

บทที่ 2 ทฤษฎี/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุภาคนาโน (Nanoparticles)

ภายใต้ความเข้าใจกระบวนการทางชีวภาพในระดับโมเลกุลที่ต้องการงานวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำสูงสุด หนึ่งในวัสดุที่มีการนำมาใช้งานกันมากคือ อนุภาคซิลิกาโนที่มีการบรรจุโมเลกุลของสีฟลูออเรสเซนต์ไว้ภายใน (Dye-doped silica nanoparticles ; NPs) ทั้งในส่วนของ การสังเคราะห์ การเชื่อมต่อดัวยสารชีวโมเลกุล การประยุกต์ใช้ในงานทางชีวภาพที่ต่าง ๆ กัน อนุภาคซิลิกาโนมีการพัฒนาความสามารถในการตรวจวัดทางแสง สำหรับโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะที่มีความสำคัญทางชีวการแพทย์ เช่น แอนติบอดี เซลล์มะเร็ง และโมเลกุลชีวภาพอื่นๆ วัสดุนาโนที่มีการนำมาใช้มีหลากหลายชนิดทั้ง Quantum dot, Au NPs และ magnetic NPs ในปัจจุบันและในอนาคตจะมีการพัฒนาวัสดุนาโนมาเป็นเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์โมเลกุลชีวภาพที่หลากหลายมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งการศึกษาทางด้าน ชีวโมเลกุล จีโนม โปรตีโอม การค้นหา การวินิจฉัยโรคทาง การแพทย์ และการบำบัดรักษาโรคติดเชื้อและมะเร็ง (Yan, 2007)

2.1.1 วัสดุนาโนที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางชีวภาพ

2.1.1.1 Au NPs

เป็นวัสดุนาโนที่มีการใช้มากชนิดหนึ่งในงานวิเคราะห์ทางชีวภาพ Au NPs เป็นที่รู้จักกันทั่วไปในรูปแบบของ Au colloid ซึ่งพื้นผิวของ Au NPs จะให้แทบสีการดูดกลืนคลื่นแสงซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เกิดจากขนาดและรูปร่างโดยการตรวจวัดทางแสง ทำให้มีการนำ Au NPs มาใช้เป็นตัวติดตามทางสี (Colorimetric probs) (Schulz, 2003) เสปคตรัมการดูดกลืนแสงที่ผิวของอนุภาคจะแตกต่างไปจากตัวรบกวนอื่นๆ Au NPs มีการพัฒนาให้มีความสามารถในการตรวจวัดสูงสำหรับเป้าหมายจำนวนมาก มีการนำมาใช้ในการตรวจวัด Oligonucleotides , โปรตีน และสารชีวโมเลกุลต่างๆ โดยใช้ Au NPs เป็นเครื่องหมายในการตรวจหาสารชีวโมเลกุลนั้นๆ (Rossi, 2006) Au NPs มีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ทางการค้าแล้ว ตัวอย่างเช่น Lateral flow strip ที่มีการพัฒนาให้สามารถตรวจเชื้อก่อโรคได้อย่างรวดเร็วและเป็นจุดที่สำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรค (Ow, 2005)

2.1.1.2 Quantum dots

QDs จัดเป็นวัสดุกึ่งตัวนำมีหลายชนิด เช่น CdSe, CdTe, CdS, ZnSe, PbS และ PbTe ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 2 nm ถึง 10 nm (ยังไม่มีกรณีของอนุภาคที่พื้นผิว) QDs ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เข้มมาก (10-20 เท่ามากกว่าสีอินทรีย์ฟลูออเรสเซนซ์) และให้ความคงอยู่ของการเรืองแสงที่เสถียรเกิดการซีดจางของสีน้อยกว่าสีอินทรีย์ฟลูออเรสเซนซ์ QDs ที่มีแถบของการเรืองแสงในช่วงสีน้ำเงิน (ส่วนใหญ่เป็น CdSe) จนถึงความยาวคลื่นในช่วงอินฟราเรด (ส่วนใหญ่จะเป็น PbS และ PbSe) ขนาดของ QDs จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่ใช้ การคายแสงในช่วงคลื่นอินฟราเรดของ QDs มีการนำมาประยุกต์ใช้ทั้ง การสร้างภาพของเนื้อเยื่อ ในทางการแพทย์ และการศึกษาทางชีวภาพ QDs มีการดูดกลืนแสงในช่วงกว้างซึ่งจะถูกกระตุ้นอย่างต่อเนื่องในเวลาเดียวกัน คุณสมบัตินี้จะทำให้ได้เครื่องหมายทางแสงจำนวนมากสำหรับการศึกษาการสร้างยีน การตรวจหาสารปริมาณมากๆ ในเวลาเดียวกัน และการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ QDs เป็นวัสดุนาโนที่มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ในการตรวจสารปริมาณมากๆ ในครั้งเดียวโดยการวิเคราะห์ด้วย Microarray platforms (Smith, 2006)

2.1.1.3 Magnetic nanoparticles

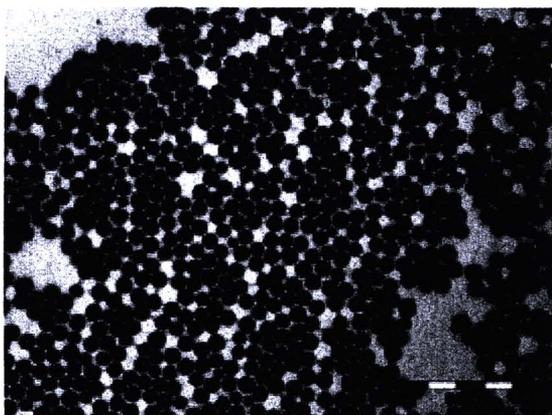
เป็นอนุภาคนาโนที่มีคุณสมบัติของ Superparamagneticซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับวัสดุทางชีวภาพ การขนส่งตัวยาได้ตรงเป้าหมายสำหรับการบำบัดโรค และการบำบัดรักษาโรคมะเร็ง เพราะว่าความเป็น Superparamagnetic ทำให้ Magnetic NPs สามารถทำให้สารที่สัมผัสด้วยเกิดเป็นภาพจาก Magnetic resonance imaging (MRI) สำหรับการวินิจฉัยโรค (Lee, 2006)

2.1.1.4 Lanthanide [Ln³⁺] NPs

อนุภาคนาโนที่เตรียมขึ้นจาก Eu³⁺, Sm³⁺, Tb³⁺, Gd³⁺ และสารอื่นๆ มีความน่าสนใจเพราะว่าให้แสงที่เสถียร และส่วนใหญ่ให้แถบแสงกระตุ้นในช่วงแคบ (<10 nm) และเลื่อนไปจนถึง (>150 nm) และให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ยาวนาน พื้นผิวของอนุภาคนาโนสามารถที่จะดัดแปลงได้ง่ายโดยไม่ต้องทำการปรับเปลี่ยนด้วยสารอื่นๆ การกระจายตัวของอนุภาคนาโนที่เหมาะสมสำหรับใช้ติดฉลากสารชีวภาพขึ้นอยู่กับ การกำจัดตัวรบกวนที่เกิดจากสีที่อยู่อิสระออกโดยการวัดที่ซาลงในระดับวินาที ขบวนการสร้างอนุภาคนาโนชนิดนี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของสีฟลูออเรสเซนซ์ ไม่ทำให้เกิดการกระพริบของแสง Lanthanide NPs มีการสร้างขึ้นแล้วโดยมีการใช้ในทาง immunoassay การเกิดภาพทางแสงด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ สำหรับการตรวจวัดปริมาณด้วยวิธี histochemistry มีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย และการตรวจวิเคราะห์ DNA (Wang, 2006)

2.1.1.5 Dye-doped silica NPs

อนุภาคซิลิกา นาโนในปัจจุบันมีการใช้กันมากในงานวิเคราะห์ทางชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุพอลิเมอร์ อื่นๆ ซึ่งนำมาใช้ในการติดฉลากโมเลกุลชีวภาพอย่างกว้างขวาง อนุภาคซิลิกา นาโนเกิดการบดบังกันเพียงเล็กน้อยและเกิดการรั่วของสีออกจากอนุภาคน้อย (Tabatabaieil, 2006) การเลือกสังเคราะห์ในสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้มีโมเลกุลของสีจำนวนมากถูกบรรจุอยู่ในอนุภาคซิลิกา นาโน (มีจำนวนโมเลกุลของสีบรรจุอยู่ตั้งแต่ 10 จนถึง 1,000 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 Transmission Electron Microscopy (TEM) image ของอนุภาค silica nanoparticles ที่มีโมเลกุลของสีบรรจุไว้ภายในอนุภาค, Scale bar เท่ากับ 500 nm (Yan, 2007)

การบดบังของสีฟลูออเรสเซนต์ที่มีโมเลกุลอยู่จำนวนมาก เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ความเข้มแสงของอนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นมีความเข้มแสงมาก อนุภาคซิลิกา นาโนที่มีสีบรรจุอยู่ภายในเป็นจำนวนมากจะเป็นการเพิ่มสัญญาณแสงของอนุภาคซิลิกา นาโนเมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุลของสีฟลูออเรสเซนต์บริสุทธิ์ ในการประยุกต์ใช้ อนุภาคซิลิกา นาโนจะมีความไวในการตรวจวิเคราะห์มาก อย่างไรก็ตาม โมเลกุลของสีจะถูกบรรจุอยู่ในโครงสร้างซิลิกาซึ่งจะปกป้องสีที่อยู่ภายในจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่รอบๆ ทั้งการทำให้เกิดการซีดจางของสี และการย่อยสลายของสี ที่เกิดจากการออกซิไดซ์ของออกซิเจนและการกระตุ้นจากแสงซึ่งส่งผลกระทบต่อ โมเลกุลของสีน้อยมากเมื่อบรรจุอยู่ภายในอนุภาค (Kim, 2006) ความเข้มแสงที่เสถียรมากของอนุภาคซิลิกา นาโนมีการนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความเข้มแสงมาก หรือการกระตุ้นที่ต้องใช้เวลานาน ตัวอย่างเช่น การเกิดภาพภายในเซลล์ที่เกิดจากการซีดจางของแสง ซึ่งอนุภาคซิลิกา นาโนจะพบปัญหาที่เกิดขึ้นนี้น้อย การดัดแปลงพื้นผิวทำได้ง่าย ความแตกต่างของหมู่ฟังก์ชันที่สร้างขึ้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมต่อกับสารชีวโมเลกุลได้ง่าย นอกจากนี้พื้นผิวของอนุภาคที่เกิดขึ้นนี้ มีความเสถียรทางกายภาพจากคุณสมบัตินี้ทำให้อนุภาคนาโนเป็นสารติดฉลากที่ดีสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวภาพและการเกิดภาพทางการแพทย์

2.1.2 การสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกาโน

วิธีการเตรียมอนุภาคซิลิกาโนมีทั้งวิธีทางเคมี และวิธีทางฟิสิกส์ แต่วิธีทางเคมีนั้นให้ผลที่ดีกว่าและสามารถเตรียมได้ง่ายกว่าวิธีทางฟิสิกส์ กระบวนการโซเจลเป็นวิธีทางเคมีที่ได้รับความนิยมเป็นกระบวนการซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีในระดับโมเลกุล โดยใช้ออกไซด์หรือไฮดรอกไซด์ชนิดต่างๆ เป็นสารตั้งต้นผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส (Hydrolysis) และปฏิกิริยาควบแน่น (Condensation) ดังนั้นกระบวนการโซเจลจึงสามารถควบคุมขั้นตอนการเตรียมอนุภาคซิลิกาโนได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ ในปัจจุบันกระบวนการโซเจลเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโนซึ่งวิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบันมีอยู่ 2 วิธี คือวิธี Stober (Stober method) และรีเวิร์สไมโครอิมัลชัน ชนิดน้ำในน้ำมัน (Water in Oil Reverse Microemulsion method) (Smith, 2006; Wang, 2006; Yan, 2007)

2.1.2.1 Stober method

วิธี Stober เริ่มศึกษาโดย Stober และ Fink ในปี 1986 เป็นการประยุกต์ใช้กระบวนการโซเจลเพื่อสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโน โดยมีหลักการ คือใช้แอมโมเนียไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา Hydrolysis และ Condensation ซึ่งมีน้ำและแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นองค์ประกอบขนาดอนุภาคที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 100 nm-1000 nm และพบว่าขนาดของอนุภาคขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา และชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ โดยขนาดอนุภาคที่เตรียมจาก Methanol จะมีขนาดเล็กกว่าอนุภาคที่เตรียมจากแอลกอฮอล์ที่มีสายยาวกว่า (Roa, 2005) ต่อมามีการพัฒนาวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ซึ่งได้รับความนิยมเป็นจำนวนมากในการเตรียมวัสดุนาโนชนิดต่างๆ เนื่องจากอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กกว่าวิธีแรก และสามารถควบคุมขนาดของอนุภาค และความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคได้ง่ายกว่า เป็นวิธีที่เตรียมได้ง่าย ไม่ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ หรือความดัน ซึ่งขนาดอนุภาคสามารถควบคุมได้ โดยการปรับอัตราส่วนของสารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในระบบไมโครอิมัลชัน (Smith, 2006; Wang, 2006; Yan, 2007)

2.1.2.2 Reverse Microemulsion Method

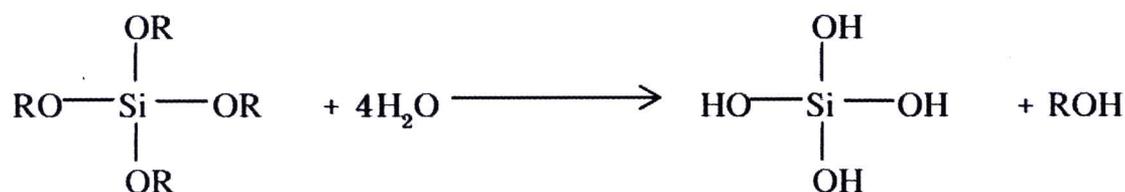
เป็นวิธีการที่ประยุกต์ใช้วิธีการสังเคราะห์สารแบบน้ำในน้ำมัน (water in oil microemulsion) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างของผสมที่ประกอบไปด้วย น้ำ สารลดแรงตึงผิว และน้ำมัน ร่วมกับการใช้เทคนิคโซลเจลในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกา

กระบวนการ โซลเจล (Sol-Gel Technology) เป็นกระบวนการเตรียมทางเคมีที่ได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการเตรียมเซรามิกและแก้วที่มีคุณภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง (นราธิป วิทยากร, 2549) ซึ่งกระบวนการโซลเจลเป็นการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวที่เรียกว่า “Sol” ซึ่งส่วนมากอยู่ในรูปของสารแขวนลอยที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 0.1-1 ไมครอน เป็นของแข็งที่เรียกว่า “Gel” (จุฑารัตน์ อาชวรัตน์ถาวร, 2549)

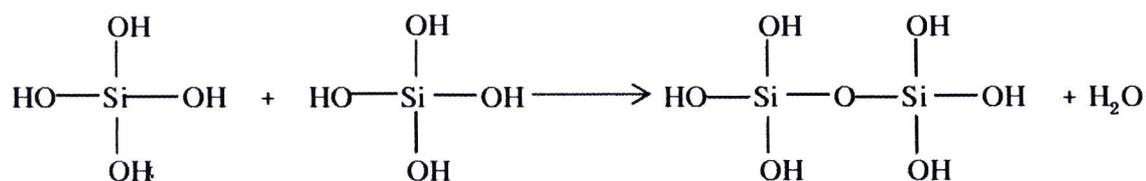
ปฏิกิริยาที่สำคัญในกระบวนการ โซลเจลมี 3 ปฏิกิริยา คือ Hydrolysis (รูปที่2.2), Water condensation (รูปที่2.3) และ Alcohol condensation (รูปที่2.4) ดังสมการ (1)-(3) ตามลำดับ และปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา คือ pH, ตัวเร่งปฏิกิริยา และอุณหภูมิ ดังนั้นการควบคุมปัจจัยเหล่านี้ในสถานะที่ต่างกันจะทำให้โซลและเจลที่ได้มีคุณสมบัติ และโครงสร้างต่างกัน (Hench, 1998)



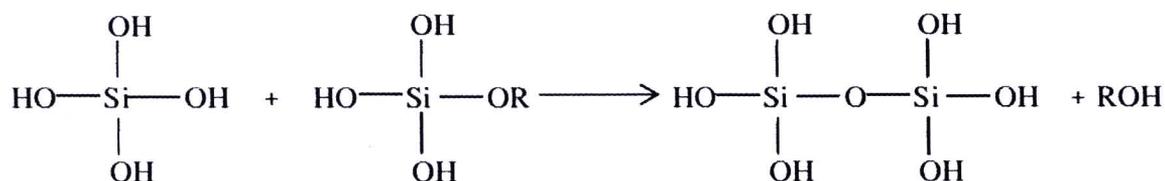
เมื่อ M แทน โลหะ ได้แก่ Si, Zr, Ti, Al, Sn, Ce, และ OR แทน Alkoxy group ขั้นตอนแรกของการทำโซลเจล คือการผสมสารตั้งต้น (precursor) กับน้ำ สารตั้งต้นที่นิยมใช้ในกระบวนการโซลเจล เป็นสารประกอบโลหะ หรือกึ่งโลหะที่ล้อมรอบด้วยลิแกนด์ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เช่น Metal Alkoxide เป็นสารตั้งต้นที่ได้รับความนิยมสูง เนื่องจากทำปฏิกิริยากับน้ำได้ดี เช่น Tetramethoxysilane (TMOS) และ Tetraethoxysilane (TEOS) โดยปฏิกิริยาที่ (1) เป็นปฏิกิริยาที่โลหะอัลคอกไซด์สายสั้นๆถูกแยกสลายด้วยน้ำ ซึ่งสารละลายอัลคอกไซด์ที่ใช้อาจมีองค์ประกอบมากกว่าหนึ่งชนิดก็ได้ การแยกสลายด้วยน้ำนี้จะอาศัยการกวนอย่างสม่ำเสมอ และโลหะอัลคอกไซด์ส่วนใหญ่จะไวต่อน้ำ ดังนั้นปฏิกิริยาอาจเกิดรุนแรงมาก เนื่องจากการคายความร้อนออกมามากเกินไป ซึ่งในบางกรณีจำเป็นต้องควบคุมการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ โดยต้องควบคุมให้ความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยา และค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายให้เหมาะสม จึงจะเกิดปฏิกิริยาแยกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) ได้



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยา Hydrolysis ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโน (Hench, 1998)

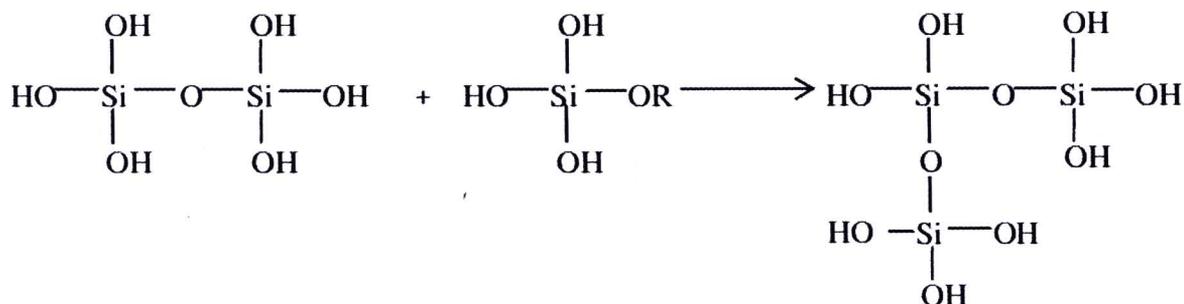


รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยา water Condensation ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโน (Hench, 1998)



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยา Alcohol condensation ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโน (Hench, 1998)

สารประกอบที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา Condensation ต่อไปจนกลายเป็น Silica Network อยู่ในสภาวะที่เรียกว่าเจล เรียกว่า ปฏิกิริยา Polymerization (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยา Polymerization ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโน
(จุฑารัตน์ อาชวรัตน์ถาวร, 2549)

อิมัลชัน (Emulsion) ประกอบด้วยของเหลวที่ไม่สามารถละลายเข้ากันได้อย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไปมารวมกัน และสามารถทำให้ของเหลวทั้ง 2 ชนิดนี้อยู่รวมกันอย่างเสถียรได้โดยไม่แยกชั้นกัน ซึ่งจะต้องใช้สารที่เรียกว่า Emulsifier เข้าช่วยทำให้อิมัลชันมีลักษณะเป็นชั้นเดียวกัน แต่ถ้าส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็น 2 ภูมิภาค คือ ภูมิภาคภายในกับภูมิภาคภายนอก (พิมพา ติลาพรพิสิฐ, 2540)

ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) เป็นระบบที่มีความคงตัวเชิงอุณหพลศาสตร์ (Isotropic) มีคุณสมบัติทางแสง (Transparent) และเทอร์โมไดนามิกส์ (Thermodynamics) ซึ่งประกอบด้วยน้ำ (water) , สารละลายอินทรีย์หรือน้ำมัน (Oil) และสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) โดยที่น้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์นั้นจะเกิดการกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆขนาดนาโน และคงตัวอยู่ได้ในสารลดแรงตึงผิว โดยอาศัย Interface film ของ Surface active molecule และอาจมีตัวช่วยสารลดแรงตึงผิว (Co-surfactant) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแอลกอฮอล์ที่มีความยาวโซ่ปานกลาง (C_4-C_7) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคในระบบไมโครอิมัลชัน มีค่าประมาณ 100-1000 Å หยดของสารละลายจะปะทะ, รวมตัวกัน และแยกออกจากกันอย่างต่อเนื่อง เมื่อพิจารณาจากลักษณะภายนอกระบบไมโครอิมัลชันจะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenous)

ในระบบโมเลกุลแล้วระบบนี้จะประกอบด้วยการกระจายตัวของของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ผสมเข้ากัน (Immiscible liquid) เป็น Heterogeneous ที่ความเข้มข้นของน้ำสูงๆ โครงสร้างภายในของไมโครอิมัลชัน ประกอบด้วยหยดน้ำมัน (droplet) ขนาดเล็ก (micelles) เรียกว่า Oil in water microemulsion และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันจะเกิด Bicontinuous phase ขึ้นซึ่งมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน และความเข้มข้นของน้ำมันสูงๆ Bicontinuous phase จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น droplet มีตั้งแต่ 10-100 nm. ขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิว ระบบนี้มีความแปรปรวนมากถ้าเปลี่ยนอุณหภูมิเป็นการทำลายโครงสร้าง Droplet ของน้ำมันขณะที่ Droplet ของน้ำถูกทำลายเมื่อลดอุณหภูมิ

2.1.3 การดัดแปลงพื้นระเคมี (Surface modification)

ในการตรวจวิเคราะห์ทางชีวภาพ และเทคโนโลยีชีวภาพ อนุภาคซิลิกา นาโนได้ถูกนำประยุกต์ใช้โดยนำมาติดกับสารชีวโมเลกุล เช่น แอนติบอดี ดีเอ็นเอ หรือเปปไทด์ โดยทั่วไปแล้วสารชีวโมเลกุลเหล่านี้สามารถติดกับผิวซิลิกา นาโนได้ แต่อย่างไรก็ตามทำให้การเชื่อมต่ออย่างมั่นคงโดยทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ย่อมดีกว่า และสามารถควบคุมจำนวนของสารชีวโมเลกุล ที่ติดผิวอนุภาคซิลิกา นาโนได้ด้วย ขั้นตอนแรกก่อนติดสารชีวโมเลกุลเข้ากับอนุภาคซิลิกา นาโน คือต้องดัดแปลงพื้นระเคมีที่บริเวณผิวของอนุภาคทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันขึ้นมาก่อน เช่น thiol, amine, sulfhydryl หรือ carboxyl (Wang, 2006) ส่วนใหญ่อนุภาคซิลิกา นาโนใช้ silane reagent ในการดัดแปลงทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันได้ง่ายโดยเคลือบผิวของ Silica ด้วยสารจำพวก Alkoxysilane reagent เช่น carboxyethylsilanetriol เพื่อทำให้เกิด Carboxylic acid, 3- aminopropyltriethoxysilane ทำให้เกิดหมู่ Amine หรือที่ใช้ 3- mercaptoppyl triethoxysilane ทำให้เกิดหมู่ Thiol (Yan, 2007) ซึ่งการดัดแปลงพื้นระเคมีทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่ผิวอนุภาคซิลิกา นาโนสามารถทำได้แตกต่างกัน 3 วิธีดังนี้

วิธีที่ 1 คือการทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันตั้งแต่แรกที่มีการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกา นาโนขึ้นมา หรือทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันขึ้นร่วมกับขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาค โดยเกิดปฏิกิริยา Hydrolysis และ Condensation ของ TEOS หรือ Organosilane อื่นๆซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

Zhao (2007) และ Hun (2007) สังเคราะห์ Fluorescent core-shell nanoparticles โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจล ซึ่งเตรียมได้ง่ายโดยทำให้เกิดปฏิกิริยา co-hydrolysis ของ Tetraethylorthosilicate (TEOS) ร่วมกับ (3-aminopropyl) triethoxysilane (APS) ที่ทำให้เกิดหมู่เอมีนที่สามารถเชื่อมต่อกับสารชีวโมเลกุลได้ ซึ่ง Fluorescent core-shell nanoparticles ที่มีหมู่เอมีนแล้วนั้นจะนำมาติดฉลากด้วย anti-SEC1 monoclonal antibodies โดยใช้ Glutaraldehyde เป็นตัวเชื่อมต่อแอนติบอดีที่ผิวของอนุภาค เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาปริมาณของ staphylococcal enterotoxin C1 ตามหลักของ sandwich fluoroimmunoassay โดยใช้ Fluorescent microscope ตรวจผลการเรืองแสงที่เกิดขึ้น เนื่องจากภายในโครงร่างของซิลิกามีสีเรืองแสง Rubpy แทรกอยู่ ทำให้มีความเข้มขึ้นของการเรืองแสงสูง และคงอยู่ได้นาน เนื่องจากโครงร่างซิลิกา คอยป้องกันไม่ให้เกิดการชะล้างของสี Rubpy ออกมา ซึ่งให้ผลที่เชื่อถือได้ แสดงให้เห็นถึงข้อดีของวิธีนี้ คือสามารถติดฉลากของแอนติบอดีได้ง่าย และมีความในการตรวจสอบสารพิษแม้มีปริมาณน้อย ซึ่ง Hun (2007) ได้นำงานวิจัยเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ดัดแปลงนำไปใช้ในการตรวจหา recombinant human interleukin-6 (IL-6)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 13 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน.....246676
เลขเรียกหนังสือ.....



วิธีที่ 2 คือการตัดแปลงหมู่ฟังก์ชันที่ผิวของอนุภาคซิลิกานาโน ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มขึ้นจากการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกานาโนขึ้นมาแล้ว และสังเคราะห์ซิลิกาที่มีหมู่ฟังก์ชันเคลือบที่ผิวอนุภาคซิลิกานาโนอีกชั้นหนึ่ง (post coating) ซึ่งไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากอาจเกิดอนุภาคขึ้นมาจากภายหลังได้ ทำให้ขนาดอนุภาคไม่สม่ำเสมอ

Yang (2004) ได้สังเคราะห์ Fluorescent hybrid silica (FHS) nanoparticles ซึ่งทำการทดลองในระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจล โดยใช้ Tetramethyl orthosilicate เป็นสารตั้งต้นของซิลิกา และสีเรืองแสงที่ใช้คือ Lissamine rhodamine B sulfonylchloride (LRSC) หลังจากนั้นทำให้เกิดหมู่เอมีนบริเวณผิวของอนุภาค โดยนำอนุภาคที่สังเคราะห์ได้จากขั้นตอนแรกมาเคลือบผิวด้วย 3-aminopropyl trimethoxysilane (APTES) ซึ่งทำให้มีระบบไมโครอิมัลชันเหมือนการสังเคราะห์ขั้นแรกอีกครั้ง ทำให้เกิดหมู่เอมีนที่ผิวอนุภาค หลังจากนั้นติดแอนติบอดีที่ผิวอนุภาค โดยใช้ Glutaraldehyde เป็นตัวเชื่อมเพื่อใช้ในการตรวจหา Hepatitis B surface antigen ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจหาค่าสูงสุดประมาณ 0.1 ng/ml ซึ่งถือว่ามี sensitivity ที่ดีมาก

วิธีที่ 3 คือการตัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคหลังจากการสังเคราะห์อนุภาคแล้ว เช่นเดียวกับวิธีที่ 2 แต่ใช้สารเคมีทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่ต้องการขึ้น โดยไม่ต้องสังเคราะห์ซิลิกาที่มีหมู่ฟังก์ชันขึ้นมาเคลือบที่ผิวใหม่ จึงไม่มีอนุภาคที่เกิดขึ้นภายหลังขั้นตอนการเคลือบผิว ดังนั้นอนุภาคที่ได้จึงมีขนาดสม่ำเสมอ วิธีนี้จึงเป็นที่นิยมใช้วิธีนี้ในการตัดแปลงพันธะเคมีทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันบนอนุภาคอื่น ๆ ซึ่งมีการวิจัยมากมายใช้วิธีการนี้ เช่น

Yang (2004) ได้สังเคราะห์ Nanometer-sized fluorescent hybrid silica (NHS) particles ทำหน้าที่เป็น fluorescent probe ซึ่งในขั้นตอนแรกจะสังเคราะห์ fluorescent silica precursor ทำการสังเคราะห์ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนโดยใช้ 3-aminopropyl-trimethoxysilane เป็นสารตั้งต้นของซิลิกาและใช้ fluorescent isothiocyanate เป็นสีเรืองแสงซึ่ง fluorescent silica precursor ที่ได้จะมีขนาดต่ำกว่า 40 nm หลังจากนั้นจึงสังเคราะห์ Nanometer-sized fluorescent hybrid silica (NHS) particles ขึ้นด้วยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจล โดยควบคุมการ Hydrolysis ของ fluorescent silica precursor กับ trimethoxysilane ทำให้ได้สีเรืองแสงกระจายตัวอยู่ในโครงร่างของ ซิลิกา ซึ่งป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนจากสิ่งแวดล้อม และสีเรืองแสงทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์กับซิลิกาในตอนต้นแล้ว ดังนั้นจึงไม่เกิดการชะล้างของสี และการเกาะกลุ่มกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเรืองแสงโดยตรง ซึ่งอาจทำให้เกิดการชะล้างของสี หรือมีการกระพริบ (blinking) เกิดขึ้น หลังจากนั้นจึงตัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคโดยใช้ 3-aminopropyl-trimethoxysilane ซึ่งทำให้เกิดหมู่เอมีน และนำอนุภาคมาติดที่ผิวของอนุภาคโดยใช้ Glutaraldehyde เพื่อเป็นเครื่องมือในการ

ตรวจหา human alfa-fetoprotein (AFP) ซึ่งสามารถตรวจหาได้ในปริมาณที่ต่ำสุด คือ 0.05 ng/ml ซึ่งได้ผลรวดเร็ว และมีความไวในการตรวจสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย

Qhobosheane (2001) ได้สังเคราะห์ Dye-doped silica nanoparticles ซึ่งทำการสังเคราะห์โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ขนาดอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน (Relative standard deviation=1.6%) และมีการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค โดยใช้ Trimethoxysilypropyldiethylenetriamine (DETA) หลังจากนั้นจึงแทนที่ด้วยหมู่ Carboxyl โดยใช้ Succinic anhydride ใน N,N-dimethylaminopropyl ภายใต้อุณหภูมิที่ 60°C ในโทรเจนและกระตุ้นหมู่ Carboxyl ด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) และ N-hydroxy-succinimide (NHS) ใน Z-morpholinoethanesulfonic acid (MES) buffer เพื่อติดตามเอนไซม์ Glutamate dehydrogenase เพื่อใช้ในการตรวจหา PTK2 cell ได้อย่างรวดเร็ว

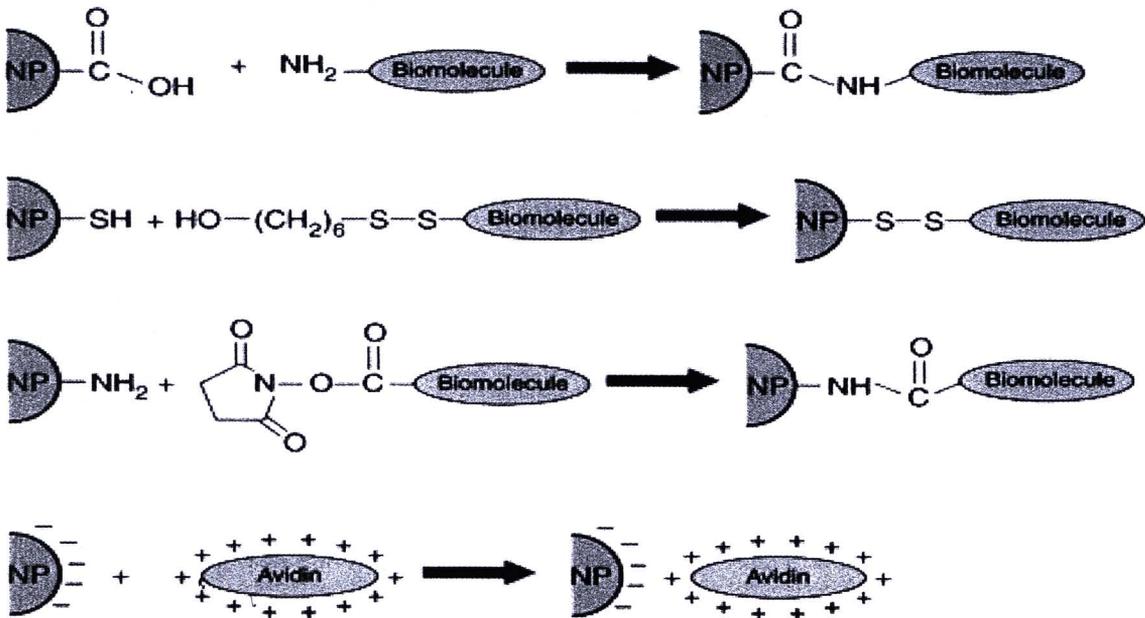
ซึ่งงานวิจัยของ Bagwe (2006), ทำการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโนโดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และศึกษาวิธีการดัดแปลงที่ผิวอนุภาค โดยปรับให้มีความสมดุลระหว่าง inert group และ active group เพื่อให้มีการเกาะกลุ่มกันน้อยลง และลดการเกิดการจับกันอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific binding) ซึ่งการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาค ทำผ่านกระบวนการ Hydrolysis ของ Tetramethylorthosilicate และ Organosilane reagent โดยทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลาย เช่น carboxylate, amine, amine/phosphate, polyethyleneglycol, octadecyl และ carboxylate/octadecyl group และจากผลการทดลองพบว่า การเติม inert functional group เช่น methyl phosphonate จะทำให้ลดการเกาะกลุ่มลงได้ ส่วนการเติม octadecyl carboxylate group ทำให้เกิดการเกิด non-specific binding ลดลง หลังจากที่มีการดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวอนุภาค เพื่อทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันแล้วนั้น จะมีการติดฉลากที่ผิวของอนุภาคซิลิกาโน ซึ่งสามารถใช้การติดฉลากที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้วมักจะติดฉลากด้วยเอนไซม์, สารกัมมันตรังสี, สารเรืองแสง, ทอง, และโลหะหนัก การเลือกติดฉลากด้วยสารใดนั้นขึ้นอยู่กับนำไปใช้งาน เช่น การติดฉลากด้วยแอนติบอดี หรือสารกัมมันตรังสี จะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อนำไปใช้ในงานด้าน Blotting หรือ ELISA ในขณะที่การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงและโลหะนำไปใช้เฉพาะเทคนิค Flow cytometry และ Immunocytochemistry (Goers, 1993)

2.1.4 การติดฉลากที่ผิวของอนุภาค (Antibody Immobilization)

ส่วนการติดฉลากอนุภาคซิลิกาnanoด้วยแอนติบอดีนั้นมีหลายวิธี แต่วิธีที่เป็นที่นิยมมี 2 วิธี คือ

1. การใช้ Glutaraldehyde ในการเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคซิลิกาnanoที่มีหมู่ Amine กับแอนติบอดี (Hun, 2007; Yang, 2004)
2. การใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) และ N-hydroxy-succinimide (NHS) ควบคู่กันในการกระตุ้นหมู่ Carboxyl ที่ผิวของอนุภาคเพื่อติดแอนติบอดี (Zhoa, 2004; Lian, 2004; Qhobosheane, 2001; Wang, 2006)
3. การใช้ Streptavidin หรือ Biotin ในการเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคซิลิกาnanoที่มีหมู่ Amine หรือหมู่ Carboxyl กับแอนติบอดี (Wang, 2005)

Wang (2006) ได้พัฒนาวิธีที่รวดเร็ว, มีความไวสูง (sensitivity) และมีความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นเรื่องที่สำคัญมากในการตรวจวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ โดยส่วนใหญ่แล้วการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์จะใช้เวลานาน, ใช้เครื่องมืออุปกรณ์มากมาย และสามารถตรวจหาเชื้อได้เพียง 1 เชื้อเท่านั้น ในการตรวจหา 1 ครั้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาโดยใช้ Multicolored fluorescent resonance energy transfer silica nanoparticles โดยใช้ 3 สี ได้แก่ FAM-SE, R6G-SE และ TMR-SE การปรับปริมาณสีที่ใช้ 3 สี เมื่อกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่นเดียวสามารถเกิดการเรืองแสงที่แตกต่างกัน 3 สี หลังจากนั้นดัดแปลงติดฉลากด้วยแอนติบอดีของ 3 เชื้อที่แตกต่างกัน คือ *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* เพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ในเวลาเดียวกัน โดยกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่นเดียว ขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกา nano ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี Stober และมีการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคเพื่อทำให้เกิดหมู่ Amine โดยใช้ Trimethoxysilyl-propyldiethyenetriamine หรือทำให้เกิดหมู่ Carboxyl โดยใช้ Carboxyethyl-silanetriol sodium salt



รูปที่ 2.6 แสดงการเชื่อมต่อของอนุภาคซิลิกานาโนที่มีหมู่ฟังก์ชันที่พื้นผิว จับกับสารชีวโมเลกุลที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกาะกับพื้นผิวของอนุภาคซิลิกานาโน (Yan, 2007)

ขั้นตอนการติดฉลากด้วยแอนติบอดีมี 3 วิธี ดังนี้

1. นำอนุภาคซิลิกานาโนที่มีการดัดแปลงทำให้เกิดหมู่ Carboxyl ที่ผิวอนุภาคแล้ว นำมากระตุ้นด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) และ N-hydroxy-succinimide (NHS) ใน Z-morpholinoethanesulfonic acid (MES) buffer เพื่อนำไปใช้ต่อกับ Antibody ได้
2. นำอนุภาคซิลิกานาโนที่มีการดัดแปลงทำให้เกิดหมู่ Carboxyl ที่ผิวอนุภาคแล้ว นำมาต่อกับ Streptavidin หลังจากนั้นนำไปเชื่อมกับ biotin-labeled antibody
3. นำอนุภาคซิลิกานาโนที่มีการดัดแปลงทำให้เกิดหมู่ Amine นำมาต่อกับ PEG-biotin, Streptavidin, และ biotin-labeled antibody ตามลำดับ

2.2 การวิเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน

2.2.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron Microscope)

ใช้อิเล็กตรอนที่ถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้าในสุญญากาศให้มีพลังงานสูงขึ้น ซึ่งมีพฤติกรรมทางกายภาพคล้ายคลื่นแสง และสามารถบังคับให้คลื่นอิเล็กตรอนมีขนาดความยาวคลื่นสั้นกว่าคลื่นแสงในช่วงที่ตามองเห็น ทำให้สามารถเห็นรายละเอียดของโครงสร้างขนาดเล็กได้ (วิรุพห์ มังคละวิรัช และคณะ, 2543)

หลักการเบื้องต้นของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

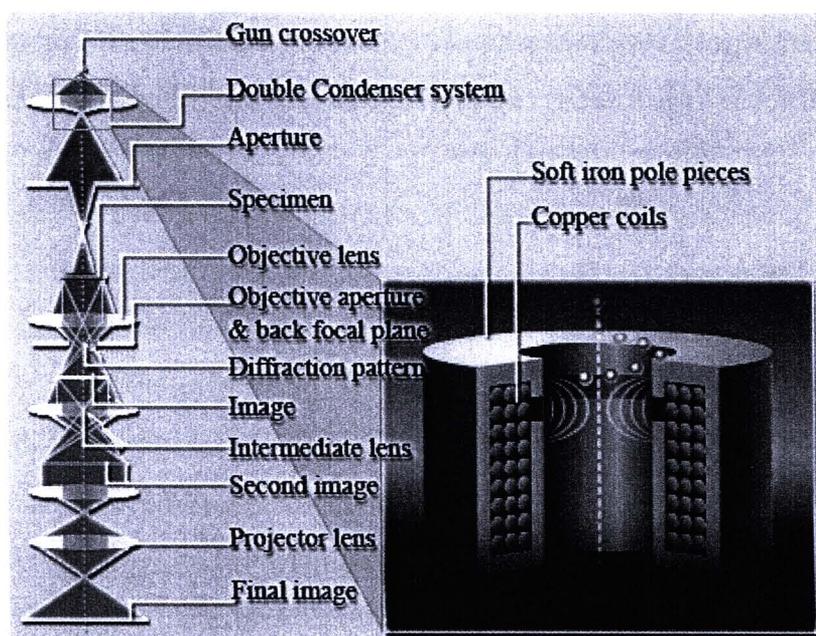
แหล่งกำเนิดแสงอิเล็กตรอนได้จากการปืนยิงอิเล็กตรอน (Electron gun) ซึ่งเป็นขดลวดทั้งสแตน เมื่อเพิ่มกระแสไฟฟ้าเข้าไปในขดลวดทำให้อิเล็กตรอนถูกปลดปล่อยออกมาจากขดลวดทั้งสแตนเนื่องจากอิเล็กตรอนมีขนาดเล็กมากและเพื่อป้องกันการชนกันของมวลอากาศกับลำแสงอิเล็กตรอน ซึ่งจะทำให้เกิดการหักเหได้ จึงต้องมีการดูดอากาศจากตัวกล้องให้เป็นสุญญากาศ ระบบเลนส์ที่ใช้เป็นระบบเลนส์แม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic lens) แทนเลนส์แก้วที่ใช้ในกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา เลนส์แม่เหล็กไฟฟ้าประกอบด้วยขดลวดพันรอบแท่งแม่เหล็ก เมื่อกระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปทำให้เกิดสนามแม่เหล็กขึ้น สนามแม่เหล็กไฟฟ้าจะทำให้ลำแสงอิเล็กตรอนเข้มข้น เพื่อไปตกกระทบกับตัวอย่างวัตถุที่จะศึกษา เลนส์ของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนประกอบด้วยเลนส์รวมแสง (Objective lens) และ Projector lens ทำหน้าที่ฉายภาพจากวัตถุลงบนจอภาพคล้ายกับ Eyepiece ของกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา จอภาพฉายด้วยสารเรืองแสงพวกฟอสฟอรัส เมื่อลำแสงอิเล็กตรอนตกลงบนจอ จะทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นเป็นสารสีเขียวแกมเหลืองที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในปัจจุบันมี 2 ชนิดด้วยกัน คือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) (Wischnitzer, 1989)

2.2.1.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบาง ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำแสงอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ กล้องประเภทนี้สร้างภาพโดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่าง กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีกำลังขยายและประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมาก (กำลังขยายสูงสุดประมาณ 0.1 นาโนเมตร)

หลักการทํางานของ TEM

ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (Condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ จากนั้นลำอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านตัวอย่างที่จะศึกษา (Specimen) ซึ่งตั้งอย่างที่จะศึกษาจะต้องมีลักษณะที่แบนและบางมาก จากนั้นจะเกิดการกระเจิงขึ้นเมื่ออิเล็กตรอนทะลุผ่านตัวอย่างไป และอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่างนี้ จะถูกปรับโฟกัสของภาพโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective lens) ซึ่งเป็นเลนส์ที่ทำหน้าที่ขยายภาพให้ได้รายละเอียดมากที่สุด จากนั้นจะได้รับการขยายและส่งไปสู่จอร์บ (projector lens) และปรับโฟกัสของลำอนุภาคอิเล็กตรอนให้ยาวพอดีที่จะปรากฏบนฉากเรืองแสง สุดท้ายจะเกิดภาพขึ้นมา (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 ส่วนประกอบ และการทำงานของกล้อง TEM (สถาบันนวัตกรรม, 2550)

2.2.1.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) (วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา และคณะ, 2543)

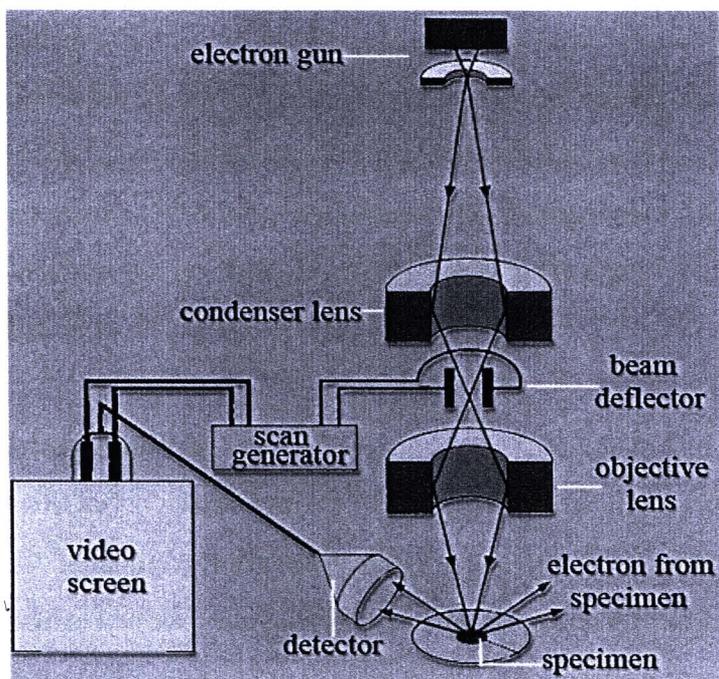
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สร้างภาพโดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากพื้นผิวตัวอย่าง ซึ่งภาพที่ได้เป็น 3 มิติ ดังนั้นจึงถูกมาใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง ข้อดีของกล้อง SEM เมื่อเปรียบเทียบกับกล้อง TEM คือภาพโครงสร้างที่เห็นจากเครื่อง SEM จะเป็นภาพลักษณะ 3 มิติ ในขณะที่ภาพจากเครื่อง TEM จะให้ลักษณะ 2 มิติและ วิธีการใช้

งานของกล้อง SEM จะมีความรวดเร็วและใช้งานง่ายกว่ากล้อง TEM มาก ในกรณีที่เป็นกล้อง SEM ที่มีอุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุประกอบอยู่ด้วย จะมีความสามารถในการวิเคราะห์ธาตุเฉพาะจุด หรือพื้นที่เล็กๆในกล้อง SEM สัญญาณภาพจะเกิดจากการใช้ตัวตรวจวัดอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (Secondary Detector) มาจับสัญญาณอิเล็กตรอนทุติยภูมิที่เกิดขึ้นหรือใช้ตัวตรวจวัดอิเล็กตรอนกระเจิงกลับ (Back Electron Detector) มาจับสัญญาณอิเล็กตรอนกระเจิงกลับที่เกิดขึ้นดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการแยกรังสีตามระดับพลังงานได้

หลักการทํางานของกล้อง SEM

อิเล็กตรอนปฐมภูมิ (Primary electron) จากแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน (electron gun) จะถูกเร่งด้วยศักย์ไฟฟ้าสูงที่สามารถปรับค่าได้ จากนั้นจะถูกดึงดูดสู่แผ่น แอโนด (Anode plate) ภายใต้วัดความดันสุญญากาศ และมีชุด Condenser Lens ที่จะปรับลำอิเล็กตรอน (Electron beam) ให้มีขนาดเล็กลงเพื่อเป็นการเพิ่มความเข้มของอิเล็กตรอน จากนั้นอิเล็กตรอนจะวิ่งผ่านเลนส์วัตถุ ซึ่งทำหน้าที่ในการปรับอิเล็กตรอนปฐมภูมิให้มีจุดโฟกัสบนผิวตัวอย่างพอดี และจะเกิดอันตรกิริยาระหว่างอิเล็กตรอนปฐมภูมิกับอะตอมธาตุในวัตถุ เกิดการถ่ายโอนพลังงานที่ขึ้นความลึกจากพื้นผิวที่ระดับต่างๆ ทำให้เกิดการปลดปล่อยสัญญาณอิเล็กตรอน (Electron signal) ชนิดต่างๆออกมา (รูปที่ 2.8) ซึ่งใช้ประโยชน์ในการศึกษาลักษณะผิวของตัวอย่าง และวิเคราะห์ธาตุที่มีในตัวอย่างได้ตามลักษณะสัญญาณภาพที่ได้จากสัญญาณอิเล็กตรอนชนิดต่างๆที่เกิดขึ้น คือ

1. สัญญาณภาพจากอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (Secondary Electron Image) เป็นกลุ่มอิเล็กตรอนพลังงานต่ำ 3-5 อิเล็กตรอน โวลต์ เกิดที่พื้นผิวระดับไม่ลึก (ไม่เกิน 10 นาโนเมตร) โดยเกิดกับธาตุที่มีแรงยึดเหนี่ยวอิเล็กตรอนที่ผิวดำ
2. สัญญาณภาพจากอิเล็กตรอนกระเจิงกลับ (Backscattered Electron Image) เป็นกลุ่มอิเล็กตรอนที่สูญเสียพลังงานให้กับอะตอมในชิ้นงานบางอย่างด้วย และกระเจิงกลับออกมา ซึ่งมีพลังงานสูงกว่าอิเล็กตรอนทุติยภูมิ เกิดที่พื้นผิวระดับลึกกว่า 10 นาโนเมตรโดยเกิดได้ดีกับธาตุที่มีเลขอะตอมสูง
3. สัญญาณภาพจากรังสีเอ็กซ์ (X-Ray Image) ซึ่งรังสีเอ็กซ์มีลักษณะเฉพาะตัวเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่เกิดจากอิเล็กตรอนในระดับชั้นโคจรต่างๆ (K, L, M,...) ถูกกระตุ้นหรือได้รับพลังงานมากพอจนหลุดออกจากวงโคจร และต้องลดระดับพลังงานภายใน เนื่องจากอิเล็กตรอนที่ถูกดึงมาแทนที่ระดับพลังงานสูงกว่า โดยการปล่อยพลังงานส่วนเกิดออกมาในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า เพื่อให้ตัวเองมีพลังงานเท่ากับชั้นโคจรที่ไปแทนที่ ซึ่งคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้านี้มีความยาวคลื่นเฉพาะในแต่ละธาตุ จึงเป็นสาเหตุนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ธาตุตามระดับของตัวอย่างได้ทั้งเชิงคุณภาพ และปริมาณ



รูปที่ 2.8 ส่วนประกอบ และการทำงานของกล้อง SEM (สถาบันนวัตกรรม, 2550)

2.2.2 เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Spectrofluorometer) (ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์, 2544)

สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์หลายชนิดเมื่อดูดกลืนแสงจากภายนอกเข้าไปแล้วจะเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นเท่ากับความยาวคลื่นแสงที่ดูดกลืนเข้าไป (resonance radiation) หรือมีความยาวคลื่นมากกว่าออกมาในทุกทิศทาง แต่ถ้การเปล่งแสงออกมาอาศัยพลังงานจากปฏิกิริยาเคมี เรียกว่า “การเปล่งแสงทางเคมี” หรือ “chemiluminescence” และถ้อาศัยพลังงานจากกระบวนการทางชีววิทยาเรียกว่า “การเปล่งแสงทางชีวภาพ” หรือ “bioluminescence” แต่ถ้การเปล่งแสงเนื่องจากคุณสมบัติในตัวของมันเองเรียกว่า “การวาวแสง” หรือ “fluorescence”

2.2.2.1 การวาวแสงและการเรืองแสงของโมเลกุล

การเปล่งแสง (Luminescence) ของสารบางชนิดจัดว่าเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นค่อนข้างพิเศษสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบหรือตรวจพิสูจน์ชนิดของสารนั้นๆได้ โดยเฉพาะในปัจจุบันนี้ ได้กลายเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีสภาพไวสูง มีลักษณะเฉพาะ ดังจะเห็นได้จากจำนวนผลงานที่ตีพิมพ์ออกมาอย่างมาก แต่เมื่อเทียบกับเทคนิคทางยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีแล้ว เทคนิคหลังใช้งานได้กว้างขวางและนิยมกว่า (แมน อมรสิทธิ์ และอมรเพชรสม, 2539)

2.2.2.2 ชนิดของการเปล่งแสง

การเปล่งแสงมีด้วยกันหลายชนิด ทั้งนี้แล้วแต่แหล่งของพลังงานที่ทำให้โมเลกุลไปอยู่ที่สถานะกระตุ้น (excited state) เช่น โมเลกุลที่เกิดอันตรกิริยากับโปรตอนของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าทำให้เกิด luminescence molecules เรียกว่า photoluminescence ซึ่งยังแบ่งออกได้เป็นการวาวแสง (fluorescence) และการเรืองแสง (phosphorescence) ทั้งสองปรากฏการณ์นี้แตกต่างกันที่การกลับมาสู่สถานะพื้นใหม่

2.2.2.3 หลักการของโฟโตลูมิเนสเซนซ์

โฟโตลูมิเนสเซนซ์เป็นกระบวนการไปสู่สถานะกระตุ้นและกลับสู่สถานะพื้น (excitation-deexcitation process) โดยมีโปรตอนเข้าไปเกี่ยวข้องคือ มีการดูดกลืนโปรตอนและให้โปรตอนออกมาเนื่องจากกระบวนการที่เกิดขึ้นจะต้องแข่งกัน ดังนั้นอัตราการเกิดของกระบวนการเหล่านี้จึงมีความสำคัญ

2.2.2.4 กระบวนการกระตุ้น (Excitation)

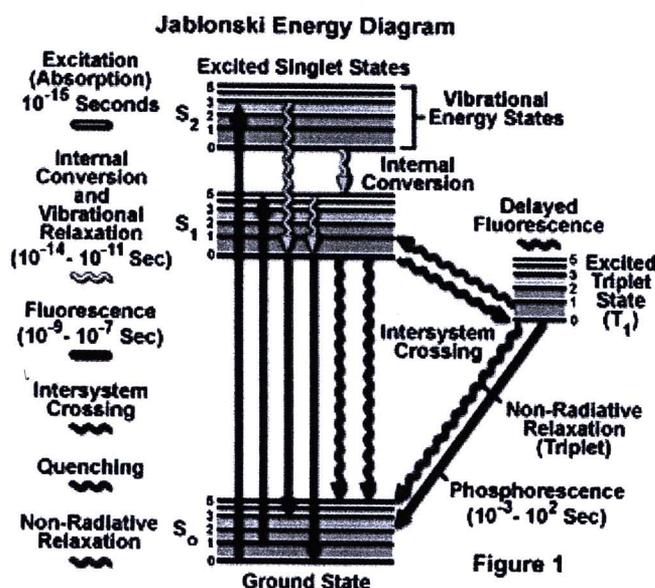
เมื่อโมเลกุลดูดกลืนรังสีจากการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าขึ้นไปอยู่ที่สถานะกระตุ้น (excited state) และจะต้องมีกลไกที่จะต้องลดพลังงานที่มากเกินไปลงมาสู่สถานะพื้น (deexcited state) ถ้าให้มีลติพลิติตี (multiplicity) ของโมเลกุลเป็น M ซึ่งแสดง orbital angular momentum ของแต่ละสถานะ (state) และเกี่ยวข้องกับ spin ดังสมการ $M = 2S + 1$ เมื่อ $S = \text{spin quantum number}$ ของโมเลกุลและเป็นผลรวมของ spin ของอิเล็กตรอนในโมเลกุล สำหรับโมเลกุลของสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ $S = 0$ เพราะโมเลกุลมีจำนวนอิเล็กตรอนเป็นคู่ ดังนั้นสถานะที่มีพลังงานต่ำที่สุด ซึ่งเรียกว่าสถานะพื้นอิเล็กตรอนจะต้องอยู่เป็นคู่ (pair) ดังนั้น $M = 2(0) + 1 = 1$ เรียกว่า singlet state (singlet electronic state) และให้ singlet state พื้น (ground singlet state) เป็น S_0 ถ้าเป็น S_1 และ S_2 จะหมายถึง singlet state กระตุ้นที่หนึ่ง และที่สองตามลำดับ (first and second excited singlet state) ขณะที่โมเลกุลอยู่ในสถานะกระตุ้นอิเล็กตรอนตัวหนึ่งมีโอกาสที่เปลี่ยน spin กลับทาง ดังนั้น

$$S = +1/2 + 1/2$$

$$M = (2 \times 1) + 1 = 3 \text{ เรียก triplet state}$$

และ triplet state ที่มีพลังงานต่ำที่สุดให้เป็น T1 ดังนั้นโมเลกุลใดที่มีจำนวนอิเล็กตรอนเป็นเลขคู่ จึงไม่สามารถมี triplet state พื้น (ground singlet state) เพราะอิเล็กตรอนมีพลังงานต่ำที่สุดมี spin paired ดังนั้นโมเลกุลที่มีหนึ่ง unpaired อิเล็กตรอน (จำนวนอิเล็กตรอนเป็นเลขคี่) จึงมีสถานะเป็น doublet state เช่นพวก free radicals เป็นต้น

เพื่อให้เห็นกระบวนการเกิดการกระตุ้นเนื่องจากดูดกลืนพลังงาน และกระบวนการแผ่รังสีออกมาเป็น singlet และ triplet state สามารถแสดงได้ง่ายๆ โดยใช้แผนภาพแสดงระดับพลังงาน Jablonski ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แผนภาพแสดงระดับพลังงานของ (Sharma, 2006)

ในแผนภาพนี้แสดงระดับพลังงานให้เห็นเฉพาะ electronic และ vibrational energy levels เท่านั้น แต่ rotational energy level จะไม่มี เพราะไม่สามารถวัดและแยกออกได้ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ธรรมดา ซึ่งระดับพลังงานความยาวคลื่นแสงที่ให้ออกมาก็แตกต่างกันอย่างมากและยังขึ้นอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์ด้วย

2.2.2.5 กระบวนการลดระดับพลังงาน (Deexcitation)

สมมุติว่าโมเลกุลถูกกระตุ้นไปสู่สถานะกระตุ้น (excited state) S_2 การที่โมเลกุลจะกลับมาสู่สถานะพื้นนั้นจะมีกลไกต่างๆ เกิดขึ้นหลายขั้นตอน ถ้าโมเลกุลนั้นอยู่ในสารละลายโมเลกุลนั้นสามารถลด vibrational energy ที่เกินไป ลงด้วยการชนโมเลกุลของตัวทำละลาย กลายเป็นความร้อนโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Vibrational Relaxation (VR) ในขณะเดียวกันโมเลกุลที่อยู่ S_2 ใดๆจะลดต่ำลงมาอยู่ใน $S_{1(0)}$ หรือจาก $S_{2(0)}$ ลดต่ำลงมาอยู่ในระดับ $S_{1(5)}$ เรียกว่ากระบวนการ Internal Conversion (IC) กระบวนการลดพลังงานทั้งของ VR และ IC เกิดขึ้นรวดเร็ว (ประมาณ 10^{-12} วินาที) จนโมเลกุลลงมาสู่สถานะ S_1 โดยไม่มีการแผ่รังสี ดังนั้นจะเห็นว่าการ deexcited จาก state ที่สูงกว่า S_1 ลงมาสู่ vibrational energy ต่ำ ($v=0$) โดยมีการแผ่รังสีจะพบน้อยมีเพียงไม่กี่โมเลกุลที่เกิดแบบนี้ เช่น azulene และอนุพันธ์ เมื่อโมเลกุลลงมาสู่ระดับพลังงาน S_1 ที่มีระดับพลังงานต่ำแล้วก็จะเกิด deexcited ไปสู่ S_0

โดยมีการให้โฟตอนเรียกว่า เกิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ซึ่งเกิดขึ้นได้รวดเร็วมาก (ประมาณ $10^{-9} - 10^{-7}$ วินาที)

2.2.2.6 เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นเครื่องตรวจวัดที่ใช้ในการวัดสารที่สามารถให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ (Fluorescence species) เช่น สารประกอบที่มีคอนจูเกต ไพ อิเล็กตรอน (conjugated pi-electrons) และสารประกอบอะโรมาติก

ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ขึ้นกับความยาวคลื่นการกระตุ้น และความยาวคลื่นการคาย โดยจะเลือกตรวจวัดเฉพาะบางองค์ประกอบที่อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่กำหนด ขณะที่จะไม่ตรวจวัดการคายขององค์ประกอบอื่นๆ ดังนั้นจึงต้องเลือกช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม

2.2.2.7 ส่วนประกอบต่างๆของเครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์นั้นจะมีส่วนประกอบคล้ายๆกับเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แต่เครื่องฟลูออโรมิเตอร์หรือสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์เกือบทั้งหมดมักจะเป็น double beam เพื่อให้ใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับความไม่คงที่ของแหล่งกำเนิดแสง (source) และ background องค์ประกอบของเครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีดังนี้

1) แหล่งกำเนิดแสง (Light Source)

เนื่องจากเครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ต้องการแสงที่ค่อนข้างมีความเข้มสูงกว่าหลอดทังสเตน หรือ ไฮโดรเจน เพราะสภาพไวของเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มของแสง ดังนั้นหลอดกำเนิดแสงที่นิยมใช้กันคือ Xenon-arc lamp และ Mercury-arc lamp

Xenon-arc lamp เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความเข้มของแสงสูงในช่วงความยาวคลื่น 250-600 นาโนเมตร ซึ่งเป็น continuum radiation ซึ่ง Xenon lamp โดยทั่วไปไปใช้ประมาณ 150 วัตต์ และจำเป็นที่จะต้องใช้เครื่องที่ควบคุมกำลังไฟฟ้าให้คงที่อย่างดี เพราะมีผลต่อเสถียรภาพและอายุของหลอดมาก ถ้ากำลังไฟฟ้าที่ผ่านเข้าไปไม่คงที่จะเกิดอาร์กเคลื่อนตำแหน่งไปทำให้เกิดปัญหาขึ้นกับสเปกตรัมที่เปลี่ยนไป

Mercury-arc lamp หลอดที่ใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสงนี้มักจะใช้กับเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ ที่ใช้ filter เพราะแสงที่ให้ออกมาค่อนข้างคงที่และมีความเข้มสูง Mercury-arc lamp ให้ resonance lines ของสเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร แต่ยังมีเส้นสเปกตรัมอื่นๆที่ใช้ประโยชน์ได้ที่ 254, 302, 313, 405, 436, 546, 577 และ 579 นาโนเมตร

2) ฟิลเตอร์และโมนโครเมเตอร์ (Filter and Monochromator)

ฟิลเตอร์หรือ interference filter ใช้สำหรับตัดแสงบางส่วนที่ไม่ต้องการออกไป แต่ถ้าเป็นสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ โดยทั่วไปจะใช้เกรตติง (grating) เป็นโมนโครมิเตอร์ซึ่งสามารถเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ต้องการสำหรับทำให้เกิดการกระตุ้นและเลือกใช้ความยาวคลื่นของฟลูออเรสเซนส์ที่จะวัดได้ ลักษณะของฟิลเตอร์และเกรตติงก็เป็นแบบเดียวกันกับที่ใช้ในเครื่องยูวี-วิซิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดังได้กล่าวมาแล้วเพียงแต่ต่างกันที่มีสองโมนโครเมเตอร์ คือเป็น excitation monochromator และ emission monochromator ซึ่งจะอยู่ในตำแหน่งตั้งฉากของกันและกัน

3) เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (Sample Cell หรือ Cuvette)

เซลล์มาตรฐานที่ใช้กันทั่วไปเป็นเซลล์สี่เหลี่ยมด้านเท่าทำด้วยควอตซ์เพื่อให้แสงยูวีผ่านได้ มีความกว้างด้านละ 1 เซนติเมตร ทั้ง 4 ด้าน เซลล์ชนิดนี้ราคาค่อนข้างแพงจำเป็นต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง

4) เครื่องวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence detector)

เนื่องจากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่จะวัดโดยทั่วไปมีความเข้มต่ำจำเป็นต้องมีการขยายสัญญาณที่วัดได้ด้วยหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์หลายๆหรืออาจใช้ diode array detectors ก็ได้ ฟลูออเรสเซนซ์โดยทั่วไปก็อยู่ในช่วงของยูวี-วิซิเบิลอยู่แล้ว ดังนั้นตัวตรวจวัดสัญญาณ จึงใช้เหมือนกับเครื่องยูวี-วิซิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้เลย

สำหรับเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์จะต่างไปจากเครื่องยูวี-วิซิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์อีกอย่างหนึ่งก็คือ จะมีตัวตรวจวัดสัญญาณ 2 ตัว ตัวหนึ่งวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นจากสารตัวอย่างอีกตัวหนึ่งเรียกตัวตรวจวัดสัญญาณอ้างอิง เพื่อใช้สำหรับทำ spectral correction อันเนื่องมาจากข้อบกพร่องหรือขีดจำกัดต่างๆ

5) เครื่องบันทึกสัญญาณและเครื่องประมวลผล (Signal Processors and Data Read Out)

สัญญาณที่ใช้จากเครื่องวัดจะผ่านเข้ากระบวนการอิเล็กทรอนิกส์แสดงผลออกมาอาจเป็นอย่างไรอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างก็ได้

2.2.3 เครื่องวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด(Fourier Transform Infrared Spectrophotometer)

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy เป็นหนึ่งในเทคนิคด้าน Infrared Spectroscopic ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุลรวมถึงสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด ทั้งของแข็ง ของเหลว และก๊าซ เทคนิค FTIR นี้มีความสามารถในการแยกสูง มีสภาพไวสูง มีผลการวิเคราะห์รวดเร็ว สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ และให้ความถูกต้องแม่นยำสูงกว่าเทคนิคการวิเคราะห์ด้าน spectroscopic หลากหลายเทคนิคทำให้มีการนำไปใช้งานอย่างแพร่หลาย (อรทัย ธิลาพจนานพร, 2546) แหล่งกำเนิดคลื่นอินฟราเรดของเครื่อง FT-IR Spectrometer เป็นแท่งเซรามิกที่เผาด้วยขดลวด ความร้อนทำให้เกิดรังสีอินฟราเรดสู่กระจกเงาที่ทำด้วยโลหะขัดมัน สะท้อนคลื่นแสงสู่ส่วนสำคัญคือ ตัวแยกแสง (Beam Splitter) เพื่อแยกคลื่นแสงออกเป็นสองส่วนเท่าๆกัน ส่วนหนึ่งจะผ่าทะลุออกไปอีกส่วนหนึ่งจะสะท้อนกลับสู่กระจกเงา โดยแสงเลเซอร์ปรับระยะเวลาเคลื่อนที่ของกระจกให้มีระยะและทิศทาง ที่คลื่นแสงทั้งสองส่วนมารวมกันเป็นลำแสงเดี่ยวผ่านไปยังสารตัวอย่าง ซึ่งเรียกระบบนี้ว่า The Michelson Interferometer

คลื่นรังสีอินฟราเรดเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าแต่ให้ความร้อนที่สัมผัสได้อยู่ระหว่างย่านที่มองเห็น (Visible region) กับย่านไมโครเวฟ ความยาวคลื่นอินฟราเรดแบ่งเป็นช่วงคือ ช่วง wave number 4,000-12,800 ซม.⁻¹ เป็นย่านอินฟราเรดใกล้ (Near infrared region) ช่วง wave number 200-4,000 ซม.⁻¹ เป็นย่านอินฟราเรดกลาง (Middle infrared region) ช่วง wave number 10-200 ซม.⁻¹ เป็นย่านอินฟราเรดไกล (Far infrared region) นักเคมีวิเคราะห์จะให้ความสนใจและใช้ประโยชน์รังสีอินฟราเรดช่วงกลาง (Middle IR.) มากกว่าช่วงอื่น เนื่องจากมีความถี่ตรงกับความถี่การสั่นของพันธะโคเวเลนต์ในโมเลกุลของสาร เมื่อสารตัวอย่างได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรดที่เหมาะสมจะเกิดการสั่นหรือการหมุนของพันธะของโมเลกุลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าโมเมนต์ขั้วคู่ของโมเลกุล ทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสง แล้ววัดแสงที่ส่งผ่านออกมาแสดงผลเป็นความสัมพันธ์ของความถี่หรือ wave number กับค่าการส่งผ่านของแสง เรียกว่าอินฟราเรดสเปกตรัม (Infrared Spectrum-IR spectrum)

2.3 เชื้อจุลินทรีย์ *Campylobacter*

2.3.1 ประวัติความเป็นมา

เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ใน Genus *Campylobacter* ที่ก่อให้เกิดโรค เริ่มมีการศึกษาครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1886 ได้จากการแยกเชื้อ *Campylobacter* ที่ปลายลำไส้ใหญ่ โดยถูกกำหนดให้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารที่สำคัญในปี ค.ศ. 1972 อาการของโรครุนแรงอาจทำให้เสียชีวิตได้

King (2004) เป็นคนแรกที่เสนอว่าการติดเชื้อ *Campylobacter* ในมนุษย์มาจาก เชื้อ *Vibrio fetus* ซึ่ง King ได้ให้ชื่อว่า “related vibrios” (*Campylobacter jejuni*) โดยเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อโรคทางเดินอาหารของมนุษย์ แต่การพบ *Campylobacter* ในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วง เป็นไปได้ยากเนื่องจากมีสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงได้มีการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย ซึ่งพบเชื้อที่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 42 °C ในขณะที่ “related vibrios” ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่อุจจาระร่วงพบเชื้อที่เจริญที่ 42 °C (Simpson, 2005) ได้อธิบายวิธีการตรวจหา *C. jejuni* ในตัวอย่างอุจจาระโดยผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูกรองกว้าง 0.65 ไมโครเมตร แล้วนำแผ่นกรองไปวางบน Agar plate นำไปบ่มในสภาวะ microaerobic แต่วิธีนี้ยังไม่สมบูรณ์ จนกระทั่ง (Skirrow, 1994) ได้รายงานผลการศึกษาว่าเชื้อ *C. jejuni* เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารที่เกิดในมนุษย์โดยใช้ selective medium ในการแยก *Campylobacter* จากผู้ป่วย 57 คน คิดเป็นร้อยละ 7.1 ของผู้ป่วย 803 คน โดยพบว่าครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมีอายุในช่วง 15-44 ปี ต่อมาใน ค.ศ. 1978 เกิดการระบาดของ *C. jejuni* ในอเมริกา จำนวนผู้ป่วยมากถึง 3000 คน

Campylobacter แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม

1. Catalase Negative Culture คือ *Campylobacter sputorum* (ss spuyorum, ss bubutus, mucosalis)
2. Catalase Positive Culture แบ่งออกไปได้ 2 กลุ่มคือ

Heat tolerance Catalase Positive คือ *Campylobacter jejuni* และ *Campylobacter coli* สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 42 °C ไม่สามารถเจริญได้ที่ 25 °C และ nalixidic acid sensitive, cephalothin resistant

Non Heat Tolerance Catalase Positive Member คือ *Campylobacter ss fetus* และ *Campylobacter ss venerealis* ไม่สามารถเจริญได้ที่ 42 °C และ nalixidic acid resistant และ cephalothin sensitive

C. jejuni ไม่เจริญที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ (Hoffmann, 1979) อุณหภูมิห้อง (Simpson, 2005) และทำแห้ง ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่เย็นจัด ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตค่อนข้าง

จำกัดคือ 37-42 °C จากการศึกษพบว่า *C. jejuni* (106 CFU/ml on stainless steel surface) ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะบรรยากาศที่มีออกซิเจน 21% ตายในเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเมื่อเทียบกับ *Salmonella Enteritidis* ซึ่งมีชีวิตรอดในสภาวะเดียวกันได้นานถึง 4 วัน *C. jejuni* สามารถแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมจนเข้ามาในห่วงโซ่อาหารจนกลายเป็นสาเหตุหลักของอาการท้องร่วงในประเทศ

2.3.2 สัตุนานวิทยา

Campylobacter มาจากภาษากรีก “Campil” แปลว่าโค้งงอ ส่วน “bacter” แปลว่าท่อน เคยจัดอยู่ใน family Spirillaceae เนื่องจากมีรูปร่างและสรีระคล้ายกับ genus spirillum แต่ปัจจุบันจัดอยู่ใน family Campylobacteraceae ประกอบด้วย *Campylobacter* และ *Arcobacter* ซึ่ง *Campylobacter* แบ่งออกเป็น 18 สปีชีส์ (Murray, 1995) เฉพาะ *C. jejuni* และ *C. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคในคน

Campylobacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเกลียว (spiral) หรือ โค้งงอ (curved rod) เจริญเติบโตช้ามาก generation time ประมาณ 90 นาที สามารถเจริญได้ในสถานะที่เป็น microaerobic (ออกซิเจน 3-6% และ คาร์บอนไดออกไซด์ 2-10%) พกยาปฏิชีวนะ antibiotic และ selective media มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Campylobacter* เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* เป็นจุลินทรีย์ที่เพาะเลียงได้ยาก (fastidious organism) เชื้อที่มีอายุเกิน 48 ชั่วโมงจะเปลี่ยนรูปร่างจากเกลียว (spiral) ไปเป็น ทรงกลม (coccoid form) พวกที่เป็น thermophilic *Campylobacter* เช่น *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. lari* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42 °C แต่ก็สามารถเจริญได้ที่ 31 °C มีความไวต่อความร้อนสามารถถูกทำลายด้วยอุณหภูมิที่ใช้ในการหุงต้มหรือพาสเจอร์ไรส์ โดยที่อุณหภูมิ 55-60 °C เชื้อสามารถถูกทำลายภายใน 0.21-2.5 นาที เซลล์โดยทั่วไปมีความกว้าง 0.2-0.8 ไมครอน ยาว 0.5-5 ไมครอน อาจมีความยาวถึง 8 ไมครอน เมื่อมี 2 เซลล์มาต่อกันและจะเห็นรูปร่างคล้ายนกกบินหรือเหมือนตัวเอสสามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ polar flagellum ที่ขั้วเพียง 1 เส้น โดยอาจจะพบที่ขั้วใดขั้วหนึ่งหรืออาจพบทั้งสองขั้ว การเคลื่อนที่ของเชื้อ *Campylobacter* คล้ายกับการทำงานของสว่าน โดยพบในสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคน 2 สายพันธุ์ คือ *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* และ *Campylobacter coli*

2.3.3 คุณสมบัติทางกายภาพและการเพาะเลี้ยง

เชื้อ *Campylobacter* เจริญในบรรยากาศแบบ microaerophilic คือต้องการออกซิเจนเล็กน้อยประมาณ 5% แต่ถ้าไม่มีออกซิเจนเลยเชื้อจะไม่เจริญ ทั้งนี้เพราะขบวนการสร้างพลังงานของ *Campylobacter* ต้องผ่านวัฏจักรเครปส์ ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อให้เจริญแล้ว เชื้อสามารถเจริญอยู่ได้ในบรรยากาศปกติ ประมาณ 2-3 วัน จากนั้นรูปร่างเซลล์ก็จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นรูปร่างกลมๆ หรือรูปไข่ (coccoid shape) การแยก *Campylobacter* ควรใช้อุณหภูมิ 42 °C ซึ่งสามารถแยกเชื้อออกมาได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C สำหรับอุณหภูมิในการเก็บเชื้อควรอยู่ในช่วง 4 °C ทั้งนี้เพราะจากการเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter* ที่ 4, 10, 22, 37 °C พบว่า *Campylobacter* จะมีชีวิตอยู่ได้ที่ 202, 117, 43, และ 22 ชั่วโมงตามลำดับ (Todor, 2007)

2.3.4 การระบาดของโรคและ สาเหตุที่ทำให้เกิดโรค

Campylobacter jejuni เป็นสาเหตุสำคัญของโรคท้องร่วง (ณฐนนท์ ตราชู, 2550) ในปี ค.ศ. 1990 United Kingdom รายงานว่ามีการระบาดของ *Campylobacter* เพิ่มขึ้น 4 เท่าจากปี ค.ศ. 1980 ได้ติดตามแนวโน้มของการระบาดของโรคที่เกิดจากการกินอาหาร (foodborne disease) เป็นเวลา 15 ปี พบว่า *Campylobacter jejuni* และ *E.coli* O157:H7 เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารจากรายงานพบว่าเชื้อ *Campylobacter* spp. สามารถก่อโรค *Campylobacter enteritis* ทั้งในประเทศพัฒนา กำลังพัฒนา และด้อยพัฒนา ซึ่ง *Campylobacter* จะเป็นปัญหาในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ โดยส่วนมากเกิดอาการไม่มากและอาจหายเองได้ สายพันธุ์ที่มีการรายงานการเกิด Enteritis มากที่สุดคือ *C. jejuni* รองลงมาคือ *C. coli* สำหรับ species อื่นที่มีรายงานการเกิด enteritis แต่ไม่บ่อยคือ *C. upsaliensis*, *C. sputorum*, *C. concisus*, *C. jejuni* ss *doylei* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Campylobacter* spp. อื่นๆ สามารถทำให้เกิดโรคในช่องปากได้ เช่น *C. retus* เป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มฟันอักเสบ (periodontitis) ได้

Campylobacter (*C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari*) สามารถผลิต cytotoxin และ enterotoxin ทำให้เกิดอาการท้องเดินได้ (Jimenez, 1999) *C. jejuni* ทำให้เกิดโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ อาหารประเภทไก่ พบมีการปนเปื้อนเชื้อ *C. jejuni* ประมาณ 20-100% ของไก่ดิบที่ขายปลีก เนื่องจากข้อมูลไก่เป็นข้อมูลของเชื้อที่สำคัญ ดังนั้นเมื่อมีการระบาดเกิดขึ้นแล้วนำเนื้อไก่สดที่เหลือจากการบริโภคของผู้ป่วยนั้นมาวิเคราะห์พบเชื้อ *C. jejuni* ทุกครั้ง สำหรับอาหารอื่นๆ ที่พบเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้ได้แก่ นมดิบ ถ้าหากดื่มนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ด้วยวิธีที่ไม่ถูกต้องอาจมีโอกาสเกิดอาการ ผิดปกติขึ้นได้ นอกจากนี้ในน้ำดื่มหรือน้ำเปล่าที่ใช้การบริโภคหากไม่มีการเติมคลอรีนหรือต้มให้สุกก่อนก่อนนำมาดื่มก็มีโอกาสก่อโรคได้เช่นกัน ปริมาณที่อาจก่อให้เกิดโรคคือ 400-500 เซลล์ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงหรือสุขภาพของผู้บริโภค อาการผิดปกติที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 3-4 วัน

มีการรายงานพบ *C. jejuni* ในสัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยง มีการรายงานการเกิดระบาดของ *C. jejuni* ในเมือง Christchurch ประเทศนิวซีแลนด์ โดยมีผู้ป่วยจำนวน 42 ราย พบว่าน้ำดื่มเป็นเหตุของการติดเชื้อ *C. jejuni* โดยมีการแยก *C. jejuni* ได้จากตัวอย่างน้ำจากแหล่งอื่นๆ ดังนี้ จากแม่น้ำ น้ำบาดาล น้ำจากชายฝั่ง หนองน้ำ จากบทความหลายฉบับพบว่า *C. jejuni* สามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่ไม่สามารถอยู่ในรูปของ viable but non-culturable ได้และเป็นสาเหตุที่ทำให้สามารถทนทานสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ยาวนานขึ้นในแหล่งน้ำธรรมชาติ จากการทดลองพบว่าไก่เพียง 2-3 ตัวที่ติดเชื้อ *C. jejuni* สามารถแพร่เชื้อกับไก่ทั้งโรงเรือนได้ภายในไม่กี่วัน โดยพบว่ามูลไก่และน้ำเป็นสาเหตุ จากการรายงานเห็นได้ว่าน้ำเป็นสื่อกลางในการแพร่กระจายของเชื้อ *C. jejuni* ที่สำคัญอย่างหนึ่ง biofilm ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและพึ่งพากัน สามารถพบได้ในแหล่งน้ำทั่วไป มีรายงานว่า biofilm สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเชื้อโรคหลายชนิด เช่น *Pseudomonas L. monocytogenes* และ *C. jejuni*

มีการรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ *C. jejuni* ในไก่และสัตว์ปีกอื่นๆ ในประเทศญี่ปุ่นพบว่า *C. jejuni* ปนเปื้อนในเนื้อไก่สดจากร้านซูเปอร์มาร์เก็ตมากถึงร้อยละ 45.8 แต่ไม่พบการปนเปื้อนในเนื้อวัวและเนื้อหมู เครื่องในไก่ที่ขายในประเทศได้หวั่นพบการปนเปื้อนของเชื้อ *C. jejuni* ร้อยละ 100 การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *C. jejuni* ในประเทศตะวันออกเฉียงใต้ยังพบว่ามียูเนียน้อยมากโดยเมื่อปี ค.ศ. 2001 คณะวิจัยชาวฟิลิปปินส์ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *C. jejuni* ในประเทศฟิลิปปินส์เป็นครั้งแรกโดยใช้วิธีดั้งเดิมคือการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Primer C442-C490 (specific for *C. jejuni*) การศึกษา Phage typing ของเชื้อ *C. jejuni* ที่ทำให้คนป่วยได้มาจากไก่และ วัว

สำหรับในเมืองไทยรายงานการพบเชื้อ *Campylobacter* ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2534 โดยการรายงานของ สุวณี สุกเดชย์และคณะ โดยการตรวจ *Campylobacter* ในกระเสเลือดของเด็กอายุต่ำกว่า 2 ขวบที่เข้าทำการรักษาที่ คณะสหเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ต่อมา ได้ทำการศึกษาเด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคท้องร่วง 631 ราย พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* จำนวน 93 ราย (15%) เมื่อวิเคราะห์หาสายพันธุ์พบว่า เป็นเชื้อ *C. jejuni* 62 ราย (10%) หรือ เท่ากับร้อยละ 67 ของ *Campylobacter* ส่วนของ *C. coli* พบ 14 ราย (2%) หรือร้อยละ 15 ของ *Campylobacter* ที่เหลืออีก 17 รายเป็น Atypical *Campylobacter* ที่สามารถทน ออกซิเจนได้ดี (aerotolerant) (จริยา สิ้นเดิมสุขและ สุวณี สุกเดชย์, 2543)

2.3.5 การแยกและการวินิจฉัย *Campylobacter*

อาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter* มีหลายชนิดดังนี้

1. Mueller Hinton agar ที่ผสมเลือดแกะ 5%
2. Brucella agar ที่ผสมเลือดแกะ 10%
3. Oxoid Blood agar ที่ผสมเลือดม้า 10%
4. Blood free charcoal base medium
5. Columbia agar with charcoal, haematin และ sodium pyruvate modified blood- free medium (CSM)

อาหารข้างต้นผสมยาปฏิชีวนะชนิด (Cefoperazone) จำนวน 32 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* และ *Enterobacteriaceae* แต่ถ้าใช้ยาชนิดนี้อย่างเดียวไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียรูปร่างกลมแกรมบวก และยีสต์ได้ แต่ถ้าใช้เชื้อปริมาณน้อยเพาะลงบน Skirrow's Medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทนความจำเพาะเจาะจงต่ำ บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C (คาร์บอนไดออกไซด์ 10% ออกซิเจน 5% ไนโตรเจน 85%) หรือในโถที่มี Gas-Pack บ่มที่ 24-48 ชั่วโมงหรือมากกว่า ถ้าบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 °C นานเกิน 2 วัน *Campylobacter* อาจมีรูปร่างกลมและ อาจตายได้ หากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C *C. jejuni* และ *C. coli* สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงจะเจริญได้ช้ามากอาจจะใช้เวลาบ่มถึง 3 วันซึ่งแบคทีเรียพวกนี้สามารถจำแนกออกจาก *Campylobacter* ได้ สายพันธุ์ที่ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้บางสายพันธุ์ของ *C. jejuni* และ *C. coli* ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 25 °C ถ้าไม่มี Gas-Pack อาจบ่มเชื้อ *Campylobacter* ไว้ในโถที่มีออกซิเจน 17% ถ้าใช้อาหาร Selective media ที่มียาปฏิชีวนะผสมอยู่ อาจบ่มเชื้อโดยใช้สิ่งตรวจเจริญใน Brucella broth รอให้เชื้อเจริญก่อนเทลงบนกระดาษกรอง (millipor filter) ขนาด 0.45 หรือ 0.65 ไมครอน วางบน Mueller Hinton agar (ที่มีเลือดแกะผสมอยู่) บ่มเชื้อ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นนำกระดาษกรองออก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 42 °C ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสม

2.3.6 ลักษณะการดำรงชีวิต (Survival Characteristic)

2.3.6.1 อิทธิพลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมการเจริญของ *C. jejuni* อยู่ในช่วง 42-45 °C และไม่เจริญที่ 48 °C โดยค่า D-value ของ *C. jejuni* ใน skim milk ที่ 48 °C อยู่ระหว่าง 7.2-12.8 นาที ส่วนที่ 55 °C อยู่ที่ 0.74-1.0 นาที ค่า D-value ของ *C. jejuni* ในนมวัว (whole cow's milk) สูงกว่าเล็กน้อย มีการศึกษาความไวของเชื้อ *C. jejuni* ต่อความร้อนที่พบว่า *C. jejuni* 10⁶ cell/ml ในน้ำนมดิบจะถูกยับยั้งที่ 60 °C ในเวลา 80 วินาที เช่นเดียวกันกับเมื่อใส่ *C. jejuni* จำนวน 10⁶ เซลล์ลงในน้ำนมที่ทำ cottage cheese ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Campylobacter spp.* ในผลิตภัณฑ์ที่ถูกให้ความร้อนที่ 55 °C เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้สภาพอากาศและสารอาหารที่เหมาะสม *C. jejuni* จะเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 °C หรือต่ำกว่า 45 °C *C. jejuni* ไม่เจริญในเนื้อสัตว์ดิบที่เก็บในสภาพปกติระหว่างอุณหภูมิ 32 และ 45 °C ที่ pH เป็นกลาง *C. jejuni* จะเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ในเวลาประมาณ 47 ชั่วโมงและหลังจากนั้นเริ่มลดจำนวนลง *C. jejuni* จะลดจำนวนลงเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 25 °C และจะลดลงอย่างรวดเร็วในอาหารที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมากกว่าที่เก็บที่ 4 °C มีรายงานว่า *Campylobacter* อยู่ได้ในเนื้อและเนือบดที่อุณหภูมิของการแช่เย็น (chilling อุณหภูมิ 1-10 °C) โดยมีการลดลงน้อยกว่า 1 log cycle ในเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ *C. jejuni* อยู่ได้ในเนือบดที่เก็บที่ 4 °C เมื่อมีการเติม Cary-Blair diluent ลงไปในตัวอย่างอาหาร

2.3.6.2 อิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์และ water activity

โซเดียมคลอไรด์มีผลต่อเชื้อ *C. jejuni* มีรายงานว่าโซเดียมคลอไรด์ 2% ใน Brucella broth สามารถฆ่าเชื้อ *Campylobacter* ได้เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 หรือ 35 °C การทนต่อโซเดียมคลอไรด์จะดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญสูงขึ้น มีผู้ศึกษาพบว่า *C. jejuni* สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 แต่ไม่เจริญที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 42 °C และอุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) *Campylobacter* ไวต่อโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 แต่อัตราการตายจะช้ากว่าที่อุณหภูมิ 25 °C โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ลดอัตราการเจริญหรือเพิ่มอัตราการตายขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมคลอไรด์ที่ฟื้นฟูสภาพเพื่อนับจำนวน *C. jejuni* คือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5

2.3.6.3 อิทธิพลของความเป็นกรดและพีเอช

มีรายงานว่าอัตราการยับยั้งของ *C. jejuni* ที่ pH 3.0-4.5 จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ pH เดียวกันเชื้อถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วที่ 42 °C แต่ที่อุณหภูมิ 25 °C มีอัตราปานกลางและช้าที่สุดที่ 4 °C ในห้องปฏิบัติการ *Campylobacter* เจริญได้ดีที่อาหาร pH 5.5-8.0 การเจริญที่เหมาะสมอยู่ในช่วง pH 6.5-7.5 ซึ่ง pH ต่ำที่สุดในการเจริญประมาณ 4.9 และ *C. jejuni* สามารถเจริญที่ 37 °C บนเนื้อที่มี pH สูง (6.4) แต่ไม่

สามารถเจริญได้ใน pH ปกติ (5.8) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าอัตราการตายที่ -1°C บนเนื้อที่ pH สูง จะช้ากว่าที่มี pH ปกติ

มีผู้ทดลองใช้กรดแลคติกและกรดอะซิติกเพื่อเป็นสารละลายซึ่งจะลดจำนวนของ *campylobacter* บน broiler โดยจุ่ม broiler halves ลงในสารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 0.5 หรือกรดแลคติกร้อยละ 0.5 ที่ อุณหภูมิ 50°C สามารถลดจำนวนของ *C. jejuni* ลงได้ 0.8 log cycle

2.3.6.4 อิทธิพลของบรรยากาศ

บรรยากาศที่เหมาะสมในการเจริญของ *C. jejuni* คือ ออกซิเจน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 10% ไนโตรเจน 85% นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ศึกษา modified atmosphere หรือการบรรจุแบบ สูญญากาศเพื่อดูการมีชีวิตของ *C. jejuni* พบว่าการมีชีวิตของ *C. jejuni* ในเนื้อสดแช่ตู้เย็น (4°C) จะ เหมือนกับ packaging treatment เนื้อถูกบรรจุแบบสูญญากาศหรือเก็บในบรรยากาศที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ 20% ไนโตรเจน 80% หรือ ออกซิเจน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 10% ไนโตรเจน 85% เช่นเดียวกับการรายงานการมีชีวิตของ *C. jejuni* ในซากไก่พบว่าไม่มีอิทธิพลจากการเก็บภายใต้ สภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์หรือสภาพปกติ

2.3.6.5 อิทธิพลของส่วนประกอบของอาหารยาม่าโรคและรังสี

พบว่าที่อุณหภูมิ 37°C เชื้อ *C. jejuni* เจริญในไข่แดงได้ดีกว่าไข่ทั้งฟองและจำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ *C. jejuni* ถูกเพาะลงในไข่ขาว พบว่าในอัลบูมินค่า D-value ของ *C. jejuni* ที่ 42°C เท่ากับ 2.4 ชั่วโมงและอัลบูมินจะยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อหลังจาก 6 ชั่วโมงที่ 42°C ส่วนประกอบของ conalbumin ของไข่ขาวพบว่าเป็นส่วนประกอบหลักของไข่ที่มีผลในการทำลาย *Campylobacter spp.*

C. jejuni ถูกยับยั้งได้โดย กรดแอสคอร์บิก 0.05% โดยผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของ L-ascorbic acid จะยับยั้งได้มากกว่าในรูปแบบที่ถูกรีดิวซ์ มีรายงานว่าเครื่องเทศเช่น ออริกาโน สะระแหน่และ กานพลู 0.5% ในอาหารเหลว จะยับยั้งการเจริญของ *C. jejuni* ที่ 42°C

ยาม่าเชื้อโรคหลายชนิดสามารถทำลาย *C. jejuni* ได้เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่ระดับ 1.25ppm สามารถยับยั้ง *C. jejuni* จำนวน 10^4 cell/ml ได้ภายใน 1 นาที และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5ppm ทำลาย *C. jejuni* จำนวน 10^7 cell/ml ภายใน 15 นาที ยาม่าเชื้ออื่นๆเช่น สารประกอบฟีนอล 0.15% ไอโอโด ฟอร์ 0.001% สารประกอบแอมโมเนียม 0.0002% 70% เอทานอล และกลูตาราลดีไฮด์ 0.125% สามารถ ทำลาย *C. jejuni* จำนวน 10^7 cell/ml ภายใน 1 นาทีได้ นอกจากนี้ 1ppm ของโมโนคลอรามินสามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. jejuni* ถึง 99% ภายในเวลา 15 นาที หลังจากสัมผัสกับเชื้อ

2.3.7 สัตว์ที่เป็นพาหะของโรค

Campylobacter หลายสายพันธุ์สามารถแยกได้จากสัตว์ ซึ่ง *C. hyointestinalis* และ *C. mucosalis* ทำให้เกิดลำไส้อักเสบในหมู่วัวและควายได้ ส่วน *C. jejuni* แยกเชื้อได้จากไก่คิบ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter spp.* ในไก่ที่สถานเลี้ยง 71.2% โดยการตรวจด้วยวิธีทางโมเลกุล และ 65.7% โดยวิธีการตรวจเชื้อ นอกจากนี้ยังพบการแพร่ของเชื้อ *Campylobacter spp.* ในโรงฆ่าสัตว์ 34.7% โดยวิธีการตรวจด้วยวิธีทางโมเลกุล และ 44.8% ด้วยวิธีการตรวจเชื้อ สัตว์ที่เป็นพาหะของโรคได้แก่

1) สัตว์เลี้ยง

C. jejuni อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์เลื้อยคืบหลายชนิด เช่น สุนัขและแมว มีรายงานหลายฉบับที่แสดงถึงการติดเชื้อ *C. jejuni* จากสุนัขและแมวที่เลี้ยงไว้ในบ้าน ถึงแม้ว่ายังไม่มีการรายงานถึงปัจจัยเสี่ยงทางระบาดวิทยาที่สัมพันธ์กับสัตว์เลี้ยงก็ตามเมื่อมีการติดเชื้อในคนแล้วสัตว์เลี้ยงเหล่านี้ อาจเป็นที่มาของ *C. jejuni* ได้

2) สัตว์เศรษฐกิจ

มีการรายงานครั้งแรกของการแยกเชื้อ *C. jejuni* จากเปิดไก่ที่เลี้ยงไว้โดยสามารถแยกเชื้อจากลำไส้จากเปิดไก่ serotype ที่แยกได้จากเปิดไก่ โดยมากเหมือนกับที่แยกได้ในคน ดังนั้นจึงสนับสนุนได้ว่าสัตว์เลี้ยงเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องทางระบาดวิทยา *Campylobacter* ยังพบได้ในลำไส้หมู ส่วนใหญ่เป็น *C. coli* ซึ่งบางครั้งอาจก่อโรคในคนได้ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่พบ โดยประมาณร้อยละ 32.9 ส่วน *C. jejuni* อยู่ที่ร้อยละ 3.4 ส่วนเนื้อวัว และนํ้านมวัวก็เป็นแหล่งของโรคได้เนื่องจากมี *C. jejuni* อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของวัว และ serotype ที่แยกได้ก็มีความสัมพันธ์กับการเกิดลำไส้อักเสบในคนด้วย

3) สัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยง

มีรายงานหลายฉบับที่แสดงว่า *C. jejuni* เป็น normal flora ในลำไส้ของนกป่าและนกน้ำโดยที่แหล่งของ *C. jejuni* เหล่านี้มีความสำคัญอย่างเด่นชัด เนื่องจากนกป่าอาจนำเชื้อลงไปในน้ำได้ซึ่งมีแหล่งอาหารของสัตว์ที่มนุษย์เลี้ยงไว้เป็นอาหาร นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Campylobacter spp.* ได้จากแมลงวันบ้านอาจเป็นได้ว่าแมลงวันบ้านอาจเป็นสาเหตุสำคัญในการแพร่เชื้อ *Campylobacter spp.* มาสู่คน

2.3.8 อาการของโรค

Campylobacter spp. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารแบบเฉียบพลัน (acute bacterial gastroenteritis) ปริมาณที่ก่อโรคคือ 400-500 เซลล์ อาการผิดปกติที่เกิดขึ้นกับผู้ที่บริโภคเชื้อชนิดนี้เกิดขึ้นกับระบบทางเดินอาหาร ระยะฟักตัว 2-11 วัน อาการที่พบส่วนใหญ่คือ ท้องเดิน คลื่นไส้ ปวด

หัว ปวดกล้ามเนื้อ มีไข้ ปวดท้องรุนแรง ถ่ายอุจจาระมาก อาการที่พบก่อนคือ อาการทางลำไส้ 12-24 ชั่วโมงอาจถ่ายเป็นเลือดและเป็นตะคริวที่ท้อง โดยอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 3-14 วัน โดยปกติอาการของโรคสามารถหายได้ภายใน 5-8 วัน โดยไม่ต้องใช้ยา

2.3.9 การป้องกันและการรักษา

เชื้อ *C. jejuni* เจริญได้ดีที่สภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจน 3-5% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2-10% การแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้น โดย *C. jejuni* ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิของการแช่แข็ง (-20 ถึง -5 °C) มีการศึกษาพบว่าเชื้อ *C. jejuni* มีปริมาณลดลงในเนื้อแช่แข็งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 1 นาที โดยค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อ *C. jejuni* สามารถเจริญได้คือที่ pH ประมาณ 4.9-5.0 หรือสูงกว่า (42 °C) โดย *Campylobacter* ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีปริมาณเกลือ 2.0%

การควบคุมและการป้องกันโรคทำได้โดยให้ความระมัดระวังในเรื่องอาหารและ เครื่องดื่ม โดยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อเข้าสู่อาหาร น้ำและ นม เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* อยู่ในลำไส้คนและ สัตว์การติดต่อของเชื้อจึงเกิดขึ้นจากการสัมผัสของคน หรือสัตว์และ สิ่งขับถ่าย จึงควรเพิ่มความระมัดระวังในการเตรียมอาหารและ ให้การสุขาภิบาลที่ดีในชุมชนด้วย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547)

2.3.10 การตรวจ *Campylobacter* ด้วยวิธีมาตรฐาน (Standard method) ในอาหารและน้ำ มีอยู่ด้วยกัน 5 วิธี ดังนี้

1) ISO (1995) methods

วิธี International Standards Organisation method (ISO10272:1995) เป็นวิธีที่เริ่มต้นด้วยการ pre-enrichment โดยใช้ Preston broth หรือ Park and Sander broth โดยบ่ม Preston broth ที่อุณหภูมิ 42 °C ภายใต้สภาวะ microaerophilic เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วน Park and Sander broth ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกัน ขั้นแรกเติม antibiotic นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ขั้นที่ 2 ย้ายมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะ microaerophilic เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนที่ 3 ย้ายมาบ่มที่ 42 °C ในสภาวะ microaerophilic เป็นเวลา 40-42 ชั่วโมงเมื่อ pre-enrichment แล้ว plating ลงบน selection enrichment เช่น Skirrow, CCDA, modified Butzler บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ในสภาวะ microaerophilic เลือกโคโลนีที่ต้องสงสัย 5 โคโลนียืนยันผลด้วยการตรวจสอบทางชีวเคมี

2) FDA (1998) methods

The Bacteriological Analytical Manual (BAM) ก่อตั้งโดย US Food and Drug นิยมใช้ในการแยกเชื้อ *Campylobacter* จากอาหารและน้ำ (FDA BAM, 1998) เช่น น้ำ สัตว์น้ำ นมและ ผลิตภัณฑ์ประเภทชีส (cheese) บ่มในสภาวะ microaerophilic ซึ่งอาจจะใช้ Gas-Pack โดยมี Bolton broth เป็น enrichment broth จากนั้นจึง plating ลงบน selective media เช่น Abeyta-Hunt-Bark หรือ CCDA ในสภาวะ microaerophilic ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3) UK methods

The UK Microbiological Safety of Food Funders Group โดยตรวจสอบและแยก *Campylobacter* ที่ปนเปื้อนในไก่ (raw chicken) โดยตรวจสอบการอยู่รอด (recovery) ของเชื้อโดยการ swab ลงใน Exeter broth ซึ่งเป็น enrichment medium ที่ UK Health Protection Agency for Analysis of Food and Water Sample ใช้กันตั้งแต่ปี ค.ศ. 2002 โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือบ่มที่อุณหภูมิ 41.4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น spread ลงบน mCCDA (Modified Campy blood-free-agar) บ่มที่สภาวะ microaerophilic ที่อุณหภูมิ 41.5 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4) Australian method

วิธีนี้ได้ใช้ Preston media และ enrichment broth ที่ประกอบด้วย sodium pyruvate, sodium metabisulphite และ ferrous sulphate (FBP) โดยบ่มที่สภาวะ aerobic อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อ pre-enrichment แล้วเติม Polymixin B 5000 IU/l rifampicin 10 mg/l และ cycloheximide 100 mg/l จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะ Skirrow agar ซึ่งเป็น selective enrichment และนำไปบ่มที่สภาวะ microaerophilic อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือก typical colony สังเกตจากโคโลนีสีเทา ขอบเรียบ มีความกว้าง 1-2 มิลลิเมตรและ streak ลงบน blood agar ซึ่งเป็น non-selective นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบทางชีวเคมี

5) New Zealand method

แนะนำให้ตัวอย่างวิเคราะห์ด้วย Exeter media บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 44 ชั่วโมง จากนั้น plate ลงบน (Exeter broth ผสมกับ agar 15 g/l) ซึ่งเป็นอาหาร selective media บ่มที่สภาวะ microaerophilic ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.4 แอนติบอดี (Antibody)

2.4.1 ชนิดและโครงสร้างของแอนติบอดี

แอนติบอดี (Antibody, Ab) ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของ γ -globulin และมีส่วนน้อยที่อยู่ในส่วนของ β -globulin ดังนั้นจึงเรียกแอนติบอดีว่า Immunoglobulin (Ig) อิมมูโนโกลบูลินเป็นสารพวก glycoprotein ประกอบด้วย polypeptide 82-96% และ carbohydrate 4-18% ชนิดและโครงสร้างของ Immunoglobulin แบ่งออกเป็น 5 class ตามชนิดของ heavy chain ดังนี้

IgG	มี heavy chain เป็นชนิด γ -chain (gamma)
IgM	มี heavy chain เป็นชนิด μ -chain (mu)
IgA	มี heavy chain เป็นชนิด α -chain (alpha)
IgD	มี heavy chain เป็นชนิด δ -chain (delta)
IgE	มี heavy chain เป็นชนิด ϵ -chain (epsilon)

H-chain แต่ละ class มีความแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล, การเรียงตัวของกรดอะมิโน, ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต, antigenic determinant และมีคุณสมบัติทางชีวภาพ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

แอนติบอดีมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย polypeptides 4 สาย คือสายที่ยาวและมีน้ำหนักโมเลกุลมาก เรียกว่า Heavy chain (H) ซึ่งมี 2 สายที่เหมือนกัน มีปลายทางด้าน amino acid (NH_2) เปลี่ยนแปลงได้มากเรียก variable region (V_H) ส่วนปลายด้าน carboxyl terminal เป็น amino acid ที่ค่อนข้างคงที่เรียก H-chain constant region (C_H) ทั้ง L-chain และ H-chain มี amino group ที่ไม่แน่นอนเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ จะเป็นส่วนของ Immunoglobulin ที่มีหน้าที่จับกับแอนติเจน (antigen combining site) จะเห็นว่าแต่ละโครงสร้างของ Immunoglobulin ที่มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานนี้ จะมี antigen binding site 2 แห่ง

Heavy chain และ Light chain ทั้ง 4 สายจะเชื่อมต่อกันด้วย interchain disulfide bonds ปลายข้างหนึ่งของสายจะเป็น amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจะเป็น carboxyl terminal ทั้ง 4 สายจะหันปลายข้าง $-\text{NH}_2$ หรือ $-\text{COOH}$ ไปทางเดียวกัน โมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลินมีรูปร่างคล้ายๆกับตัว T หรือ Y โดยมี hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยืดหยุ่น (flexible) ได้มากทำให้แขนทั้ง 2 ข้าง ยืดห่างออกจากกันทำให้จับกับแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น (วนิดา บริราช และคณะ, 2541)

2.4.2 ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (Antigen-Antibody reaction) (Mayer, 2004)

แอนติเจนและแอนติบอดีสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หลายอย่าง เช่น ช่วยในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งแอนติบอดีจะมีตำแหน่งที่สามารถยึดเกาะกับแอนติเจนได้ อย่างน้อย 2 ด้าน ส่วนแอนติเจนจะมีตำแหน่งที่สามารถเกาะกับแอนติบอดีได้หลายด้านหรือหลาย Epitope แรงจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Force Binding Antigen to Antibody) มี 4 แบบ ซึ่งทั้งหมดเป็นพันธะแบบ non – covalent bond คือ

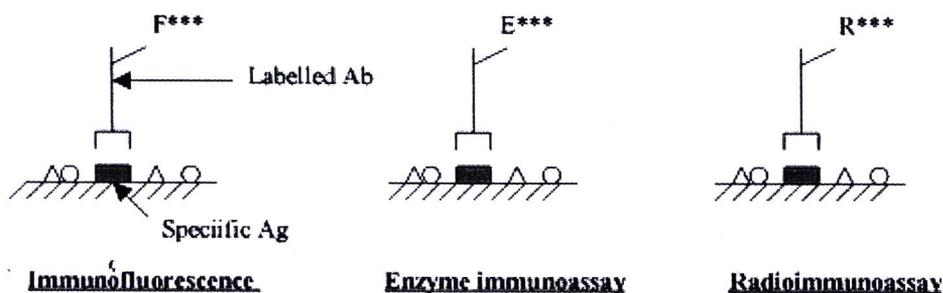
1. Electrostatic force เป็นแรงที่เกิดขึ้นเนื่องจากประจุที่ต่างกันระหว่าง แอนติเจนและแอนติบอดี
2. Hydrogen bonding force เป็นแรงที่เกิดขึ้นจากการจับกันระหว่าง Hydrophilic group เช่น $-OH, -NH_2, -COOH$ เป็นต้น แรงนี้ขึ้นกับความใกล้ชิดระหว่างโมเลกุลอย่างมาก
3. Hydrophobic force เป็นแรงที่เกิดจากการรวมตัวกันของสารพวก non-polar โดยจะนำส่วนที่เป็น hydrophobic group มารวมกัน
4. Van der Waals force เป็นแรงระหว่างโมเลกุลที่อยู่ใกล้ชิดกันระหว่าง external electron clouds เพื่อให้แรงดึงดูดของประจุอยู่ในสถานะสมดุล

นอกเหนือจากแรงทั้ง 4 ดังกล่าวแล้ว ลักษณะโครงสร้างของแอนติเจนและแอนติบอดี ก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้การจับกันมั่นคงยิ่งขึ้น ถ้าโครงสร้างของโมเลกุลของแอนติเจนและแอนติบอดีมีความสอดคล้องกัน (Complementary) เช่น ในลักษณะของแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key) การจับก็จะมั่นคงขึ้น และสภาวะแวดล้อมต่างๆ ก็มีผลต่อการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีด้วย ได้แก่

- 1) pH : แอนติเจนและแอนติบอดี จะทำปฏิกิริยากันได้ดีค่อนข้างดีที่ pH 7.2-7.4 ที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้มากจะเกิดปฏิกิริยากันได้ไม่ดี
- 2) อุณหภูมิ : อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี จะอยู่ในช่วง 4-40 C ที่อุณหภูมิสูงเกินไป แอนติเจนและแอนติบอดีอาจเสียสภาพได้ (denature)
- 3) Ionic strength : ความเข้มข้นของ ion มีผลต่อการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีด้วย ความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมคือ 0.15 M NaCl

2.4.3 สารช่วยแสดงผลปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถใช้สารละลายชนิดมาช่วยแสดงผลปฏิกิริยาได้ วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีความไวสูงมากในการตรวจหาแอนติเจน หรือแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจซึ่งมีอยู่หลายวิธี (รูปที่ 2.10) ได้แก่ Immunofluorescence, Radioimmunoassay และ Enzyme immunoassay



รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้สารช่วยแสดงผล (สุวิน ว่องวัจนะ, 2542)

2.4.3.1 วิธี Immunofluorescence

เป็นวิธีนำเอาสารเรืองแสงมาช่วยแสดงผลปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยการนำสารเรืองแสง เช่น สาร Fluorescein isothiocyanate (FITC) หรือ Rhodamine มาติดคลากกับแอนติบอดี เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจน จะสามารถตรวจหาแอนติเจนที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ซึ่งมีอยู่ 2 วิธี คือ Direct Immunofluorescence และ Indirect Immunofluorescence

โดยทั่วไปแล้วสารเรืองแสง สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นหนึ่ง เพื่อกระตุ้นให้อิเล็กตรอนเกิดการเคลื่อนที่ขึ้นไปยังระดับพลังงานสูงขึ้น และเมื่อกลับลงสู่ระดับพลังงานปกติจะทำให้เกิดการเปล่งแสงออกมา ซึ่งสาร fluorescence และ organic molecule ส่วนใหญ่มีความแตกต่างระหว่างความยาวคลื่นที่มีการกระตุ้น แลการปลดปล่อยแตกต่างกันประมาณ 25-50 nm เช่น fluorescence ความยาวคลื่นแตกต่างกันประมาณ 28nm แต่สาร organic chelate lanthanide เช่น europium มีความยาวคลื่นแตกต่างกันประมาณ 200 nm และสิ่งที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ระยะเวลาระหว่างการกระตุ้น และการหมดไปของการเรืองแสง เช่น lanthanide chelate มีระยะเวลาประมาณ 10^{-5} - 10^{-2} วินาที ซึ่งนานกว่า fluorescence (4.5×10^{-9} วินาที) แต่สารประกอบ fluorescence จะมีปริมาณ quantum yield (อัตราส่วนระหว่างพลังที่ดูดกลืนต่อพลังที่ปลดปล่อยออกมา) สูงกว่า (Goers, 1993)

2.4.3.2 วิธี Radioimmunoassay

เป็นวิธีนำเอารังสีมาช่วยแสดงผลปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เป็นวิธีที่มีความไวสูงในการตรวจหาระดับแอนติเจน วิธีนี้อาศัยการแย่งจับ (competitive binding) ระหว่างแอนติเจนที่ติดฉลากสารรังสี (radio-labelled antigen) และแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา กับแอนติบอดีจำเพาะ จำนวนจำกัด วิธีนี้สามารถทำได้ง่าย และสามารถนำไปใช้ในงานที่หลากหลาย แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือสารรังสีมีครึ่งชีวิตที่สั้น จึงเป็นข้อจำกัดในเรื่องของ shelf-life, เป็นอันตรายเมื่อมีการปลดปล่อยรังสีออกมา, ใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และมีข้อจำกัดในการตรวจสอบ เนื่องจากพลังงานของสารรังสีที่ปล่อยออกมาทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากเกิดความเสียหายได้ ซึ่งสารกัมมันตภาพรังสีส่วนใหญ่ที่ใช้คือ iodine ⁻¹²⁵ เนื่องจากมีความจำเพาะสูง และมีครึ่งชีวิตที่ยาวประมาณ 60 วัน (Gosling, 2000) วิธีนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ Classical RIA และ Solkid phase RIA

2.4.3.3 วิธี Enzyme immunoassay

เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์ช่วยแสดงผลปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์มาติดฉลากกับแอนติบอดีหรือแอนติเจน และตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ในขั้นสุดท้าย แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ Homogeneous EIAs และ Heterogeneous EIAs หรือ Enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA ซึ่งวิธีนี้ต้องนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีมาเคลือบติดกับผิววัสดุยึดเกาะ (solid phase) ก่อน เช่น เม็ดพลาสติก หลอดพลาสติก หรือไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) และเมื่อให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีอิสระ (ทั้งที่ไม่ได้ติดฉลากและติดฉลากเอนไซม์) ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา (free fraction) ออกจากส่วนที่ทำปฏิกิริยากันแล้ว (bound fraction) ที่ติดอยู่กับผิววัสดุยึดเกาะ แล้วจึงวัดการทำงานของเอนไซม์ในขั้นสุดท้าย วิธี ELISA ใช้ตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ แบ่งออกได้เป็น 3 วิธี คือ Indirect ELISA, Competitive ELISA และ Sandwich Elisa

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Valanne (2005) มีการพัฒนาวิธีการตรวจ choline acetyltransferase (ChAT) ที่เป็นเครื่องหมายของสารสื่อประสาทในสมอง โดยใช้ Goat anti-ChAT antibody เป็นตัวเชื่อมในการจับกับ biotin-streptavidin ที่ติดอยู่บนอนุภาคนาโนที่มีการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชัน ซึ่งวิธีนี้ให้ประสิทธิภาพสูงในการเป็นเครื่องมือสำหรับการสร้างภาพของระบบการส่งกระแสประสาท ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาโรค Alzheimer

Santra (2001) สังเคราะห์ Luminophore-doped silica nanoparticles โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ใช้ TEOS เป็นสารตั้งต้น ใช้สารเรืองแสง Rubpy อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 63 ± 4 nm ขนาดของอนุภาคมีความสม่ำเสมอ มีการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันที่พื้นผิวสำหรับติดแอนติบอดีของโรคลิวคีเมีย (leukemia) ที่ผิวของอนุภาคซิลิกา เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยโรคลิวคีเมีย โดยใช้เทคนิคการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจหาเซลล์ลิวคีเมียได้ง่าย ผลชัดเจนและมีประสิทธิภาพสูง

Zhao (2003) สังเคราะห์ Dye-doped silica nanoparticles โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและใช้ tetramethylrhodamine พบว่าอนุภาค dye-doped silica nanoparticles สามารถคงการเรืองแสงได้นาน 1200 วินาที ส่วน tetraethylrhodamine การเรืองแสงจะลดลง 85% ที่ระยะเวลาเท่ากันสามารถดัดแปลงหมู่ฟังก์ชัน เพื่อใช้แยกความแตกต่างของ mismatched DNA sequences ได้

Worthington (2002) มีการพัฒนาการสังเคราะห์ FITC-doped silicananoparticles ที่มีการติดฉลากด้วย antihuman liver cancer monoclonal antibody (HAB 18) สำหรับการตรวจหาเซลล์มะเร็งตับ ซึ่งวิธีการนี้มีความง่ายต่อการตรวจวัด มีความไวสูง และมีความสามารถในการตรวจตัวอย่างที่เป็นของผสมได้ดี

Ye (2004) ทำการสังเคราะห์ fluorescent europium (III) chealate-doped silica nanoparticles โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันซึ่งประกอบด้วย fluorescent Eu^{3+} เป็นสารเรืองแสง มีการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันและติดด้วย streptavidin เพื่อใช้ในการตรวจหา human hepatitis B surface antigen ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว มีความไวสูง และมีประสิทธิภาพดี

Zhao (2004) สังเคราะห์ Dye-doped silica nanoparticles สำหรับตรวจหา single bacteria มีการบรรจุสี Rubpy ไว้ภายในอนุภาค มีการดัดแปลงพื้นผิว และติดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *E.coli* O157:H7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถตรวจเชื้อ *E.coli* O157:H7 ได้ภายใน 20 นาทีในตัวอย่างเนื้อวัว และสามารถตรวจได้ปริมาณหลายๆตัวอย่างในเวลาเดียวกัน

Wang (2005) ทำการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน โดยใช้ organic dyes 3 สี คือ FITC, R6G และ ROX แทรกอยู่ในอนุภาคซิลิกา ทำการปรับอัตราส่วนของสีทั้งสาม เพื่อให้เปล่งสัญญาณสีที่แตกต่างกัน อนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นจะมีความเข้มของการเรืองแสงสูง สามารถคงการเรืองแสงได้นาน มีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกัน มีการตัดแปลงพื้นผิวให้มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเชื่อมต่อกับ Biotin มีความสามารถที่จำเพาะเจาะจงต่อการตรวจหาเชื้อเป้าหมาย สามารถใช้เป็น barcode tag ในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดในเวลาเดียวกันได้

Zhao (2007) มีการพัฒนาอนุภาคซิลิกานาโนที่บรรจุสีฟลูออเรสเซนต์ Methylene blue ที่ให้แสงใกล้ช่วงคลื่นอินฟราเรด อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นมีการปรับปรุงให้มีความเสถียรของการเกิดซีดจางอย่างมากต่อการถูกออกซิไดซ์ด้วยแสง มีการตัดแปลงหมู่ฟังก์ชันและติด monoclonal anti-alpha fetoprotein antibody (AFP) สำหรับการตรวจหาเซลล์มะเร็ง ซึ่งการตรวจวัดนี้มีความจำเพาะอย่างมากและเกิดสัญญาณรบกวนน้อยในช่วงใกล้คลื่นอินฟราเรดจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีการพัฒนาสำหรับการตรวจวัด โดยตรงกับตัวอย่างเลือดทั้งหมด