the size and shape of the resulting nanoparticles, and therefore, this issue still requires further examination. It is known that type and concentration of surfactant, both oil, and alcohol types, droplet core size, speed of microemulsion mixing and particle aging, influence particle shape, size and/or growth rate (Bumajdad *et al.*, 2007).

## 2.3 Polyol technique

Polyol technique is a promising technique for the preparation of MNPs that could be used in biomedical applications such as MRI or drug delivery (Guo *et al.*, 2009). Fine metallic particles can be obtained by reduction of dissolved metallic salts and direct metal precipitation from a solution containing a polyol. In the polyol process, the liquid polyol acts as the solvent of the metallic precursor, the reducing agent and in some cases as a complexing agent for the metallic cations. The metal

precursor can be highly or only slightly soluble in the polyol. The solution is stirred and heated to a given temperature reaching the boiling point of the polyol for less reducible metals. By controlling the kinetic of the precipitation, nonagglomerated metal particles with well-defined shape and size can be obtained. A better control of the average size of the metal particles can be obtained by seeding the reactive medium with foreign particles (heterogeneous nucleation). In this way, nucleation and growth steps can be completely separated and uniform particles result.

#### 2.4 High-temperature decomposition of organic precursors

The decomposition of iron precursors in the presence of hot organic solvents which act as surfactants (mostly oleic acid) improved samples with good size control, narrow size distribution and good crystallinity of individual and dispersible magnetic iron oxide nanoparticles (Hyeon *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003).

Although MNPs own well-defined monodisperse size, some disadvantages of this technique were described by Guo *et al.* (2009). For examples, require steps for removing the non-polar solvent from the particles. The nanoparticles with dimensions on the order of 10 nm, have a low magnetization per particle, so that it is difficult to effectively separate them from solution or control their movement. Most importantly, the use of expensive organic agents and high temperature will lead to the large wastage of material and energy.

### 3. Magnetic nanoparticles for microbial detection

For detection of bacteria by magnetic particles, the magnetic particles are usually coated with antibodies which specific to bacterial targets. These particles will attach on targets and separate them from the environment by attraction of magnet. This could allow to detect bacteria even if there are very few cells in samples. Magnetic particles has been used in bioanalysis long time ago, that well known as immunomagnetic beads. Immunomagnetic beads are typically 1-2  $\mu\text{m}$  in diameter, they can detect at low level of bacterial cells in the sample and do not require pre-enrichment or incubation.

However, long-run biological analysis development, nanotechnology was used to improve detection methods. MNPs, a new nanoparticle of the last decade, are applied for bacterial detection. Unlike immunomagnetic beads, MNPs are usually smaller than 100 nm and high surface volume ratio, that allow the particles excellently attach on targets. Cheng *et al.* (2009) developed a method for assay of *Escherichia coli* (*E. coli*) using biofunctional magnetic nanoparticles (BMNPs) in combination with adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence or Yang *et al.* (2007) developed a method combining nanoparticle-based immunomagnetic

separation (IMS) with real-time PCR for a rapid and quantitative detection of *Listeria monocytogenes*.

### Surface modification of nanoparticles

Nanoparticles are widely used for biological applications that almost are involved with biomolecules. However, several types of nanoparticles cannot directly conjugate with biomolecules. Thus, it must do something on their surface to allow biomolecules can immobilize onto the particle surface.

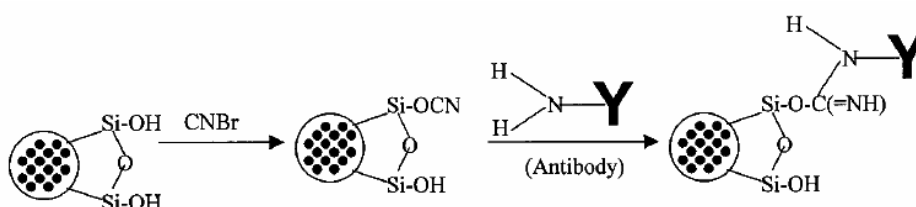
For silica nanoparticles, due to the silica nanoparticle property that has many hydroxyl groups on the surface. This functional group eases to be modified to become other functional groups and easily conjugate with other materials especially biomolecules such as enzymes and antibodies.

MNPs are quite different from silica nanoparticles, their surfaces are inert because they have no any functional group that can react with biomolecules. This problem can be solved by coating the nanoparticles with silica layer that allow the MNPs to have hydroxyl groups the same as that of the silica nanoparticles. Silica layer will give the MNPs more dispersibility in aqueous phase and can conjugate with biomolecules.

In the case of coating with protein onto silica nanoparticles and silica coated MNPs, it can be done by modifying functional group on particle surface as another reactive group. The methods are described as below.

#### 1. Cyano group modification

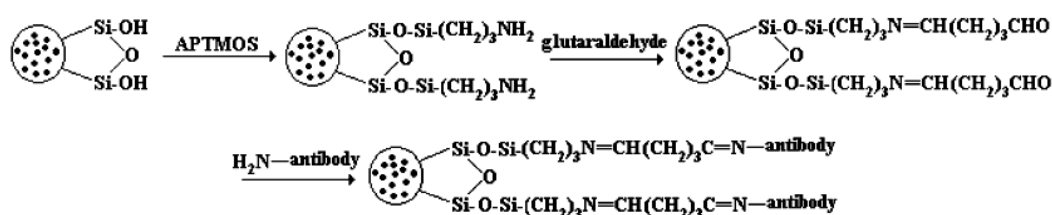
This method uses cyanogen bromide (CNBr) in acetonitrile as a reagent to react with hydroxyl group on particle surface. When the functional group is modified to be cyano group, this group will react with amino group of protein. That allow protein can immobilize onto nanoparticles. The reactions of this method are shown in Figure 2.1.



**Figure 2.1** Cyano group modification and coating of antibodies onto silica nanoparticles. **Source:** Santra *et al.* (2001)

## 2. Amino group modification

Using 3-aminopropyl trimethoxysilane (APTMS) or 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES), a chemical compound containing amino group, this make the nanoparticles have an amino group on their surface. These nanoparticles can be further conjugated with biomolecules especially proteins by using glutaraldehyde that act as interbridge between amino group of nanoparticles and amino group of proteins. The procedure of this method are shown in Figure 2.2.



**Figure 2.2** Amino group modification and coating of antibodies onto silica nanoparticles. **Source:** Yang *et al.* (2003)

## 3. Carboxyl group modification

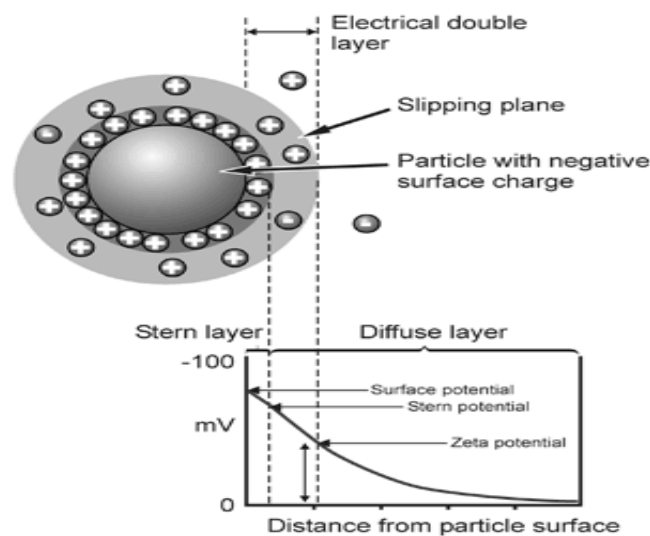
To modify carboxyl group, it must be first modified to be amino group with trimethoxysilyl propyldiethylenetriamine (DETA), succinic anhydride and *N,N*-dimethylformamide under nitrogen purge. After carboxyl group containing nanoparticles are obtained, they are further modified to be carbodiimide with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) and following activation by *N*-hydroxysuccinimide (NHS). By using EDC crosslinking, carboxyl group on the nanoparticles will link with amino group of proteins.

However, in the case of MNPs, there is another method that allow MNPs can be conjugated with biomolecules including proteins without coated with silica layer. This technique described by Wang *et al.* (2006) and Guo *et al.* (2009), that make the amino functionalized magnetic nanoparticles (amino-MNPs) have an free amino group on particle surface using ethylenediamine combined with polyol technique. By this method, amino group on the surface can be further modified or reacted with functional group of biomolecules via crosslinking agents.

## Zeta potential

The surface charge of a particle depends on its own nature but also on the surrounding medium. This surface charge affects the ion distribution in the interface region between the particle and the medium. In fact, different electrical layers form around each particle, these involving counter-ions present in the solution. The first

two layers, including the Stern layer, are the most stable. It is only at the outer surface of the second layer that these particles actually interact with one another. This is called the slipping plane. One is therefore interested mainly in the electrical potential measured at the slipping plane, called the zeta potential ( $\zeta$ ) (Figure 2.3), rather than the actual surface charge of the particles. It has the feature of varying with the surroundings and affects the physical, chemical and biological properties of the particles (Heurtault *et al.*, 2010).



**Figure 2.3** Schematic showing the distribution of ions around a charged particle.

**Source:** Malvern Instruments Ltd. (2011)

The magnitude of the zeta potential gives an indication of the potential stability of the colloidal system. A colloidal system is when one of the three states of matter: gas, liquid and solid, are finely dispersed in one of the others. For a solid dispersed in a liquid and a liquid dispersed in a liquid, i.e. an emulsion. If all the particles in suspension have a large negative or positive zeta potential then they will tend to repel each other and there is no tendency to flocculate. However, if the particles have low zeta potential values then there is no force to prevent the particles coming together and flocculating. The general dividing line between stable and unstable suspensions is taken as follows:

$-30 \leq \zeta \leq 30$	=	Unstable and trend to aggregate
$-40 \leq \zeta < -30$ or $30 < \zeta \leq 40$	=	Moderate stability
$-60 \leq \zeta < -40$ or $40 < \zeta \leq 60$	=	Good stability and dispersibility
$-\zeta < -60$ or $\zeta > 60$	=	Excellent stability and dispersibility

Note: Unit of zeta potential is mV.



Three main factors affect to zeta potential are described as follows.

### **1. pH**

Values of pH, conductivity, and concentration of a formulation component of the sample affect zetapotial. pH tend to be the most important factors that affects its zeta potential. A zeta potential value on its own without defining the solution conditions is a virtually meaningless number. If more alkali is added to this suspension then the particles tend to acquire more negative charge. If acid is added to this suspension then a point will be reached where the charge will be neutralised. Further addition of acid will cause a build up of positive charge. Therefore a zeta potential versus pH curve will be positive at low pH and lower or negative at high pH. There may be a point where the plot passes through zero zeta potential. This point is called the isoelectric point and is very important from a practical consideration. It is normally the point where the colloidal system is least stable.

Conductivity or the thickness of the double layer depends upon the concentration of ions in solution and can be calculated from the ionic strength of the medium. The higher the ionic strength, the more compressed the double layer becomes. The valency of the ions will also influence double layer thickness. A trivalent ion such as  $\text{Al}^{3+}$  will compress the double layer to a greater extent in comparison with a monovalent ion such as  $\text{Na}^+$ . Inorganic ions can interact with charged surfaces in one of two distinct ways (i) non-specific ion adsorption where they have no effect on the isoelectric point. (ii) specific ion adsorption, which will lead to a change in the value of the isoelectric point. The specific adsorption of ions onto a particle surface, even at low concentrations, can have a dramatic effect on the zeta potential of the particle dispersion. In some cases, specific ion adsorption can lead to charge reversal of the surface.

The effect of the concentration of a formulation component on the zeta potential can give information to assist in formulating a product to give maximum stability. The influence of known contaminants on the zeta potential of a sample can be a powerful tool in formulating the product to resist flocculation.

### **Antigen**

An antigen is any substance that can be recognized by the immune system. Major classes of antigens include proteins, carbohydrates, lipids and nucleic acids. Antigens of bacteria especially in Gram negative bacteria are classified in three main groups comprise of somatic (O antigens), capsule (K antigens) and flagella (H antigens).

## Antibody

Antibodies are members of a family of molecules, the immunoglobulins, that constitute the humoral branch of the immune system and form approximately 20% of the plasma proteins in humans. Different populations of immunoglobulins are found on the surface of lymphocytes, in exocrine secretions and in extravascular fluids. Antibodies are host proteins produced in response to foreign molecules or other agents in the body. This response is a key mechanism used by a host organism to protect itself against the action of foreign molecules or organisms. B-lymphocytes carrying specific receptors recognize and bind the antigenic determinants of the antigen and this stimulates a process of division and differentiation, transforming the B-lymphocytes into plasma cells. It is these lymphoid or plasma cells that predominantly synthesize antibodies.

An immunoglobulin is a tetrameric polypeptide structure with distinct biological activity attributed to each end of the molecule. All immunoglobulins are composed of two identical heavy chain and two identical light polypeptides. Both heavy chain and light chain molecules have variable and constant domains and interact via intra- and inter-disulfide linkages. The variable region, termed  $F(ab')_2$  (fragment, antibody binding) confers antigen recognition. The constant region, termed  $F_c$  (fragment, crystalline), interacts with cell surface receptors. The heavy chain contains a hinge domain that confers flexibility to allow optimal binding to antigen (Actor, 2007).

Immunoglobulins are divided into five major classes according to their H chain components: IgG ( $\gamma$ ), IgA ( $\alpha$ ), IgM ( $\mu$ ), IgD ( $\delta$ ) and IgE ( $\epsilon$ ) as shown in Table 1. There are two types of light chain, k and l. Individual molecules may contain k or l chains but never both. In man, the ratio of immunoglobulins containing k or l light chains is about 60:40, whereas in mouse the ratio is 95:5.

**Table 2.1** Immunoglobulin types (isotypes)

Class	Members	Functional description
IgG	IgG1-IgG4	Predominant antibody found in blood and lymph. Predominant antibody involved in material immunity.
IgA	IgA1 (serum), IgA2 (secretory)	Predominant antibody found in saliva, tears, sweat, milk, intestinal secretions, and colostrum
IgM	Macroglobulin	First antibody type produced during a clonal response. Bound to lymphocytes and in serum

IgD	Surface bound	Bound to the surface of lymphocytes, very low concentrations in serum
IgE	Parasite protection	Has a role in the protection from parasites. Low levels in serum

**Source:** Brownlee (2007)

### Intermolecular Forces

The selection of immunoglobulins by antigen is governed firstly by the spatial and temporal properties of both. Assuming that such properties of each coincide, selection in a mixed solution of antigen and antibodies is governed by the physical and chemical properties of their interaction, the so-called intermolecular forces. The molecules are mixed and come into contact with each. If the combination of attractive and repulsive forces (affinity) between the antigenic determinant and the antibodies combining site are more attractive than repulsive and strong enough, the antigen and antibody form a chemical bond. This bond is like a key and lock relationship where the antigen is the key, and the antibody is the lock. The amount of energy required to separate the bond is referred to as the bond energy (Table 2).

**Table 2.2** Chemical and physical forces involved in antigen-antibody bonding

Force	Description
Hydrogen bonds	Bonding with hydrogen atoms
Ionic	Oppositely charged groups
Van der Waals	Electron clouds interact
Apolar (hydrophobic)	Seeking minimum energy state in the absence of water
Steric factor/steric repulsive	Basis of discrimination, non-complementary electron cloud resulting in repulsive force

**Source:** Brownlee (2007)

### Fluorescence

Fluorescence refers to the light (luminescence) emitted by molecules during the period in which they are excited by photon. This emitted light is from the singlet state and ceases rather abruptly when the exciting energy source is removed. The afterglow then is less than  $10^{-9}$  sec, and it is independent of temperature. This is the contrary of phosphorescence longer than  $10^{-6}$  sec and is temperature dependent.

Molecular emission (fluorescence and phosphorescence) is a particularly important analytical technique because of its extreme sensitivity and excellent

specificity. Spectrofluorometric methods can detect concentrations of substances as low as one part in  $10^{10}$ , a sensitivity 1000 times greater than that of most spectrophotometric methods. The main reason for this increased sensitivity is that in fluorescence the emitted radiation is measured directly and can be increased or decreased by changing the intensity of the exciting radiant energy. An increase in signal over a zero background signal is measured in fluorometric methods. In spectrophotometry the analogous quantity, adsorbed radiation, is measured indirectly as the difference between the incident and the transmitted beams: the small decrease in the intensity of a very large signal suffers a correspondingly large loss in sensitivity.

The specificity of fluorescence is the result of two main factors: (a) there are fewer fluorescent compounds than absorbing ones because all fluorescent compounds must necessarily absorb radiation, but not all compounds that absorb radiation emit; (b) two wavelengths are used in fluorometry, but only one in spectrophotometry. Two compounds that absorb radiation at the same wavelength will probably not emit at the same wavelength. The difference between the excitation and emission peaks ranges from 10 to 280 nm.

Materials that possess native fluorescence, those that can be converted to fluorescent compounds (fluorophores), and those that extinguish the fluorescence of other compounds can all be determined quantitatively by fluorometry.

The main disadvantage of fluorescence as an analytical tool is its serious dependence on environmental factors such as temperature, pH, ionic strength, viscosity, etc., which thus have to be carefully defined and controlled to obtain reproducible measurements.

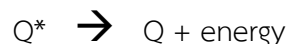
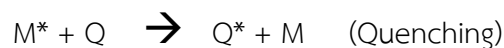
#### 1. Photochemical decomposition

Ultraviolet bright light used for excitation may cause photochemical changes or destruction of fluorescent compound, giving a gradual decrease in the intensity reading. In a practical sense one can take three measures to avoid photochemical decomposition: (a) always using the longest-wavelength radiation; (b) measuring the fluorescence of the sample immediately after excitation, do not allow the exciting radiation to strike the sample for long periods; (c) protecting photochemically unstable standard solutions, such as quinine sulfate, from sunlight and ultraviolet laboratory lights by storing in a black bottle.

#### 2. Quenching

Quenching, the reduction of fluorescence by a competing deactivating process resulting from a specific interaction between a fluorophore and another substance

present in the system, is also frequently a recurring problem. The general mechanism for the quenching process can be denoted as follows:



Four common causes of quenching are observed in luminescence processes: oxygen, impurity, temperature and concentration.

## Materials and Methods

### I. Preparation of purified IgGs

Purified IgGs against *E. coli* O157:H7 was prepared from concentrated *E. coli* O157 rabbit polyclonal antiserum using affinity chromatography method.

#### 1. Slide agglutination test of antiserum

*E. coli* O157 antiserum was examined the quality before purification step by slide agglutination test. The test was prepared by making two adjacent suspensions of the test organism in drops of saline on a slide. Then, a drop of antiserum was added to one suspension only and mixed. Examine for agglutination of the suspension. Positive result exhibited agglutination of the suspension while the turbid suspension indicated negative reaction.

#### 2. Sample preparation before purification

*E. coli* O157 antiserum was diluted with 0.85% NaCl (ratio 1:1). Tris-HCl (pH 8.0) was added to maintain pH and then the antiserum solution was precipitated with saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The sample was centrifuged at 8000xg, 4 °C for 30 min to collect the precipitate of mixed protein. The precipitate was dissolved in 1x PBS, pH 7.2 to remove salt or other small molecules, then the sample was further desalted using centrifugal ultrafiltration device (Vivaspin 20; 30,000 MWCO) for 3 wash cycles. The product was filtered through a 0.20 µm filter before purification step.

#### 3. Purification of IgGs

Mixed protein solution was purified using protein A-sepharose affinity column (HiTrap Protein A HP, 5 ml). First, a column was equilibrated with 5 column volumes of binding buffer (20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0). Then, the antiserum was applied and washed with 5-10 column volumes of binding buffer to remove impurities and unbound material. The fractions were collected 1 ml per fraction and measured an amount of protein that was determined by UV absorbance at 280 nm. After that, the column was eluted with 5 column volumes of elution buffer (0.1 M

citric acid, pH 3.0). The fractions which had IgGs were neutralized with tris-HCl (pH 9.0) and combined together. Then, IgGs solution was desalted using Vivaspin 20. The purified IgGs was further determined for protein concentration with Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) and purity with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

### **Preparation of bacterial culture**

In this study, *E. coli* O157:H7 was used as a target organism for the detection with FDS-NPs and MNPs. While *E. coli* ATCC 8739, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *S. Typhimurium* DMST 16809, *B. cereus* ATCC 11778 and *S. aureus* ATCC 25923 were used as challenge organisms to study the specificity of the nanoparticles.

#### **1. Bacterial culture for detection with FDS-NPs**

All test bacteria were grown in TSB at 37 °C for 24 h before experiment. The bacterial inoculum was spread on PCA plate using sterile swab. Then, sterile glass slide was lied on surface of that agar medium and incubated at 37 °C for 8 h to allow the bacteria grew and attached on the glass slide. After incubation, the slide was gently washed to remove unbound cells before detection with FDS-NPs.

#### **2. Bacterial culture for detection with MNPs**

All test bacteria were grown in TSB at 37 °C for 24 h before experiment. Serial 10-fold dilution in PBS was used for preparation of cell suspension. Amount of bacteria which was captured by MNPs was enumerated by spreading on XLD plate for *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 8739, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *S. Typhimurium* DMST 16809, BC plate for *B. cereus* ATCC 11778 and BP plate for *S. aureus* ATCC 25923.

### **Synthesis of magnetic nanoparticles**

#### **1. One step preparation of amino-MNPs**

Amino-MNPs were prepared by polyol technique modified from Guo *et al.* (2009). The MNPs were modified with amino group from ethylenediamine. Amounts of NaOH and reaction time at 121 °C were varied to study their effects on morphology and characteristics of the MNPs. For the synthesis, 2 g of FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O was added into 40 ml ethylene glycol and mixed until the solution was cleared yellow. Then, 6 g of CH<sub>3</sub>COONa, NaOH and 20 ml of ethylenediamine were added and the solution was stirred for 30 min. The mixed solution was further heated in the autoclave (Sanyo Model MLS-3020, Japan) at 121 °C for 2 h per cycle for 1 to 4 cycles. After the reaction was completed, amino-MNPs were isolated by magnet and

washed with distilled water and 95% ethanol several times to remove the solvent. The amino-MNPs were dried, ground with glass rod and stored in a glass bottle.

## 2. Coating of IgGs onto FDS-NPs

The suspension of amino functionalized FDS-NPs in 1x PBS (2 mg/ml, pH 7.4) with 2.5% glutaraldehyde was stirred at room temperature for 2 h. The particles were separated by centrifugation and washed with PBS to removed free glutaraldehyde. After that, they were re-dispersed into 1x PBS. The glutaraldehyde treated FDS-NPs were then incubated with purified IgGs against *E. coli* O157:H7 by adjusting the final concentration of FDS-NPs and IgGs to 2 and 0.1 mg/ml respectively. The suspension was divided to two portions. One was incubated at 4 °C and the other at 37 °C to study the effects of temperature. The amount of protein on the particles at 3, 6, 12 and 24 h of incubation was determined by Lowry method (Lowry *et al.*, 1951). Non-covalent binding of IgGs on particles was also studied using unmodified FDS-NPs to incubate with IgG solution at the same conditions as described above.

## 3. Zeta potential measurement

Effect of ionic strength on aggregations of FDS-NPs in terms of zeta potential was investigated. Uncoated and IgG coated FDS-NPs were dispersed in 0.1x PBS (0.2 mg/ml), pH 7.4 (a standard solution) and that containing different NaCl concentrations. FDS-NP suspension was analyzed for zeta potential with zeta meter. The ionic strength ( $I$ ) of a solution was calculated by the equation (1):

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (1)$$

where  $c_i$  is a molar concentration of  $i^{\text{th}}$  ion present in the solution and  $z_i$  is its charge.

Stability and dispersibility of particles at each zeta potential (in the unit of mV) can be interpreted as follows. The  $\zeta$  values of -30 to +30 are considered unstable and tend to aggregate, -40 to -30 and +40 to +30 are moderately stable, -60 to -40 and +60 to +40 are good stability and the values beyond -60 or +60 indicated excellent stability (Malvern Instrument, 2011).

## 4. Testing with bacteria

FDS-NPs were tested with targets on the effects of incubation time and particle concentration and with non-target bacteria in the term of specificity. All samples were stained with DAPI (a fluorescent dye which binds to DNA of organisms and exhibits blue

luminescence when is excited with UV light) before observation to easily distinguish between particle bound and unbound cells. The samples were observed under epifluorescent microscope with UV and blue light excitation. Each treatment of all experiments was performed in triplicate.

#### 4.1 Effect of incubation time

Glass slide with *E. coli* O157:H7 was flooded with 0.5 ml of IgG coated FDS-NPs (0.2 mg/ml) and incubated at room temperature at various reaction times (15, 30, 60, 120 and 180 min). After the incubation, the slide was washed to remove unbound particles and then was stained with DAPI solution. The slide was observed under epifluorescence microscope. Capture efficiency of FDS-NPs at each incubation time was assessed as the percentage of bacterial cells attached by particles to the total bacterial cells in the slide in the same field for 3-5 fields. Capture efficiency was calculated by the equation (2):

$$\text{Capture efficiency (\%)} = (N_a / N_0) \times 100 \quad (2)$$

where  $N_a$  is number of bright orange dots (FDS-NPs bound cells) and  $N_0$  is the sum of bright orange and blue dots (total cells) which were found in the microscopic field.

#### 4.2 Effect of FDS-NP concentration

IgG coated FDS-NPs were dispersed and diluted to 0.2, 0.5 and 1.0 mg/ml in 1x PBS (pH 7.4). Then, glass slide with *E. coli* O157:H7 was flooded with 0.5 ml of particle suspension and incubated for 60 min at room temperature. Then, it was washed with distilled water to remove unbound particles. The slide was stained with DAPI solution and observed under epifluorescence microscope. Capture efficiency of FDS-NPs at each concentration was calculated by the equation (2). Non specific binding of FDS-NPs was also observed using uncoated FDS-NPs incubated with *E. coli* O157:H7.

#### 4.3 Specificity

The specificity was tested using the same glass slide method but using non-*E. coli* O157:H7 bacteria with IgG coated FDS-NPs. The attachment was considered non specific binding of the FDS-NPs.



## Results

### 1. Morphology and formation of amino-MNPs

Amino-MNPs were prepared by polyol technique using  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  as a precursor of magnetite and ethylenediamine as an amino group source. A suitable condition for synthesis was studied by varying amount of NaOH and reaction time. The synthesis of amino-MNPs was conducted in autoclave for 2 h/cycle, for 1 to 4 cycles. The time, temperature and pressure during the reaction are shown in Figure 2.4. Effects of NaOH concentrations (3 levels of 1.25, 2.50 and 3.75% w/v denoted A, B, and C) in combination with reaction times (2 h/cycle for 1-4 cycles denoted 1, 2, 3 and 4) on morphology and the size determined by TEM.

After preparation, reddish-brown precipitate was found in samples A-1, A-2, B-2 and C-1 (Figure 2.5) and these samples were not attracted by magnetic force indicating that magnetic particles were not properly produced. Brown precipitate was found in samples A-3, dark brown precipitate was found in samples A-4, B-2, C-2, B-3, B-4, C-3 and C-4. these samples could be attracted by magnetic force indicating that magnetic particles were already produced. Because samples A-1, A-2, B-2 and C-1 products were without the desired magnetic properties, thus, they were not studied further under TEM.

The combination of NaOH amount and cycle time gave nanoparticles with different size and structure. TEM images of MNPs from various synthesis conditions were shown in Figure 2.6. Treatments A-3 and B-2 showed irregular shape of particles and wide size distribution ( $47 \pm 20$  and  $45 \pm 21$  nm) (Table 2.3 and Figure 2.5). Treatments A-4 and C-2 showed quite uniform size of particles but the shape of some particles stilled uncertain ( $33 \pm 9$  and  $29 \pm 11$  nm). Treatments B-3, B-4, C-3 and C-4 showed high quality structure with cubic shape, low size distribution ( $43 \pm 9$ ,  $41 \pm 12$ ,  $43 \pm 17$  and  $39 \pm 12$  nm, respectively). In overall characteristics, MNPs from sample B-3 were selected for further characterization because of their shape and size and short reaction time (3 cycles).

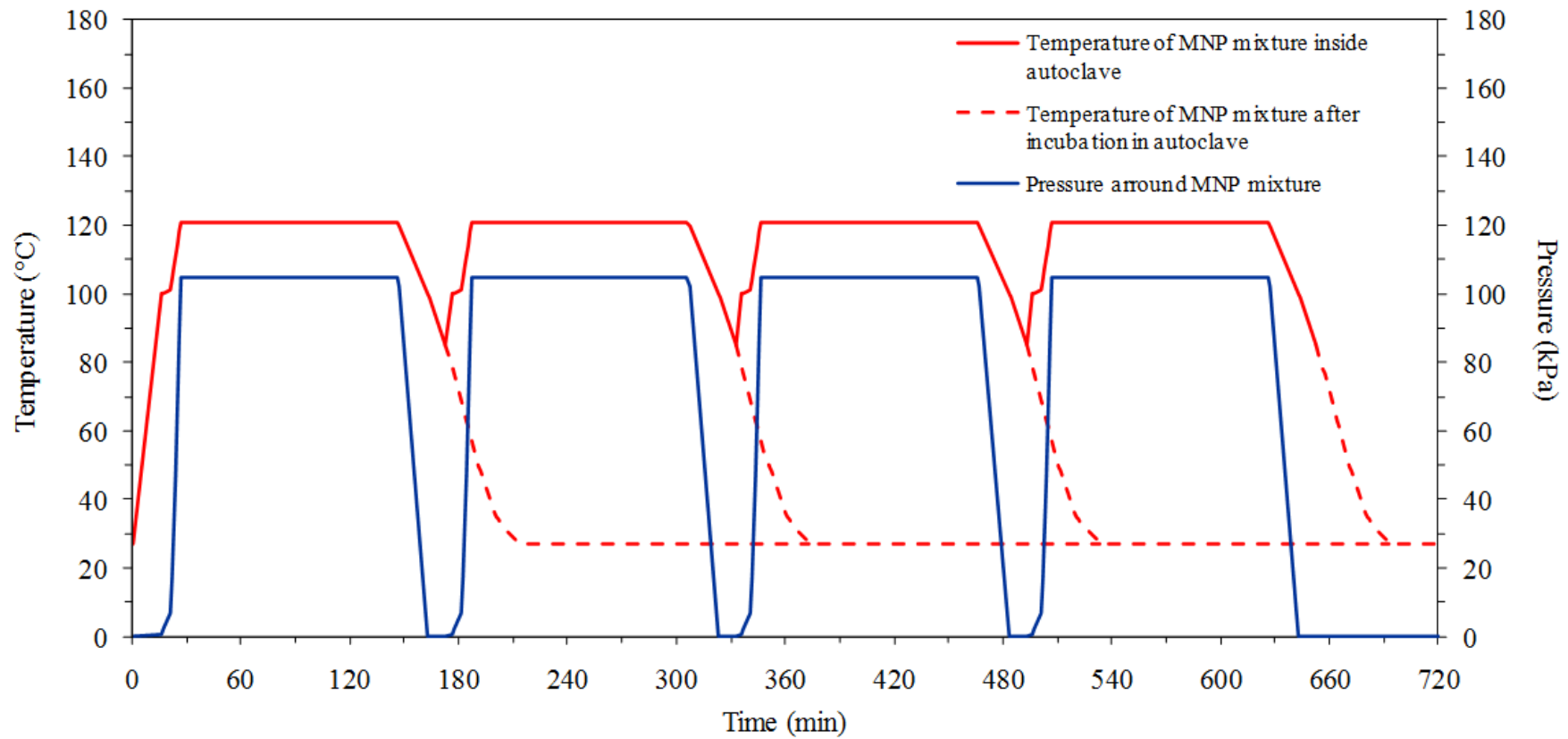


Figure 2.4 Time, temperature and pressure of the reaction cycles during the amino-MNP synthesis

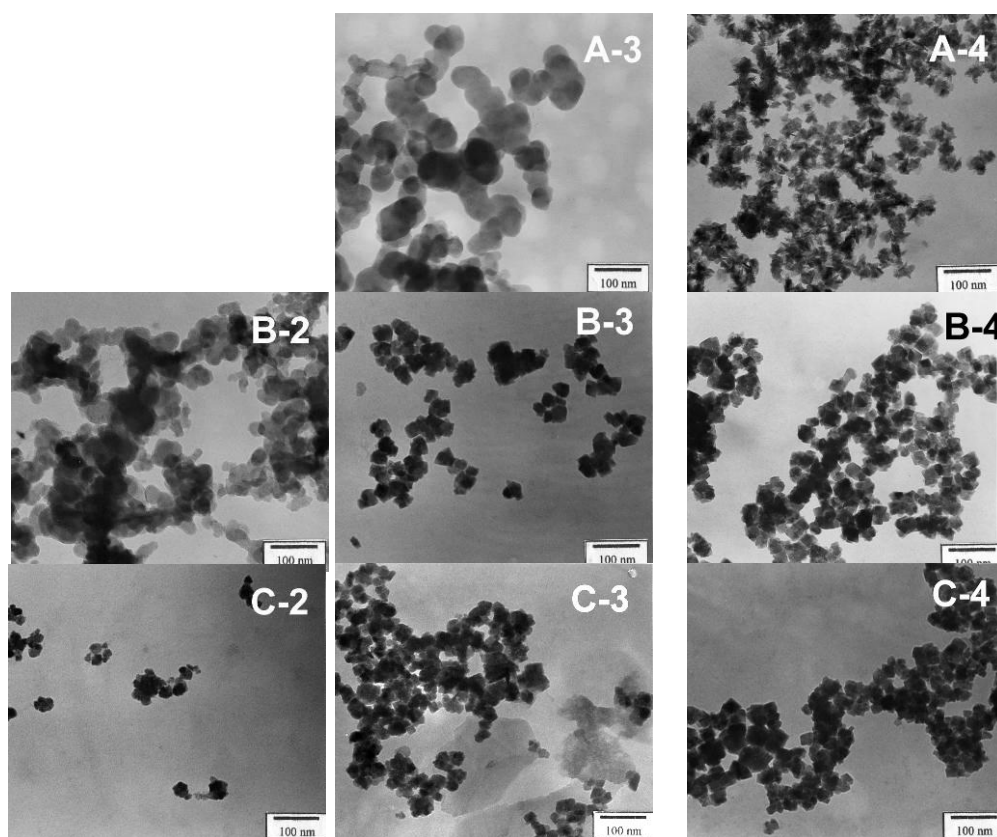


**Figure 2.5** Amino-MNP powder at various amounts of NaOH and 2 h reaction cycles. Letters denote amount of NaOH at A = 1.25%, B = 2.50% and C = 3.75% while numbers indicate reaction cycle

The formation rates of amino-MNPs depend mainly on amount of NaOH in the reaction mixture. At 1.25% NaOH, the particles with magnetic properties were formed (responded to magnet) at 3 reaction cycles, while at the conditions of 2.50 and 3.75% NaOH, the formation could be detected within 2 reaction cycles. Moreover, the morphology from TEM image at the same reaction times showed that well-defined particles could be obtained quickly from the conditions with higher amounts of NaOH.

The reaction time was also studied to understand the formation mechanism of amino-MNPs. At 1 cycle of reaction of all treatments and 2 cycles of treatment A, brown precipitate was formed in the reactors but showed no reaction with magnet. It was indicative that magnetic particles had not formed. At 2 reaction cycles of treatments B and C and 3 cycles of treatment A, the precipitates turned to black color and could be attracted by permanent magnet indicating magnetic particles had been formed. The TEM images at short reaction time showed that the particles were quite round and irregular shape, poly-dispersion and wider size distribution. With 3 reaction cycles of treatments B and C, 4 cycles for treatments A, well-defined and narrow size distributions were obtained (Figures 2.6 and 2.7; treatments A-4, B-3 and

C-3). When the reaction time extended to 4 cycles in treatments B and C, the morphology and size of particles did not change compared with that of the 3 cycles reaction time.



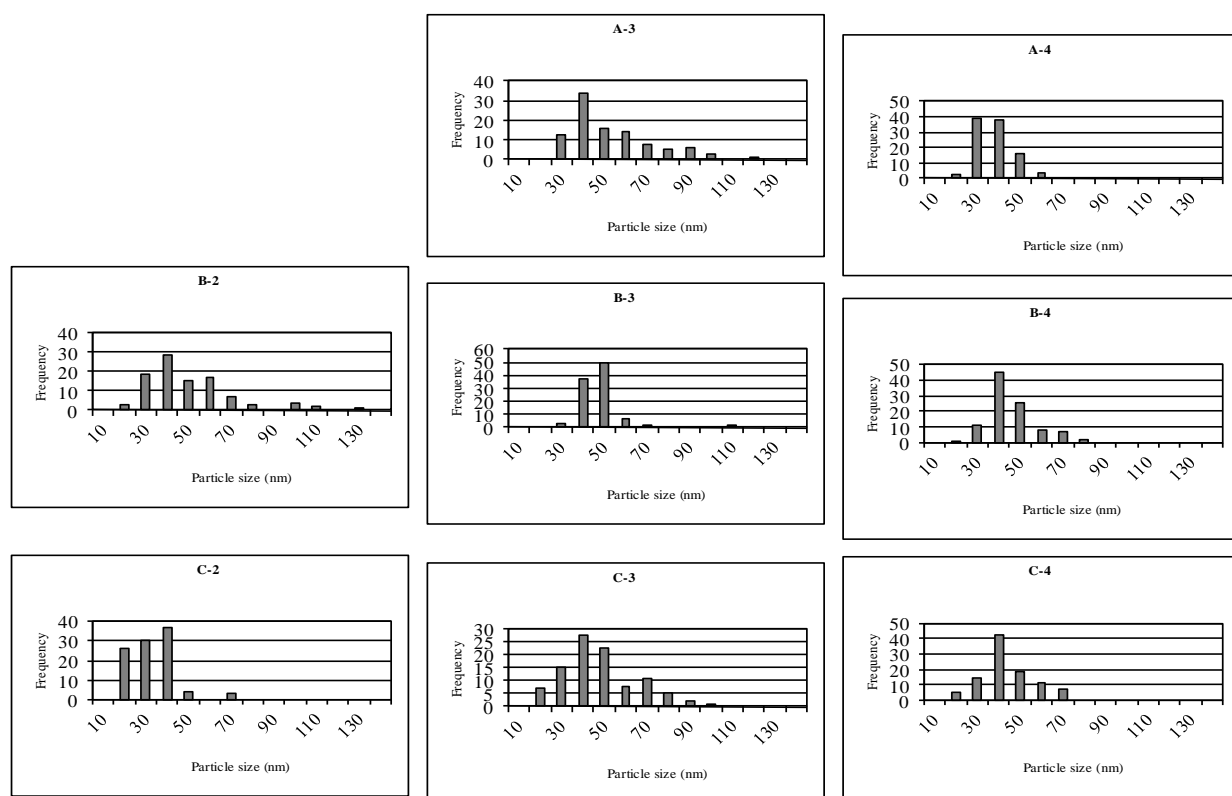
**Figure 2.6** TEM images at 150000x showing the amino-MNPs prepared at various amounts of NaOH and 2 h reaction cycles. Letters denote amount of NaOH at A = 1.25%, B = 2.50% and C = 3.75% while numbers indicate reaction cycle. The bar in each TEM image represents 100 nm.

**Table 2.3** Parameters and size of amino-MNPs at various conditions

Sample	Parameter		Size (nm): d = diameter	Average size (nm)
	NaOH (% w/v)	Cycle		
A-1	1.25	1	nd	nd
A-2	1.25	2	nd	nd
A-3	1.25	3	21<d<113	47 ± 20
A-4	1.25	4	15<d<53	33 ± 9
B-1	2.50	1	nd	nd
B-2	2.50	2	15<d<123	45 ± 21
B-3	2.50	3	23<d<107	43 ± 9
B-4	2.50	4	19<d<76	41 ± 12
C-1	3.75	1	nd	nd
C-2	3.75	2	15<d<69	29 ± 11
C-3	3.75	3	14<d<92	43 ± 17
C-4	3.75	4	15<d<69	39 ± 12

nd = not determined

Guo *et al.* (2009) also reported that the size of MNPs could be controlled by adjusting amount of NaOH. The larger amount of NaOH resulted in smaller and polydispersed particles because of a rapid particle formation. NaOH enhanced the transformation of EG to acetaldehyde (Joseyphus *et al.*, 2010), a strong reducing agent. The alkali accelerated the reduction of iron ion to form magnetite. However, in this study, the size of MNPs at different NaOH did not differ significantly but it could be concluded that amount of NaOH affected to the rates of magnetic particle formation.



**Figure 2.7** Size distribution of amino-MNPs which were synthesized at different conditions

Generally, most polyol methods for producing magnetite particles (Liu *et al.*, 2006; Cai and Wan, 2007; Ding *et al.*, 2010) were conducted at very high temperature (>200 °C) and under inert gas to prevent oxidation of magnetite by O<sub>2</sub> in the environment. However, the MNPs in this work were produced using autoclave as a reactor, operating at temperature of 121 °C, high pressure (105 kPa) and without any inert gas. The results showed that the MNPs could be produced with good size and structure. This indicated that temperature lower than 200 °C could be used to produce MNPs with less energy consumption. Although no inert gas was used in the synthesis, other iron oxide species except from magnetite were not detected. The autoclave required venting or the exclusion of air (oxygen) from the reaction to produce the temperature of about 121 °C. These phenomena prevented the particles from being oxidized by oxygen. However, the effect of high pressure to the MNP synthesis was not cleared. More investigations were required.

## 2. Elemental components and structure

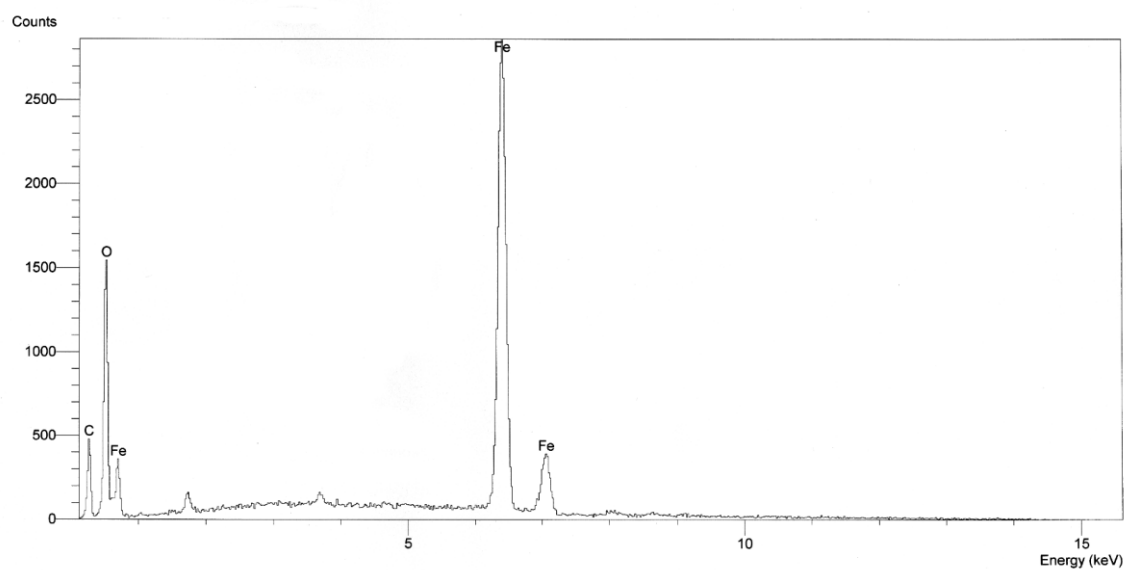
Elemental components of MNP product (treatment B-3) were characterized by SEM-EDS. The results showed that the major elements of amino-MNPs were Fe (42.87% atomic) and O (55.45% atomic) as shown in Table 2.4 and Figure 2.8. It confirmed that the MNP product was magnetite because the atomic ratio of Fe:O

was about 3:3.88 which was similar to the theoretical atomic ratio of magnetite (3:4). Carbon was also detected at lower than 1.68% atomic implying the existence of ethylenediamine molecules on particle surface.

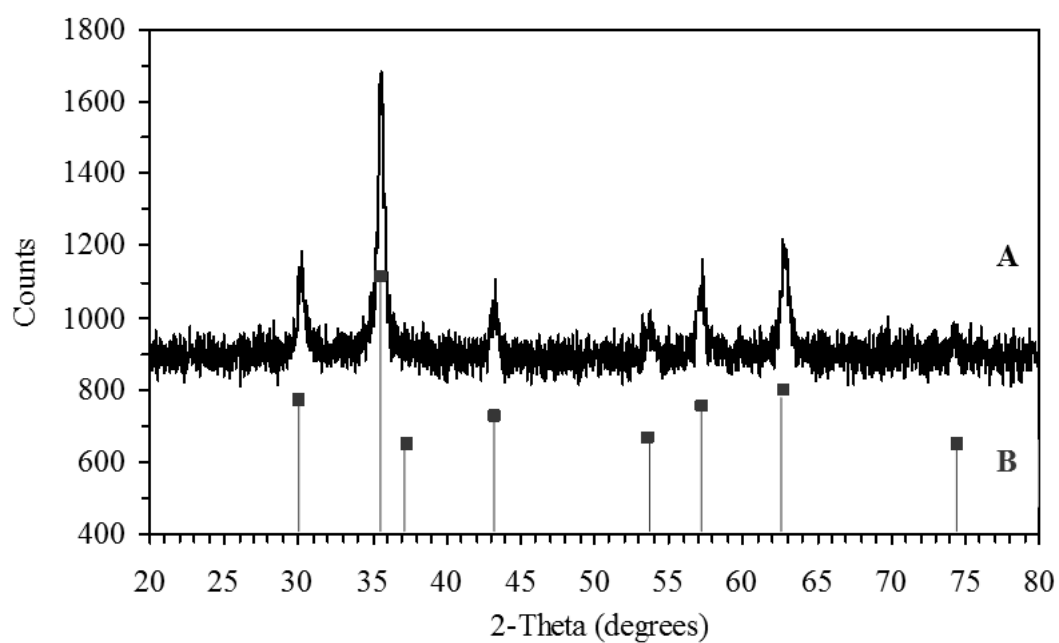
XRD was used to characterize the structure and the XRD pattern was shown in Figure 36. The peaks of amino-MNPs matched well with the XRD pattern of standard magnetite (Figures 2.9 and 2.10) from the database (ICSD collection code: 084611) that can be indexed to the face-centered cubic crystalline structure with cell constant  $a = 8.375 \text{ \AA}$ . The results conformed the findings from the EDS analysis and morphology of particle from a TEM image. No impurity phase was detected in the MNP product.

**Table 2.4** Elemental components of amino-MNPs

Element	Weight %	Atomic %
O	26.61	55.45
Fe	71.81	42.87
C and others	1.58	1.68
Total	100.00	100.00



**Figure 2.9** EDS spectrum showed elemental components of amino-MNPs.



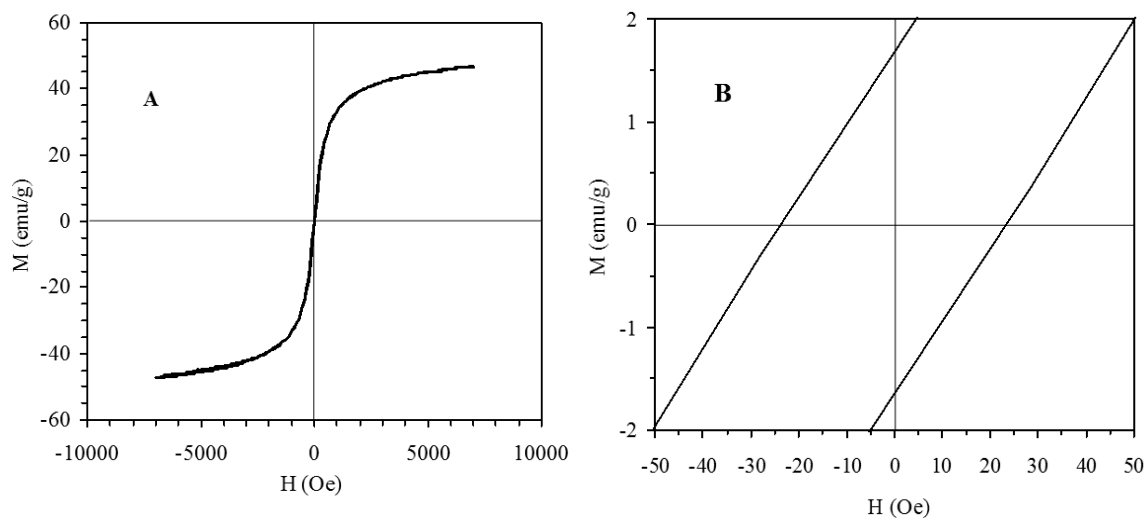
**Figure 2.10** XRD pattern of (A) amino-MNPs and (B) standard XRD pattern of magnetite



### 3. Magnetic properties

Magnetization curves of amino-MNPs at room temperature are shown in Figure 2.11. The curves indicated that the MNPs were ferromagnetism but nearly complete superparamagnetism with a saturation magnetization ( $M_s$ ) of about 48 emu/g, remanence ( $M_r$ ) of 1.7 emu/g and coercivity ( $H_c$ ) of 23.5 Oe. Moreover, amino-MNPs were well dispersed in water and also can be separated from the solution by attraction of a magnet (Figure 38).

According to Liu *et al.* (2006), magnetite particles would exhibit complete superparamagnetic properties when their size below 25 nm which is a critical size of magnetite. At this size, each particle has only one magnetic domain, and when a magnetization curve is plotted, the curve would show intersection at the zero point and has no remanence and coercivity. Although, the amino-MNPs produced in this work were not superparamagnetism because their size (43 nm) was larger than critical size and their ferromagnetic properties were very low, they were sufficient to be used in any biological applications because they could be well dispersed in aqueous solution and separated by magnet as well.



**Figure 2.11** Magnetization curves of (A) amino-MNPs and (B) hysteresis loop of magnetization curve



**Figure 2.12** Photographs of amino-MNPs dispersed in water and after were separated from the solution by attraction to a magnet

#### 4. Functional groups and chemical bonds of MNPs

The MNPs were modified to attach amino groups onto their surface ready for the conjugation of any biomolecules. The modified MNPs were analyzed with FT-IR spectroscopy in order to examine the existence of amino group on particle surface. Figure 2.13 shows the strong IR band of MNPs at 578.97 and 623.11  $\text{cm}^{-1}$  referring to the Fe-O bond split form the band at 570  $\text{cm}^{-1}$  of bulk magnetite (Yamaura *et al.*, 2004). This was probably due to the effect of a very small size of MNPs. The band at 1622.97 and 3426.89  $\text{cm}^{-1}$  refers to the  $\text{NH}_2$  bending of free  $\text{NH}_2$  group and N-H stretching vibration, respectively. The bands were the same as that reported by White and Tripp (2000) and Yamaura *et al.* (2004).

The band in the range of 3600 to 3000  $\text{cm}^{-1}$  also refers to O-H asymmetric and symmetric stretching vibrations and the band in the range of 1630 to 1600  $\text{cm}^{-1}$  refers to O-H bending vibration (Asouhidou *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009) which both overlapped with the absorption peak of  $-\text{NH}_2$  asymmetric and symmetric stretching vibrations and N-H bending vibration. These make it difficult to confirm the existence of amino group. However, in the subsequence experiment of IgG coating on particle surface, it was found that IgGs could immobilize on particles via glutaraldehyde crosslinking which must attach amino group on particle surface. This could confirm the existence of amino group on MNPs. Amino group on particle surface belongs to the ethylenediamine molecules added as starting chemical in the MNP synthesis. It was believed that the amino groups from this chemical absorbed on the MNP surface.

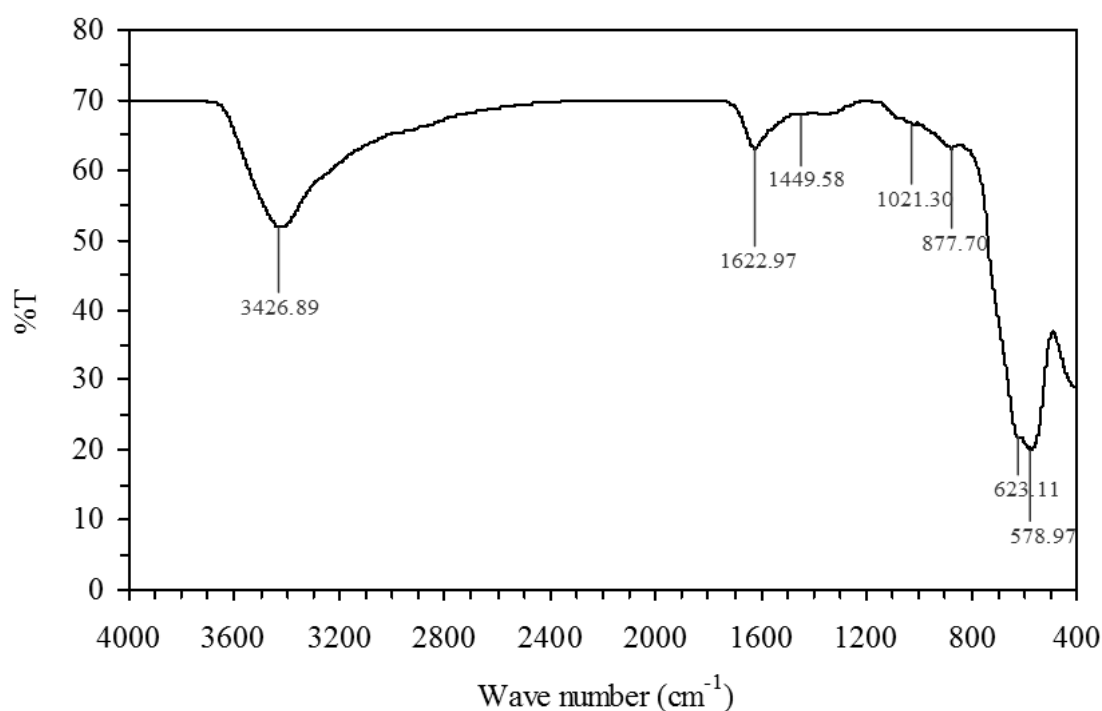


Figure 2.13 FT-IR spectrum of amino-MNPs

## 5. Coating of IgGs onto MNPs

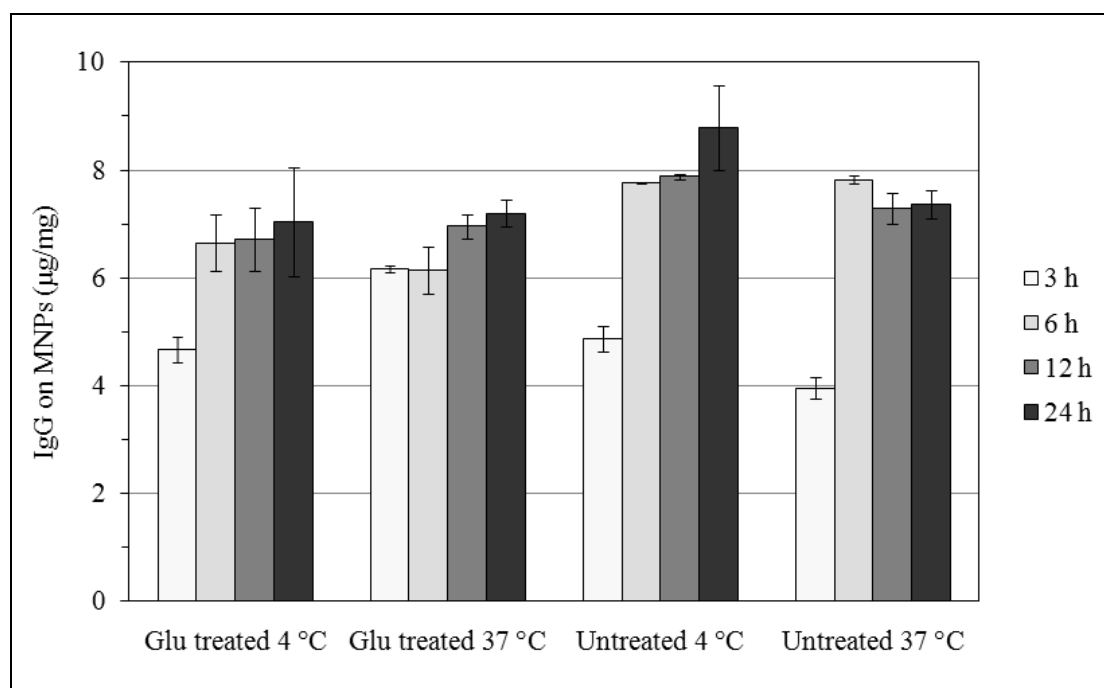
Effects of temperature and time to IgG conjugation were studied. An appropriate condition was determined from amount of immobilized protein on MNPs. The high concentrated IgG solution (100 µg/ml) was incubated with glutaraldehyde treated MNPs to obtain a maximum IgG loading capacity of MNPs. Protein assay by Lowry method was used for determining the total protein on particles.

The results showed average amount of immobilized IgGs on MNPs at 4 °C at 3, 6, 12 and 24 h were 4.67, 6.65, 6.71 and 7.05 µg/mg, respectively, whereas at 37 °C, immobilized IgGs on MNPs at 3, 6, 12 and 24 h were 6.17, 6.15, 6.96 and 7.20 µg/mg, respectively (Figure 2.14). From these results, incubation time had an effect on the amount of IgGs on MNPs. Longer incubation will give higher immobilized IgGs. Effect of temperature was also observed. Higher rate of immobilization was obtained from incubation at 37 °C suggested that high temperature enhanced the rate of chemical reaction between IgGs and particle surface. However, when the incubation time had passed for 6 h, the amounts of IgGs of both temperatures were not different.

Since the immobilization of protein onto particles can occur via both physical and chemical approaches, non-covalent binding was also observed using non-glutaraldehyde treated MNPs. Surprisingly, the results showed that very higher amount of IgGs on particles was detected in all conditions that higher than IgGs on glutaraldehyde treated MNPs. Amount of IgGs after incubation for 3, 6, 12 and 24 h were 4.88, 7.76, 7.88 and 8.78 µg/mg

for incubation at 4 °C and were 3.95, 7.83, 7.29 and 7.35 µg/mg for incubation at 37 °C (Figure 2.14). These results indicated that non-covalent binding occurred in this procedure. Because non-covalent binding occurred at 4 °C more than 37 °C. Thus, 37 °C and 24 h was used as the temperature and incubation time in the subsequent experiments to obtain maximum of IgGs on particle surface.

Non-covalent binding can occur by many ways such as electrostatic force, van der Waals interaction or hydrogen bond. According to Aubin-Tam and Hamad-Schifferli (2008), they described about non-covalent binding between nanoparticles and protein that carboxyl groups of protein have a strong affinity for the metal ions in the surface of nanoparticles including MNPs. Moreover, a change in structure and decrease in activity were observed for the protein when it was conjugated with Fe-based magnetic oxide NPs.

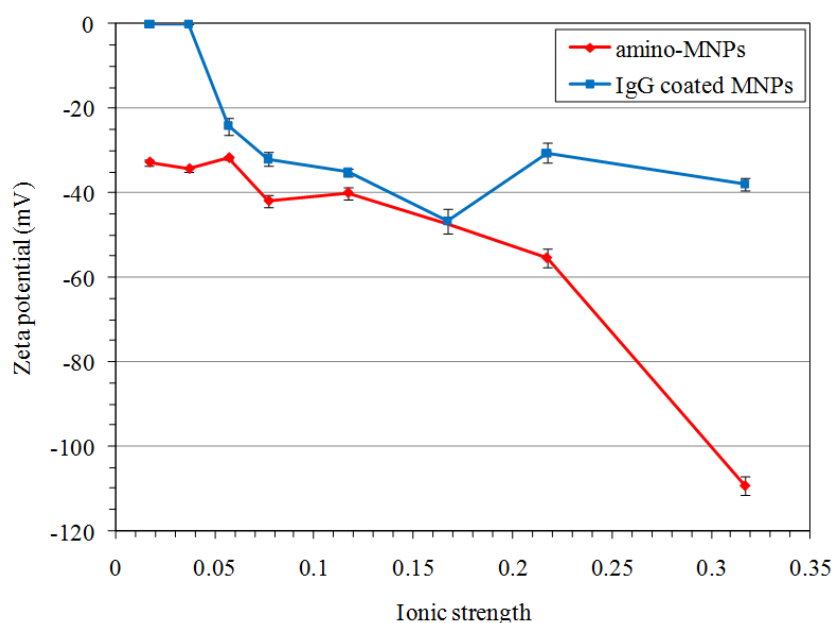


**Figure 2.14** Amount of IgGs on MNPs after incubation at different conditions. “Glu treated” refers to Glutaraldehyde treated MNPs and “Untreated” refers of MNPs without any treatments

In this study, MNPs was made to have amino groups on their surface. This facilitate the bioconjugation of the MNPs. Thus, glutaraldehyde, which is well known as a crosslinking reagent between two amino groups of protein, was used for MNPs-IgGs conjugation. Two aldehyde groups on both sides of glutaraldehyde molecule are a reactive group that can react with amino group via covalent bonding. That allowed IgGs to be immobilized on MNPs. From the experiment, this technique is easy to manipulate, not require many reagents, short time consumption with high efficiency.

## 6. Zeta potential

Zeta potential was used to demonstrate aggregation of MNPs. From the results, zeta potential of uncoated amino-MNPs at all ionic strength were below -30 mV (Figure 2.15), indicating that the amino-MNPs were well dispersed and were more stable when ionic strength was high. However, after MNPs were coated with IgGs, the zeta potential at each ionic strength was higher. The changes were stemmed from an effect of IgG coated on particle surface. At low ionic strength, zeta potential of IgG coated MNPs was more than -30 mV. This means the MNPs will aggregate in these conditions. At ionic strength of 0.167, zeta potential was -46.7 mV which was in the range of good dispersion and stability. This point was the most appropriate condition because the zeta potential was the lowest. Moreover, this ion concentration is close to the physiological ionic strength that is a suitable condition for antigen-antibody interaction. However, ionic strength of 0.167 is about to the ionic strength of 1x PBS (ionic strength 0.17). Therefore, be to convenient for preparation, 1x PBS (pH 7.4) was used as a solution for subsequent experiments.



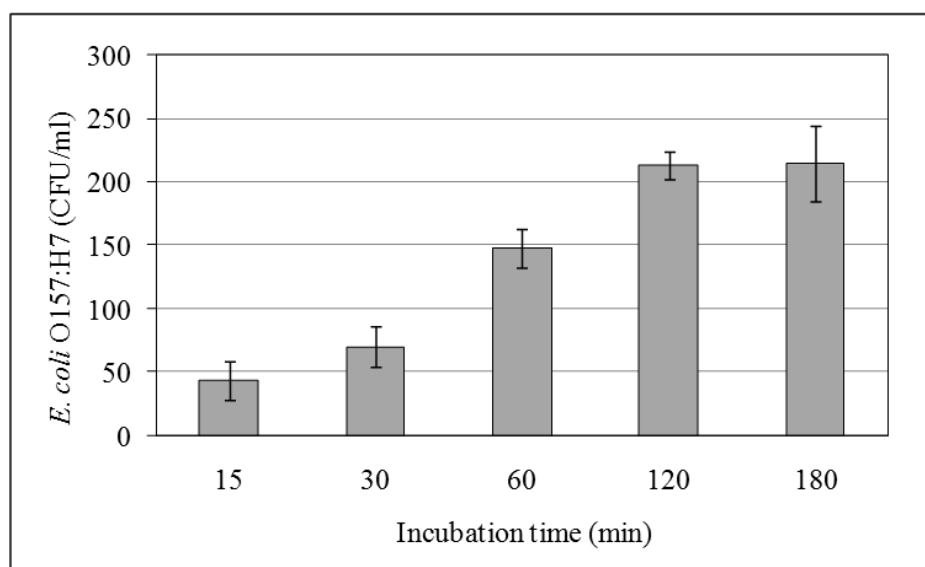
**Figure 2.15** Zeta potential at various ionic strength of amino-MNPs (uncoated MNPs) and IgG coated MNPs

## 7. Testing with bacteria

### 7.1 Effect of incubation time

IgG coated MNPs (0.2 mg) were incubated with *E. coli* O157:H7 ( $1.3 \times 10^3$  CFU/ml) for 15, 30, 60, 120 and 180 min to obtain an appropriate incubation time. Amount of bacteria for this experiment was set to the exceed concentration for MNP binding to obtain an accurate result. From the result, longer incubation time gave more isolated bacteria (Figure

2.16). However, when the incubation time passed 180 min, the amount of isolated bacteria was not different from that of the 120 min. This indicated that it reached to the maximum binding capacity of MNPs. Thus, 120 min was used as the incubation time in the subsequent experiments.



**Figure 2.16** Effects of incubation time on the binding of IgG coated MNPs onto *E. coli* O157:H7. The initial concentration of bacteria was  $1.3 \times 10^3$  CFU/ml

## 7.2 Effect of MNP concentration

IgG coated MNPs were incubated with various amount of *E. coli* O157:H7 to assess their capture efficiency. It was found that 1.0 mg MNPs gave the highest capture efficiency value compared with 0.5 and 0.2 mg MNPs and could detect even small amount of bacterial cells in 10 ml suspension while 0.2 and 0.5 mg MNPs could not (Table 2.5). That means that the sensitivity of MNPs could be increased by increasing the amount of MNPs. However, when considered at each amount of MNPs for bacteria capture, amount of *E. coli* O157:H7 cells did not associate to the capture efficiency of MNPs because the capture efficiency values distributed and were not arranged in order of cell concentrations.

To ensure whether *E. coli* O157:H7 were captured by MNPs via antigen-antibody interaction, uncoated MNPs were incubated with the target bacteria. Captured cells were calculated as per cent error of capture. The result showed capture efficiency of all trials were not greater than 0.3% indicating that very few of cells were captured by uncoated MNPs (Table 2.6). This capture was non-specific binding and could be occurred by weak interaction between surface of bacterial cells and surface of MNPs such as electrostatic

force. However, for this experiment, it was confirmed that the bacterial cells were captured by IgGs on MNP surface rather than other interactions.

**Table 2.5** Capture efficiency of IgG coated MNPs to *E. coli* O157:H7

Amount of IgG coated MNPs (mg)		Initial cells	Capture efficiency (%)
0.2	CFU/ml	162000	12.13 ± 0.68
		16200	12.05 ± 4.00
		1620	33.33 ± 4.98
		162	9.88 ± 1.23
		16	16.46 ± 10.86
	CFU/10 ml	16	0
0.5	CFU/ml	162000	26.28 ± 3.43
		16200	62.23 ± 13.08
		1620	19.32 ± 4.16
		162	20.16 ± 1.25
		16	30.86 ± 12.35
	CFU/10 ml	16	0
1.0	CFU/ml	162000	41.46 ± 2.01
		16200	96.37 ± 2.43
		1620	35.10 ± 0.33
		162	48.56 ± 9.81
		16	45.27 ± 5.44
	CFU/10 ml	16	6.17 ± 3.56

**Table 2.6** Capture of uncoated MNPs to *E. coli* O157:H7

Amount of uncoated MNPs (mg)	Initial cells (CFU/ml)	Capture efficiency (%)
0.2	213000	0.11 ± 0.01
	2130	0.23 ± 0.05
0.5	213000	0.13 ± 0.00
	2130	0.08 ± 0.04
1.0	213000	0.14 ± 0.00
	2130	0.13 ± 0.05

In general, high capture efficiency could be obtained from suspension with low amount of bacterial cells because there are sufficient MNPs for capture with all cells as in the study of Yang *et al.* (2007) and Cheng *et al.* (2009). However, the result from this experiment showed some irregularities. The guidelines for microbiological quality of ready-to-eat foods (Gilbert *et al.*, 2000) recommended the absence of *E. coli* O157 in 25 g of sample. This means the important principle for detection of this pathogen is not how many cells but is the presence or absence. From the result, IgG coated MNPs could isolate small amount of cells of 16 CFU in 1 ml or 16 CFU in 10 ml of sample if MNPs increased to 1.0 mg. These indicated high sensitivity of MNPs for *E. coli* O157:H7 detection. Although the MNPs could detect low amount of target cells, but the sensitivity can be improved to obtain higher efficiency by using other methods for antibody coating onto particle surface. Cheng *et al.* (2009) used avidin-biotin interaction to coat antibody onto particle instead of direct coating and this improved the efficiency of MNPs to higher than 80% for *E. coli* detection.

### 7.3 Specificity of IgG coated MNPs

Specificity of MNPs was investigated by incubation of IgG coated MNPs with non-*E. coli* O157:H7 both Gram negative and positive bacteria. For Gram negative bacteria, capture efficiency were 1.48%, 7.51%, 14.55% and 1.93% for *E. coli* ATCC 8739, *E. aerogenes*, *P. mirabilis* and *S. Typhimurium* DMST 16809, respectively. For Gram positive bacteria, capture efficiency were 39.00% and 26.67% for *B. cereus* ATCC 11778 and *S. aureus* ATCC 25923 (Table 2.7).



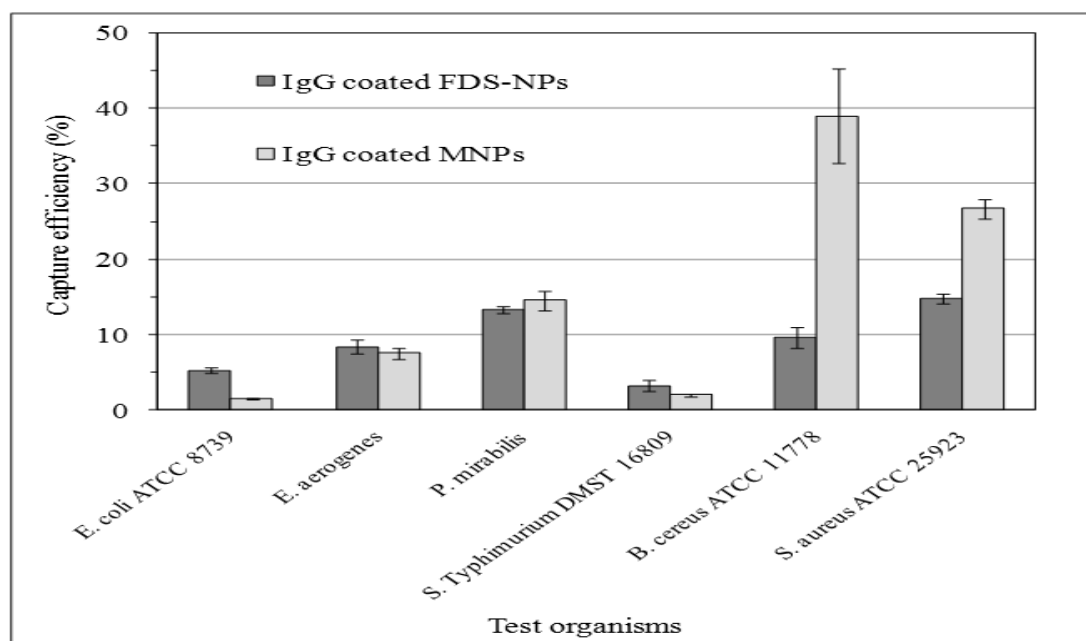
**Table 2.7** Capture of IgG coated MNPs to non-*E. coli* O157:H7

Bacteria	Initial cells (CFU/ml)	Capture efficiency (%)
<i>E. coli</i> ATCC 8739	4460	1.48 ± 0.16
<i>E. aerogenes</i>	2050	7.51 ± 0.76
<i>P. mirabilis</i>	5440	14.55 ± 1.30
<i>S. Typhimurium</i> DMST 16809	3760	1.93 ± 0.18
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	1800	39.00 ± 6.24
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3510	26.67 ± 1.36

#### 7.4 Comparison of specificity of IgG coated FDS-NPs and MNPs

Capture to non-*E. coli* O157:H7 of IgG coated FDS-NPs and MNPs were similar. Both nanoparticles showed high non-specific binding to non-target bacteria especially *P. mirabilis*, *B. cereus* ATCC 11778 and *S. aureus* ATCC 25923 (Figure 2.17).

Cross reaction of particles to non-target bacteria is an undesirable effect for bacterial detection. From the result, the possible reasons to explain about this event was the antibody which was used in this study. IgGs against *E. coli* O157 was polyclonal antibody prepared from animals (rabbit). Thus, it will recognize a specific antigen at various different epitopes and its degree of specificity is variable. That may cause of the cross reaction which was found in this experiment. The way to solve this problem was using monoclonal antibody instead. Monoclonal antibody is a highly specific antibody produced in large quantity by the clones of a single hybrid cell formed in the laboratory. It recognizes only one epitope of a specific antigen. Thus, cross reaction to non-targets may be minimized if monoclonal antibody was used instead. However, to obtain an accurate cause of cross reaction of FDS-NPs and MNPs, more investigation is needed. That includes the study in depth of characteristic of IgGs, particle surface and bacterial surface.



**Figure 2.17** Comparison of specificity of IgG coated FDS-NPs and MNPs.

## Conclusion

For MNPs, this study showed a facile technique for the synthesis of MNPs with amino group within single step. Amino-MNPs with different size were prepared via polyol technique using autoclave as a reactor. The reaction could occur under lower temperature as compared to other reports. The results showed that the amount of NaOH had an effect on the speed of MNP formation. XRD and EDS analysis confirmed that the amino-MNPs were pure magnetite with nearly superparamagnetic properties. FT-IR analysis showed the existence of amino group on particle which is necessary for conjugation with biomolecules. Glutaraldehyde was used as cross-linker between IgGs and particle surface that allowed IgGs could coat on amino-MNPs. Loading capacity of IgGs on particle surface was about 7.20  $\mu\text{g}/\text{mg}$  when incubated with IgGs at 37 °C for 24 h. IgG coated MNPs showed high sensitivity which 1 mg MNPs could detect 16 CFU of *E. coli* O157:H7 in 10 ml of PBS when incubated for 120 min. This technique can help detection method by decreasing the enrichment time which is necessary in conventional methods. However, a problem of MNPs was they had cross reaction to non-target bacteria especially in Gram positive bacteria that might because of using polyclonal antibody and interaction between particle surface and bacterial surface.

## References

- Asouhidou, D.D., K.S. Triantafyllidis, N.K. Lazaridis and K.A. Matis. 2009. Adsorption of Remazol Red 3BS from aqueous solutions using APTES- and cyclodextrin-modified HMS-type mesoporous silicas. **Colloids Surf., A** 346 (1-3): 83-90.
- Brownlee, J. 2007. Antigen-antibody interaction. **CIS Technical Report 070427A**. 1-5.
- Bumajdad, A., J. Eastoe, M.I. Zaki, R.K. Heenan and L. Pasupulety. 2007. Generation of metal oxide nanoparticles in optimised microemulsions. **J. Colloid Interface Sci.** 312 (1): 68-75.
- Cai, W. and J. Wan. 2007. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. **J. Colloid Interface Sci.** 305 (2): 366-370.
- Cheng, Y., Y. Liu, J. Huang, K. Li, W. Zhang, Y. Xian and L. Jin. 2009. Combining biofunctional magnetic nanoparticles and ATP bioluminescence for rapid detection of *Escherichia coli*. **Talanta** 77 (4): 1332-1336.
- Daniel, M.C. and D. Astruc. 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chem. Rev.** 104 (1): 293-346.
- Ding, J., K. Tao, J. Li, S. Song and K. Sun. 2010. Cell-specific cytotoxicity of dextran-stabilized magnetite nanoparticles. **Colloids Surf., B**. 79 (1): 184-190.
- Gilbert, R.J., J. de Louvois, T. Donovan, C. Little, K. Nye, C.D. Ribeiro, J. Richards, D. Roberts and F.J. Bolton. 2000. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. **Commun. Dis. Public. Health**. 3 (3): 163-167.
- Guo, S., D. Li, L. Zhang, J. Li and E. Wang. 2009. Monodisperse mesoporous superparamagnetic single-crystal magnetite nanoparticles for drug delivery. **Biomaterials** 30 (10): 1881-1889.
- Gupta, A.K. and M. Gupta. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials** 26 (18): 3995-4021.
- Heurtault, B., F. Schuber and B. Frisch. 2010. Pharmaceutical applications of nanoparticle carriers, 1097-1119. *In* P. Boisseau, P. Houdy and M. Lahmani, eds. *Nanoscience: nanobiotechnology and nanobiology*. Springer, Berlin.
- Hyeon, T., S. S. Lee, J. Park, Y. Chung and H.B. Na. 2001. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. **J. Am. Chem. Soc.** 123 (51): 12798-12801.
- Ivnitski, D., I. Abdel-Hamid, P. Atanasov and E. Wilkins. 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. **Biosens. Bioelectron.** 14 (7): 599-624.
- Lacheisserie, E.T., D. Gignoux and M. Schlenker. 2002. *Magnetism*. Kluwer Academic Publisher, Norwell, Massachusetts.
- LaConte, L., N. Nitin and G. Bao. 2005. Magnetic nanoparticle probes. **Materialstoday** 8 (5): 32-38.
- Liu, X., M.D. Kaminski, Y. Guan, H. Chen, H. Liu and A.J. Rosengart. 2006. Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel. **J. Magn. Magn. Mater.** 306 (2): 248-253.

- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193 (1): 265-275.
- Santra, S., P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç and W. Tan. 2001. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Anal. Chem.* 73 (20): 4988-4993.
- Shi, B.F., Y.S. Wang, Y.L. Guo, Y.Q. Wang, Y. Wang, Y. Guo, Z.G. Zhang, X.H. Liu and G.Z. Lu. 2009. Aminopropyl-functionalized silicas synthesized by W/O microemulsion for immobilization of penicillin G acylase. **Catal. Today** 148 (1-2): 184-188.
- Sun, S., H. Zeng, D.B. Robinson, S. Raoux, P.M. Rice, S.X. Wang and G. Li. 2003. Monodisperse MFeO (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.** 126 (1): 273-279.
- White, L.D. and C.P. Tripp. 2000. Reaction of (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces. **J. Colloid Interface Sci.** 232 (2): 400-407.
- Yamaura, M., R.L. Camilo, L.C. Sampaio, M.A. Macêdo, M. Nakamura and H.E. Toma. 2004. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **J. Magn. Magn. Mater.** 279 (2-3): 210-217.
- Yang, H.H., H.Y. Qu, P. Lin, S.H. Li, M.T. Ding and J.G. Xu. 2003. Nanometer fluorescent hybrid silica particles as ultrasensitive and photostable biological labels. *Analyst* 128 (5): 464-466.

## รายนามผู้วิจัย โครงการที่ 2

### หัวหน้าโครงการที่ 2

รศ.ดร.พรณี ต้อยเต็มวงศ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทรศัพท์ 0-2579-2400 โทรสาร 0-2579-2351 E-mail: [fscikrt@ku.ac.th](mailto:fscikrt@ku.ac.th)

### ผู้ร่วมงานวิจัย

2.2.1 ดร. อรรวรรณ ชุณหชาติ

สาขาจุลชีววิทยา สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

จ. นครปฐม โทรศัพท์ 034-281-105-6 เบอร์ภายใน 7668 โทรสาร 034-281-057

e-mail: [ffaswoc@ku.ac.th](mailto:ffaswoc@ku.ac.th) และ [chor19@yahoo.com](mailto:chor19@yahoo.com)

2.2.2 รศ.ดร.ประเวทย์ ต้อยเต็มวงศ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี  
เลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

โทรศัพท์: โทรสาร:02-470-8885 E-mail Address: [pravate.tui@kmutt.ac.th](mailto:pravate.tui@kmutt.ac.th)

2.2.3 รศ.ชัยวัฒน์ กิตติกุล ผู้วิจัยร่วม

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

โทรศัพท์ 0-3435-1895, 0-3428-1105 โทรสาร0-3428-1057

E-mail: [fscicvk@ku.ac.th](mailto:fscicvk@ku.ac.th), [chaivat@gmail.com](mailto:chaivat@gmail.com)