



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การประดิษฐ์อุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบใช้แล้วทิ้ง สำหรับการวิเคราะห์สารต้านจุลชีพบางชนิดโดยการตรวจวัดการเปล่งแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ชนิดเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า

Fabrication of Disposable Mesofluidic Devices for the Determination of Selected Antibiotics via Electrogenenerated Chemiluminescence Detection

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2558

จำนวน 236,300 บาท

หัวหน้าโครงการ

ศักดิ์ชัย เสถียรพิระกุล

ผู้ร่วมโครงการ

ธานินทร์ แดงกวารัมย์

มานิชย์ อนุวัฒน์



งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30/ก.ย./2559

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การประดิษฐ์อุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบใช้แล้วทิ้ง สำหรับการวิเคราะห์สารต้านจุลชีพบางชนิดโดยการตรวจวัดการเปล่งแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ชนิดเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า (Fabrication of Disposable Mesofluidic Devices for the Determination of Selected Antibiotics via Electrogenated Chemiluminescence Detection) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่การสนับสนุนอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ อุปกรณ์และสถานที่ ตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บุคลากร สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อำนวยความสะดวกทางด้านอุปกรณ์และสารเคมี รวมทั้งช่วยประสานงานในด้านเอกสารงานราชการ ในการติดต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการทำงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	๗
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
การตรวจเอกสาร	10
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	15
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	21
สรุปผลการวิจัย	35
เอกสารอ้างอิง	36

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	15
ตารางที่ 2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	16
ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบตรวจวัดแบบ univariate และ simplex	30
ตารางที่ 4 ผลการศึกษาคุณลักษณะของการวิเคราะห์	32
ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดสารฟูราลทาโคนในอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ และ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	34
ตารางที่ 6 ผลการศึกษาร้อยละการกลับคืน (% recoveries) ของสารกลุ่มไนโตรฟูราน	34

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ตัวอย่างของไมโครฟลูอิดิกส์ ที่มีการใช้งาน	6
รูปที่ 2 ตัวอย่าง paper base microfluidic ที่ใช้ในการวิเคราะห์	7
รูปที่ 3 การออกแบบ microflow channel สำหรับวิเคราะห์ฟอสเฟต	11
รูปที่ 4 การออกแบบใช้งาน microflow channel สำหรับวิเคราะห์ nicotinamide adenine dinucleotide	11
รูปที่ 5 การออกแบบใช้งาน meso-fluidics channel สำหรับวิเคราะห์	17
รูปที่ 6 การทดสอบอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์เหล็ก	18
รูปที่ 7 การตรวจหาความเข้มข้นของสีในแผ่นมีโซฟลูอิดิกส์ ด้วยโปรแกรมโฟโตชอปปัส	18
รูปที่ 8 แผนผังการสังเคราะห์สารประกอบ tris(2, 2'-bipyridyl)ruthenium (II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)	19
รูปที่ 9 ลวดลายแผ่นสกรีนบนกระดาษโรมาโทกราฟี ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร	21
รูปที่ 10 การออกแบบลวดลายแผ่นสกรีน	22
รูปที่ 11 รูปภาพแสดงการเกิดสียบนแผ่นอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบกระดาษที่ใช้ใน การทดสอบปริมาณไอออนเหล็กด้วยไรโอโซยานต	23
รูปที่ 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเปลี่ยนแปลงสี (RGB) กับความเข้มข้นของ Fe^{3+}	23
รูปที่ 13 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารประกอบ tris(2,2' bipyridyl) rhuthenium(III)	25
รูปที่ 14 ชุดเครื่องมือสำหรับตรวจวัดไนโตรฟูรานด้วยเทคนิคอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนส์	26
รูปที่ 15 ค่าสัญญาณแสงจากปฏิกิริยาอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนส์	27
รูปที่ 16 กลไกการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนส์ของ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{QDs ECL/Nitrofur}$	28
รูปที่ 17 ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของระบบตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูรานแบบ univariate	31

การประดิษฐ์อุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบใช้แล้วทิ้ง สำหรับการวิเคราะห์สารต้านจุลชีพ
บางชนิดโดยการตรวจวัดการเปล่งแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ชนิดเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า

Fabrication of Disposable Mesofluidic Devices for the Determination of Selected Antibiotics via Electrogenenerated Chemiluminescence Detection

ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล ธาณินทร์ แทงควารัมย์ และ มาโนชญ์ ธนอมวัฒน์

Sakchai Satienperakul Tanin Tangkuaram and Manoch Thanomwat

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, ChiangMai

บทคัดย่อ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไนโตรพิวราน ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ (ECL) จากปฏิกิริยาของ ทริส(2,2'-ไบไพริดีล)รูทีเนียม(II) และ แอล-ซิสเตอีน-ควอนตัมดอท โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์แอล-ซิสเตอีน-ควอนตัมดอท และได้เติมลงไปในสารละลายของ ทริส(2,2'-ไบไพริดีล)รูทีเนียม(II) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +0.4 - +1.6 โวลต์ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่า ที่ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 1.1 โวลต์ จะเกิดออกซิเดชันฟิค พร้อมกับเกิดการคายแสงออกมา ซึ่งสามารถวัดแสงดังกล่าวด้วยหลอดขยายสัญญาณแสง ที่ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 850 โวลต์ ปริมาณแสงที่เพิ่มขึ้นเกิดการจากการถ่ายโอนพลังงานของแอล-ซิสเตอีน-ควอนตัมดอท เติมลงไป โดยพบว่าเมื่อมีสารกลุ่ม ไนโตรพิวราน ปริมาณแสงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวมีค่าลดลง ซึ่งอาจเกิดจากระบวนการยับยั้งในปฏิกิริยาอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวจะทำให้สามารถทำการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรพิวรานได้ในช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10×10^{-6} - 100×10^{-6} โมลาร์ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด ฟูลธาโดน (FTD) ฟูลซาโรโดน (FZD) และ ไนโตรฟูราโทอิน (NFT) มีค่าเท่ากับ 0.40, 0.73 และ 0.60 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับวิธีการดังกล่าวนี้สามารถนำไปตรวจหาปริมาณสารตกค้างกลุ่มไนโตรพิวราน ในตัวอย่างของอาหารสัตว์ได้ และจะได้เพื่อพัฒนาอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์ที่สร้างขึ้นบนกระดาษ โดยใช้เครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ท และอัลคิลลิโดนไดเมออร์เป็นหมึกพิมพ์ลงบนกระดาษ สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ในภาคสนามแบบใช้แล้วทิ้งต่อไป

คำสำคัญ: อุปกรณ์ มีโซฟลูอิดิกส์ เคมีลูมิเนสเซนซ์ สารต้านจุลชีพ

ABSTRACT

A new approach to enhance the electrogenerated chemiluminescence (ECL) of the tris (2, 2'-bipyridyl)ruthenium (II)(Ru(bpy)₃²⁺) system was proposed using resonance energy transfer with L-cysteine-capped cadmium telluride quantum dots (CdTe-QDs) in aqueous solution. The oxidative peak signal of Ru(bpy)₃²⁺ occurred at a voltage of 1.10 V, when the potential was cycled between 0.4 and 1.6 V using cyclic voltammetry with a carbon screen-printed electrode (SPEC) in a 0.11 M phosphate buffer at pH 7.50. The L-cysteine-capped cadmium telluride quantum dots (CdTe-QDs) were synthesized and added into the solution of Ru(bpy)₃²⁺ to magnify the ECL sensor. The ECL emission signal was measured by a red-sensitive photomultiplier tube set at a constant potential of 850 V. The extreme enhancement of the ECL intensity was achieved via the energy transfer by the L-cysteine-capped CdTe-QDs. It was found that the induced ECL from the Ru(bpy)₃²⁺ CdTe-QDs system was inhibited by the presence of selected nitrofurans. This quenching effect of nitrofuran antibiotics on the anodic ECL of Ru(bpy)₃²⁺ CdTe-QDs was found to be selective and concentration dependent and was observed to have a linear relationship over the concentration range 10-100×10⁻⁶ M. The detection limits were found to be 0.40, 0.73 and 0.60 μM for furaltadone (FTD), furazolidone (FZD) and nitrofurantoin (NFT). In addition, the proposed ECL method was successfully applied to detect the total residuals of selected nitrofuran residues in animal feed samples with satisfactory results. Furthermore, paper-based microfluidic devices for the determination of selected contaminant is being developed. The mesofluidics platform was printed by inkjet printer to create hydrophobic channels in Whatman chromatographic paper using an alkyl ketone dimer (AKD) as a hydrophobic ink. This technique will be further applied as a disposable field-trip devices.

Keyword: mesofluidics device, chemiluminescence, antibiotics

คำนำ

ปัจจุบันวิทยาศาสตร์มีความก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้มีการศึกษาหรือทำการวิจัยในแต่ละสาขาวิชาต่างๆ รวมถึงพัฒนากระบวนการวิเคราะห์ทางด้านเคมี ที่มีบทบาทความสำคัญทางด้านการเกษตร อาหาร ยา วัคซีน เป็นต้น เนื่องด้วยเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ในปัจจุบันบางเทคนิคต้องใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ เพื่อให้สามารถตรวจวัดได้ในปริมาณที่ต่ำๆ โดยปราศจากการรบกวน อีกทั้งเครื่องมือที่ทำการวิเคราะห์มีราคาสูง ทำให้ไม่คุ้มกับการทดลองในแต่ละครั้ง ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีที่สะอาด (green analytical chemistry) หรือพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาถูก มีการลดใช้สารตัวอย่างและสารเคมีปริมาณน้อย และสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในระดับที่มีความเข้มข้นน้อยๆ ซึ่งผลิตจากวัสดุที่หาได้ง่ายมีราคาถูก สามารถใช้แล้วทิ้งได้ เพื่อลดความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

เนื่องจากปัญหาการปนเปื้อนของสารเคมี หรือการตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร ที่เกิดจากกิจกรรมทางการเกษตร ซึ่งในบางครั้งก็เกิดจากการปนเปื้อนจากการใช้สารเคมีที่ใช้เพื่อรักษาผลผลิตทางการเกษตร กระบวนการเก็บถนอมรักษาอาหาร หรือการเลี้ยงสัตว์ การปศุสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเก็บฟาร์มหรือพื้นที่เกษตรกรรมขนาดใหญ่ เนื่องจากเกษตรกรมีความจำเป็นที่จะต้องควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อโรคต่าง ๆ ทำให้ปัญหาการใช้สารต้านจุลชีพ (antimicrobial compounds) หรือยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เพื่อทำลาย หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพต่างๆ ในการเกษตร (มาลินี ลิ้มโกคา, 2540) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนและตกค้างมายังผู้บริโภค และส่งผลให้ผลผลิตทางการเกษตรของเกษตรกรไทย และต้องมีการตรวจสอบอย่างเข้มงวด เนื่องจากหากตรวจพบในผลิตภัณฑ์อาหารส่งออก จะทำให้เกิดการส่งคืนสินค้า และการกีดกันทางการค้าของประเทศผู้นำเข้าในเวลาต่อมา โดยเฉพาะกับกลุ่มสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา และ ญี่ปุ่น ที่มีความเข้มงวดต่อคุณภาพของอาหารที่นำเข้าเป็นอย่างมาก

อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งในเขตภาคเหนือตอนบน ประสบปัญหาในเรื่องของสารตกค้างของยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ไนโตรฟูราน (nitrofurans) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) และเตตราซัยคลิน (tetracycline) เนื่องจากคลอแรมเฟนิคอลและไนโตรฟูรานเป็นยาต้านแบคทีเรียในกลุ่มออกฤทธิ์แบบกว้าง คือสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและลบ สามารถป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย และฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงผึ้ง เกษตรกรจึงนิยมใช้ในการรักษาโรคที่เกิดเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย โดยมาตรฐานควบคุมกำหนดไว้ว่าควรมีปริมาณคลอแรมเฟนิคอลไม่เกิน 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ไนโตรฟูรานต้องไม่พบปนเปื้อน และเตตราซัยคลินไม่เกิน 25

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แต่เนื่องจากยาปฏิชีวนะที่ตกค้างอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคโดยอาจก่อให้เกิดโรคโลหิตจาง ชนิดที่เรียกว่า aplastic anaemia ซึ่งยังไม่มีวิธีรักษา และมีโอกาสเสียชีวิตได้ นอกจากนั้นยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย สำหรับเตตราซัยคลินเป็นยาต้านแบคทีเรียเช่นเดียวกับคลอแรมเฟนิคอล ข้อห้ามของเตตราซัยคลินคือ ห้ามเด็กอายุต่ำกว่า 8 ขวบ และสตรีตั้งครรภ์ใช้ ดังนั้นถ้าหากมีการนำน้ำผึ้งมียาต้านจุลชีพตกค้างในปริมาณมากไปบริโภค หรือนำไปผสมในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น อาหารเข้าสำเร็จรูป ขนมปัง หรือโดยเฉพะนมสำหรับเด็ก อาจได้รับสารดังกล่าวซึ่งจะเป็นอันตรายโดยตรง (Barbosa และคณะ, 2007) ทำให้ต้องมีการตรวจสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะเหล่านี้ในอาหารส่งออกไปยังญี่ปุ่นและประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนในอาหารสัตว์ และตกค้างในรูปของเมตาบอไลต์ ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เนื่องจากสารตกค้างดังกล่าวมีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค ส่งผลให้เกิดการดื้อยาในกรณีที่ผู้บริโภคได้รับยาในปริมาณมาก และติดต่อกันเป็นเวลานาน

โดยวิธีที่ตรวจวัดที่นิยมใช้ในปัจจุบันจะอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว และแมสสเปกโตรเมตรี โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการยืนยันถึงชนิดของสารและปริมาณ เพราะมีความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณเล็กน้อยได้อย่างแม่นยำ และใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Draisci และคณะ 1997, Verdon และคณะ 2007) อย่างไรก็ตามการใช้เครื่อง GC-MS หรือ LC-MS มีค่าใช้จ่ายสูงในการวิเคราะห์ และใช้เวลานาน ดังนั้นในปัจจุบัน นักวิจัยมีความพยายามในการสร้างอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ให้เป็นอุปกรณ์วิเคราะห์แบบพกพาที่มีราคาไม่แพง จากวัสดุราคาถูกสามารถใช้แล้วทิ้งได้เลยเช่นกระดาษ ซึ่งเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องตรวจวัดที่มีสภาพไวสูง และมีความจำเพาะเจาะจงสูง อย่างเช่นการตรวจวัดด้วยเคมีไฟฟ้า (electrochemical analysis) (Richer, 2004) การตรวจวัดการเรืองแสงด้วยปฏิกิริยาเคมี หรือการเหนี่ยวนำโดยอาศัยปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมี ให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถตรวจวัดด้วยวิธีทางโฟโตเคมีลูมิเนสเซนซ์ (photo-chemiluminescence) (Gracia-Campana, 2001) จะสามารถช่วยให้การวิเคราะห์ทดสอบทำได้มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว มีสภาพไวของการวิเคราะห์สูง และมีขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดี

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้การประยุกต์ใช้ระบบปฏิบัติการขนาดจิ๋ว ซึ่งได้รับความนิยมอย่างสูงในวงการนักวิทยาศาสตร์ที่มีแนวทางการวิจัยพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีขนาดกะทัดรัด และมีราคาไม่สูงมากนัก โดยมีรายงานวิจัยหลายฉบับ ในช่วงระยะเวลา 4-5 ปีที่ผ่านมาที่ใช้ระบบปฏิบัติการขนาดจิ๋ว ในการวิเคราะห์ตรวจสอบสารปนเปื้อนและสารมลพิษต่างๆ ทั้งในทางสิ่งแวดล้อม อาหารและยา รวมถึงตัวอย่างทางชีวภาพและเภสัชกรรม ซึ่งพบว่าได้เป็นผลสำเร็จที่น่าพอใจ

มีโซ-ไมโครฟลูอิดิกส์ (Meso-microfluidics) (Johnson และคณะ, 2012, Chilling และคณะ, 2012) คือวิทยาการใหม่ที่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของการศึกษาและประยุกต์ใช้งานระบบการจัดการของไหล (fluid) เช่น ของเหลว หรือ ก๊าซ ที่มีปริมาณน้อยมาก (ต่ำกว่า 0.001 ไมโครลิตร) ที่ไหลผ่านร่องหรือท่อที่มีความกว้าง 0.1-100 ไมโครเมตร ท่อที่เล็กมากซึ่งเป็นโครงข่ายลำเลียงการไหลของอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ (microfluidic device) หรือเรียกอีกชื่อว่า Lab-on-a-chip (LOC) โดยถูกสร้างขึ้นด้วย micro-fabrication techniques ในช่วงเริ่มต้นของการพัฒนาอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ถูกสร้างขึ้นจากวัสดุฐานรองเช่นซิลิกอนและแก้วด้วยวิธีการสร้างลายวงจรด้วยแสง (photolithography) และแกะสลัก (etching) ซึ่งดัดแปลงมาจากอุตสาหกรรมการออกแบบและพัฒนาวงจรไฟฟ้าขนาดเล็ก (microelectronic industry) แต่กระบวนการผลิตมีราคาสูงและไม่ยืดหยุ่นจึงเป็นแรงผลักดันให้ปัจจุบันนักวิจัยส่วนใหญ่หันมาสนใจสร้างและพัฒนาอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ในพอลิเมอร์แทนเนื่องจากใช้เวลาในการผลิตน้อย มีคุณสมบัติ biocompatibility อีกทั้งยังมีราคาถูกจึงสามารถใช้ ครั้งเดียวแล้วทิ้งได้ ด้วยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี soft lithography ที่อยู่บนรากฐานของการพิมพ์แบบ (printing) และหล่อแบบ (molding) จากแม่แบบต่างๆ โดยที่แม่แบบสามารถสร้างได้จากเทคนิคต่างๆนอกเหนือจากเทคนิค photolithography เช่น electron beam lithography, x-ray lithography หรือ ion beam lithography เป็นต้น วิทยาการไมโครฟลูอิดิกส์เริ่มรุ่งเรืองขึ้นเมื่อประมาณปี พ.ศ.2530 ปัจจุบันกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากมหาวิทยาลัยชั้นนำของโลกหลายแห่งมีศูนย์วิจัยด้านไมโครฟลูอิดิกส์ที่กำลังก้าวรุดหน้าอย่างรวดเร็วเช่น Folch Lab ของ University of Washington และ The Whitesides Research Group ของ Harvard University ประเทศสหรัฐอเมริกา หรือ Microfluidics Research Group ของ Max Plank Institute-DS ประเทศเยอรมนี เป็นต้น และที่อยู่ใกล้ประเทศไทยก็คือศูนย์วิจัย Center for Ion Beam Applications (CIBA) ของ National University of Singapore (NUS) ประเทศสิงคโปร์ซึ่งได้กลายเป็นศูนย์วิจัยชั้นนำแห่งหนึ่งของโลก

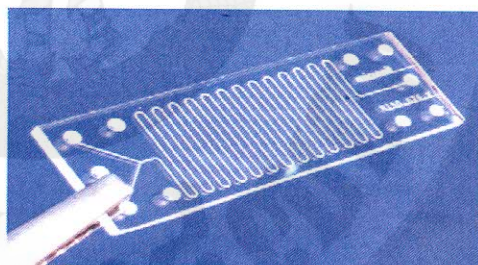
การใช้อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ในห้องปฏิบัติการวิจัยต่างๆ เพิ่มขึ้นแต่ยังไม่เห็นชัดว่ามีการนำมาใช้กันแบบทั่วๆ ไปเพราะยังคงมีปัญหาสำหรับการผลิตเชิงอุตสาหกรรม เช่น พอลิเมอร์ PDMS ที่นิยมใช้เป็นวัสดุหลักในปัจจุบันก็ใช้ได้กับของเหลวเพียงบางชนิดแต่ซิลิกอนหรือแก้วที่มีความทนทานต่อสารละลายมากกว่า ก็เป็นวัสดุที่มีขั้นตอนการทำออกมาเป็นระบบไมโครฟลูอิดิกส์ที่ยุ่งยากและมีต้นทุนสูงกว่า การค้นคว้าวิจัยจึงยังต้องดำเนินการควบคู่กันไป แต่เพราะมีการคาดการณ์ไว้ว่า microfluidic technology จะมีตลาดในกลุ่มอุตสาหกรรมวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่มีอนาคตที่น่าสนใจผลิตภัณฑ์ที่อาศัยประโยชน์จากวิทยาการไมโครฟลูอิดิกส์จึงได้เริ่มทยอยออกสู่

ตลาด เช่น เครื่องมือตรวจสอบการแสดงออกของยีนส์ (DNA Microarrays) ที่มีชื่อทางการค้าว่า Gene Chip ผลิตโดยบริษัท Affymetrix ที่เมือง Santa Clara มลรัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา เป็นต้น

ตัวอย่างงานวิจัยของ Laitip และคณะ (2011) Sattrupinat และคณะ (2011) และงานวิจัยของ Wang และ คณะ (2010) ได้มีการประยุกต์ใช้วิทยาการไมโครฟลูอิดิกส์ ร่วมกับเทคนิคเคมีลูมิเนสเซนซ์ ทำให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและว่องไวสูง ซึ่งในอนาคตระบบนี้จะเป็นที่น่าสนใจและนิยมใช้กันในด้านการศึกษา นอกจากนี้ระบบโฟลอินเจกชันเคมีลูมิเนสเซนซ์ยังทำได้ง่ายปัจจัยสำหรับการวัดด้วยเคมีลูมิเนสเซนซ์ เช่น การผสมของสารละลายรีเอเจนต์และเซลล์การตรวจวัด ในการออกแบบโฟลเซลล์สำหรับการตรวจวัดเคมีลูมิเนสเซนซ์ ดังแสดงในรูป 2 การนำกระแสรีเอเจนต์ไหลผ่านเข้ามายังส่วนเซลล์ตรวจวัดจะต้องมีอย่างน้อยสองช่องทางที่ให้สารเคมีไหลผ่าน คือ ช่องตัวอย่างและกระแสรีเอเจนต์ ซึ่งสารละลายรีเอเจนต์ต้องมีการผสมกันอย่างดีเพื่อให้มีการเปล่งแสงได้มากที่สุด แล้ววัดแสงที่เกิดขึ้นด้วยหลอดวัดแสง (PMT) สารละลายรีเอเจนต์จะผสมกันบริเวณเซลล์ตรวจวัด ในระบบโฟลอินเจกชันเคมีลูมิเนสเซนซ์จำนวนมากจะใช้เซลล์การตรวจวัดแบบก้นหอย ซึ่งให้ผลการทดลองที่น่าพอใจ โดยของเหลวจะไหลผ่านช่องที่เจาะไว้ไปตามผิวหน้าที่เรียบราบอย่างเหมาะสม สารละลายรีเอเจนต์จะผสมและไหลผ่านตัวตรวจวัดในลักษณะเป็นวงกลม



ก

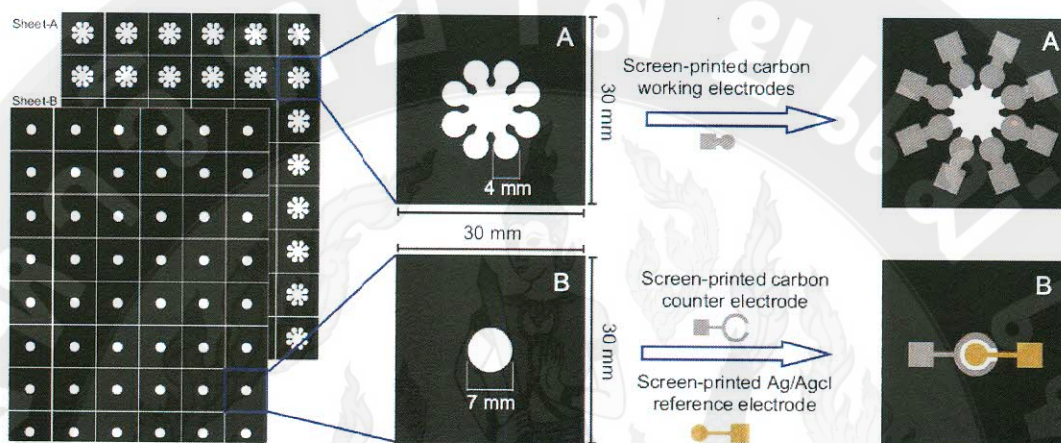


ข

รูปที่ 1 ตัวอย่างของไมโครฟลูอิดิกส์ ที่มีการใช้งาน ก) แบบก้นหอย , ข) แบบเหลี่ยม

ในปัจจุบันนี้ได้มีการออกแบบกระดาดและสร้างแนว การไหลของสารละลายบนแผ่นกระดาดที่เรียกว่า paper based microfluidic devices (PADs) เพื่อให้ตัวอย่างที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีทิศทางไหลที่ถูกต้องและคงที่ นักวิจัยได้ คัดแปลงน้ำหมึกเครื่องพิมพ์เพื่อให้มีสมบัติที่เหมาะสม คือ ไม่มีขั้วหรือมีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และ พิมพ์รูปแบบแนวการไหลของ

สารละลายลงบนกระดาษ เพื่อให้อุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง อุปกรณ์ตรวจวัดแบบใช้แล้วทิ้งด้วยกระดาษเป็นอุปกรณ์ที่คิดค้นขึ้นมาใหม่ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะอุปกรณ์นี้มีการจัดทำงานง่าย ต้นทุนต่ำ และสามารถพกพาได้ วิธีนี้เป็นการรวมเอาเทคนิค digital ink-jet printing มาใช้ โดยใช้ไขเคลือบลงช่องบนกระดาษ ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ ที่สนใจได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Ge และคณะ. (2012) ดังแสดงในรูปที่ 2 เป็นต้น



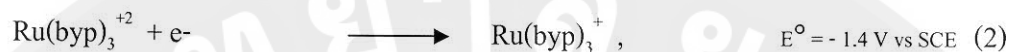
รูปที่ 2 ตัวอย่าง paper base microfluidic ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ประโยชน์ของไมโครฟลูอิดิกส์มีข้อดีหลายประการคือ

1. สอดคล้องกับพัฒนาการของโลกที่มุ่งสู่อุปกรณ์ต่างๆ ที่มีขนาดเล็กลงๆ (miniaturization)
2. เป็นอุปกรณ์วิเคราะห์แบบพกพาที่มีราคาไม่แพง สามารถใช้แล้วทิ้งได้โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองเรื่องการทำความสะดวกเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่
3. ใช้ปริมาณสารที่เกี่ยวข้องในระดับต่ำมากจึงไม่สิ้นเปลืองในกรณีที่ต้องใช้สารเคมีราคาแพง และเมื่อใช้สารเคมีน้อยจึงควบคุมปริมาณได้อย่างแม่นยำและใช้เวลาสั้นด้วยเนื่องจากกระบวนการจะเกิดขึ้นเร็วกว่า
4. ขนาดที่เล็กมากของระบบไมโครฟลูอิดิกส์จึงไม่สิ้นเปลืองพลังงาน
5. มีโอกาสที่จะนำไปทำเป็นระบบอัตโนมัติได้สูงสามารถลดขั้นตอนที่ต้องเกี่ยวข้องกับมนุษย์ มีศักยภาพที่จะเป็น real-time analysis ที่สามารถควบคุมได้จากระยะไกล (remote sensing)

อิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ (Electrochemiluminescence/ECL) (พิเศษ นามจันทรา, 2554) คือปรากฏการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการปล่อยคลื่นแสงแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ประเภทหนึ่งซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานภายในของสารผลิตภัณฑ์ซึ่งเกิดการ

electron transfer ทำให้อยู่ในสภาวะเร้า (excited state) ซึ่งเมื่อกลับคืนมาสู่สภาวะพื้น (ground state) ก็จะมีการเปล่งคลื่นแสงออกมาเรียกคลื่นแสงนี้ว่า อิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ เช่น การเกิดอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ของ $\text{Ru}(\text{byp})_3^{+2}$ ดังสมการ



หลักการวิเคราะห์แบบอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ โดยทั่วไปแล้วจะอาศัยการก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สามารถปลดปล่อยพลังงานที่มีความเข้มข้นสูงออกมาอย่างต่อเนื่องในระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งปฏิกิริยานี้จะทำให้สามารถศึกษาหรือวัดค่าความเข้มของแสงที่ปลดปล่อยออกมาได้โดยอาศัยเครื่องมือหรือวิธีการง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน โดยจะสามารถวัดค่าความเข้มของแสงได้ด้วยหลอดวัดแสง (photomultiplier tube, PMT) ส่วนประกอบที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์ในระบบที่มีการไหลแบบต่อเนื่องของเคมีลูมิเนสเซนซ์ คือ ส่วนผสม (reagen mixing chamber) เซลล์ (flow cell) เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (photo detector หรือ photomultiplier tube)

การนำเอาเทคนิคของมีโซ/ไมโครฟลูอิดิกส์ ร่วมด้วยการตรวจวัดแบบอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ก่อให้เกิดผลดีเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากความไวของการตรวจวัดแบบอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ รวมทั้งเมื่อใช้เทคนิค มีโซ/ไมโครฟลูอิดิกส์ (meso/microfluidics) แล้วจะช่วยทำให้ใช้ปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในปริมาณที่น้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีความรวดเร็ว ส่งผลให้วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ในระดับ Ultra trace หรือ ความเข้มข้นระดับส่วนในพันล้านส่วน ได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อออกแบบและสร้าง เครื่องมือ สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารต้านจุลชีพบางชนิด ด้วยเทคนิคระบบปฏิบัติการขนาดจิ๋ว (mesofluidics) จากวัสดุราคาถูกสามารถใช้แล้วทิ้งได้เลยเช่นกระดาษ

2. เพื่อศึกษาและพัฒนา ตัวตรวจวัดที่มีสภาพไวสูงชนิดอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ (electrochemiluminescence) ร่วมกับการใช้อนุภาคนาโนควอนตัมดอท (quantum dots) ที่ช่วยเหนี่ยวนำหรือขยายสัญญาณทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์

3. เพื่อนำเครื่องมือที่พัฒนาขึ้น มาใช้ตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนสารต้านจุลชีพบางชนิดในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

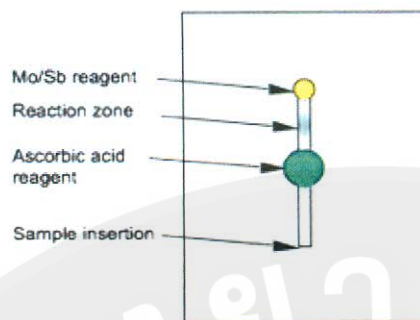
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถออกแบบและสร้าง เครื่องมือ สำหรับใช้การตรวจวิเคราะห์สารต้านจุลชีพบางชนิด ด้วยเทคนิคระบบปฏิบัติการขนาดจิ๋ว (mesofluidics) จากวัสดุราคาถูกสามารถใช้แล้วทิ้งได้เลยเช่นกระดาษ
2. สามารถพัฒนา ตัวตรวจวัดที่มีสภาพไวสูงชนิดอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์มีลูมิเนสเซนซ์ (electrochemiluminescence) ร่วมกับการใช้อนุภาคนาโนควอนตัมดอท (quantum dots) ที่ช่วยเหนี่ยวนำหรือขยายสัญญาณทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์
3. สามารถนำเครื่องมือที่พัฒนาขึ้น มาใช้ตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนสารต้านจุลชีพบางชนิดในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
4. สามารถนำเสนอผลงานทางวิชาการในที่ประชุมระดับชาติและระดับนานาชาติ
5. สามารถเผยแพร่ผลงานทางวิชาการในวารสารระดับชาติและระดับนานาชาติ

การตรวจเอกสาร

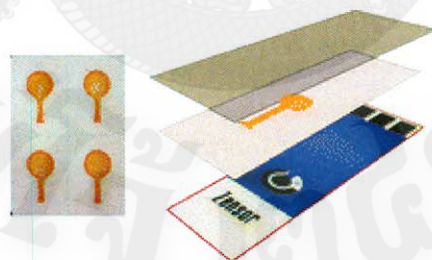
การวิจัยที่จะได้ศึกษาต่อไปในครั้งนี้ จะอาศัยการใช้เทคนิคการตรวจวัดแบบอิเล็กโตรเคมีคิมิเนนเซนส์ในการตรวจวิเคราะห์สารต้านจุลชีพกลุ่มไนโตรฟิวรานบางชนิด ที่อาจปนเปื้อนในอาหารสัตว์ หรือผลิตผลทางการเกษตร เช่นน้ำผึ้ง นมผึ้ง เกสรผึ้ง จากแหล่งผลิตบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดใกล้เคียง ซึ่งอาจตกค้างและส่งผลมาถึงผู้บริโภค โดยศึกษาบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนร่วมกับระบบปฏิบัติการขนาดจิ๋วที่ผลิตจากกระดาษกรอง เพื่อให้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และประหยัดสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา สามารถใช้แล้วทิ้งได้ ซึ่งปัจจุบันพบว่าการใช้งานแพร่หลายขึ้นอย่างมาก เนื่องจากเซลล์ลูโลสไฟเบอร์ในกระดาษ ทำหน้าที่เป็นช่องทางในการไหลของสารละลายที่มีตัวทำละลายเป็นน้ำ (hydrophilic pathway) โดยอาศัยแรงตึงผิวในการขับเคลื่อนสารละลาย การออกแบบและผลิตช่องทางเดิน (channel) ซึ่งเดิมในระยะเริ่มต้นของการศึกษาที่ผ่านมา จะใช้เทคนิคโฟโตลิโธกราฟี (photolithography) โดยอาศัยกระบวนการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยการจุ่มกระดาษลงในสารละลายด้านแสง (photoresist solution) การปิดช่องการส่องแสง (masking) โดยแม่พิมพ์ต้นแบบที่ออกแบบไว้ และนำไปส่องแสงเพื่อให้เกิดเป็นลวดลายที่ต้องการ (Matinez และคณะ, 2007) นอกจากนี้ในระยะหลังนักวิจัยได้พัฒนาเทคนิคใหม่ๆ มาใช้ผลิตช่องทางเดินในแผ่นกระดาษได้อีกหลากหลาย เช่นงานวิจัยของกลุ่มวิจัยด้านเคมีวิเคราะห์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้นำเอาเทคนิค wax dipping มาใช้ในการผลิต paper based microfluidics ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ เช่น โดปามีน (Rattanasat และคณะ, 2012) กลูโคส โปรตีน และโลหะหนักชนิดต่างๆ (Apilux และคณะ, 2012)

โดยงานวิจัยนี้ สนใจจะใช้เทคนิคการพิมพ์โดยใช้เครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ต โดยอาศัยหมึกพิมพ์ที่ทำจากวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic material) มาทำการพิมพ์บนกระดาษกรองโดยใช้ลวดลายที่ออกแบบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ทั่วไป เช่นงานวิจัยของ Jayawardanea และคณะ (2012) ที่ใช้หมึกพิมพ์ชนิด alkenyl ketene dimer (AKD) ที่ละลายในตัวทำละลาย n-heptane มาพิมพ์บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เพื่อใช้เป็นช่องทางสำหรับการวิเคราะห์ฟอสเฟตโดยวิธีโมลิบดีนัมบลู



รูปที่ 3 การออกแบบ microflow channel สำหรับวิเคราะห์ฟอสเฟต

ตัวอย่างงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งของ Delaney และคณะ (2011) ได้ทำการวิเคราะห์ nicotinamide adenine dinucleotide ด้วยเทคนิค paper-based microfluidic sensors โดยอาศัยหลักการของ อิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ ของรูธเนียมไบไพริดิไลสไว้บนแผ่นกระดาษ ที่ออกแบบช่องทางเดินของสารเคมีโดยใช้เทคนิคการพิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ท มาใช้งานร่วมกับขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน ทำให้สามารถวิเคราะห์สาร nicotinamide adenine dinucleotide ได้ต่ำสุดเท่ากับ 72 μM และสามารถพกพาเป็นอุปกรณ์ในภาคสนามได้ พร้อมทั้งต้นทุนในการวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำ โดยใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่ที่สามารถถ่ายภาพได้เป็นเครื่องมือตรวจวัด นอกจากนี้การใช้วัสดุกระดาษที่สามารถใช้แล้วทิ้งได้



รูปที่ 4 การออกแบบใช้งาน microflow channel สำหรับวิเคราะห์ nicotinamide adenine dinucleotide

เนื่องจากการปลดปล่อยพลังงานแสงจากปรากฏการณ์เคมีลูมิเนสเซนซ์ อาศัยปฏิกิริยาเคมีมีความจำเพาะของรีเอเจนต์บางชนิดกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้เกิดผลิตภัณฑ์ เมื่อคายแสงที่มีความเข้มสูงออกมาสามารถตรวจวัดด้วยเครื่องมืออย่างง่าย ๆ ที่มีเพียงหลอดวัดแสง (photomultiplier tube) โดยการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ นอกจากจะอาศัยปฏิกิริยาเคมีที่แล้ว ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ยังสามารถใช้เทคนิค

ทางเคมีไฟฟ้ามาใช้ในการกระตุ้นให้สารประกอบบางชนิด ให้เปลี่ยนแปลงไปยังระดับพลังงาน กระตุ้นที่พร้อมจะคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ออกมาเมื่ออยู่ในสภาวะและตัวกลางที่เหมาะสม ซึ่งจะเรียกวิธีการนี้ว่า อิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนส์ (electrochemiluminescence /ECL) หรือเคมีลูมิเนสเซนส์เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า (electrogenerated chemiluminescence) [21] ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานภายในของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งเกิดจาก electron transfer ของสารตั้งต้นเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในสภาวะเร้า (excited state) ซึ่งเมื่อกลับคืนมาสู่สภาวะพื้น (ground state) ก็จะมีการเปล่งคลื่นแสงออกมา เช่น การเกิดอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนส์ของ สารประกอบรูทีเนียมไบไพริดิล ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) การเหนี่ยวนำให้เกิดการคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ด้วยปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีนี้ สามารถพัฒนาทำให้ลดการใช้สารเคมีให้น้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับเคมีลูมิเนสเซนส์แบบดั้งเดิมที่ส่วนมากจะทำโดยอาศัยวิธีการวิเคราะห์ด้วยระบบการไหล (flow based techniques) นอกจากนี้การขยายสัญญาณแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ จากการสืบค้นงานวิจัยในรอบระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา สามารถใช้ปัจจัยหลายอย่างช่วยในการเหนี่ยวนำในการปลดปล่อยแสงออกมาได้ เช่นการใช้สารลดแรงตึงผิว (surface active agent) สารประกอบที่เรืองแสงได้ (fluorophore) หรือ อนุภาคกึ่งตัวนำนาโนควอนตัมดอท (quantum dots) ซึ่งได้ช่วยให้การวิเคราะห์ทดสอบทำได้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และมีสภาพไวของการวิเคราะห์มากยิ่งขึ้นทำให้สามารถวิเคราะห์สารต่างๆ ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ได้

โดยล่าสุดไม่กี่ปีที่ผ่านมา มีรายงานการนำอนุภาคนาโนควอนตัมดอท เช่น แคดเมียมเทลลูไรด์ หรือแคดเมียมซีลีไนด์ หรือแคดเมียมซัลไฟด์ มาใช้ในการเหนี่ยวนำหรือเป็นตัวถ่ายทอดพลังงานจากการคายแสงจากปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์ที่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า ดังตัวอย่างการรายงานการวิเคราะห์ Catechol ของ Liu และคณะ (2007) ได้ใช้วิธีแอโนดิกอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนส์ ของอนุภาคแคดเมียมเทลลูไรด์ที่ปรับปรุงสภาพด้วยเมอแคปโตไพโรฟิโอนิกแอซิด มาออกซิไดซ์บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าอินเดียมทินออกไซด์อิเล็กโทรด พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารประกอบซูเปอร์ออกไซด์บนขั้วไฟฟ้า ซึ่งช่วยเพิ่มผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของแคดเมียมเทลลูไรด์ในสภาวะกระตุ้น ที่อยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสามารถถ่ายเทพลังงานให้กับ Catechol ทำให้สามารถตรวจวัด Catechol ได้ในช่วงความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์-5 ไมโครโมลาร์ได้

งานวิจัยของ Wang และคณะ (2012) ได้นำอนุภาคควอนตัมดอทของ CdTe/CdS $\text{core}_{\text{small}}/\text{shell}_{\text{thick}}$ มาใช้เป็นเซนเซอร์ในการขยายสัญญาณแสงลูมิเนสเซนส์ในช่วงอินฟราเรดระยะใกล้ เพื่อการวิเคราะห์แอนติบอดี HlgG ในเซรัมเลือดมนุษย์ พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ต่ำถึงระดับ fg mL^{-1} โดยใช้งานร่วมกับซิลิกานาโนสเฟียร์และอนุภาคทองนาโน-กราฟีนซีท

ซึ่งจากการวิจัยในเมืองคันทัน คณะผู้วิจัยได้พบว่าสารประกอบกลุ่มไนโตรฟิวรานบางชนิด เช่นฟิวรัลทาโคน ฟุราโซลิโคน ไนโตรฟูราโซน ที่พบว่าถูกใช้เป็นสารต้านจุลชีพและตรวจพบการปนเปื้อนในอาหารสัตว์ ผลกระทบจากสิ่ง เช่นนมผง เกษตรดอกไม้จากสิ่ง และน้ำผึ้ง ในเขตภาคเหนือ นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบยูรีเนียมโบไฟริดิล ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.8 และสามารถถูกตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน โดยมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเพื่อการตรวจวัดในระดับการปนเปื้อนที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้ถึงระดับไมโครโมลาร์ หากนำวิธีการตรวจวัดแบบอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ที่กล่าวมาข้างต้น มาพัฒนาและประยุกต์ร่วมกับวิธีไมโครฟลูอิดิกส์ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สารเคมีน้อยราคาไม่สูงและใช้เวลาวิเคราะห์ที่สั้น เพื่อใช้ในการติดตาม ตรวจสอบ วิเคราะห์หาปริมาณของสารตกค้างบางอย่างที่เป็นปัญหาในทางการเกษตรในปัจจุบัน ซึ่งเป็นปัญหาของการส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และการกีดกันสินค้าทางการเกษตรจากกลุ่มสหภาพยุโรปและญี่ปุ่น คาดว่าจะช่วยทำให้เกิดผลดีต่อเกษตรกรและผู้บริโภคเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารเคมีที่ตกค้างได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการวิเคราะห์ รวมถึงให้การวิเคราะห์มีความรวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ได้หลาย ๆ ตัวอย่าง ในเวลาเพียงอันสั้น ซึ่งอาจนำไปสู่การสร้างเครื่องมือตรวจวัดภาคสนาม ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่รอการส่งออกได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จะทำการพัฒนาออกแบบระบบการวิเคราะห์และสร้างระบบ ปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีราคาถูกที่สามารถใช้แล้วทิ้งได้ Fiorini และคณะ (2005) จากการใช้วัสดุราคาถูก เช่น ไมโครฟลูอิดิกส์แบบกระดาษโดยใช้การพิมพ์แบบอิงค์เจ็ต ร่วมกับการใช้งานขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน ร่วมกับเทคนิคอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ เนื่องจากการตรวจวัดความเข้มของแสงที่ปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาทางเคมี หรือการเหนี่ยวนำด้วยปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีสามารถทำได้โดยอาศัยเครื่องมือหรือวิธีการง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน โดยใช้เพียงหลอดวัดแสง (photomultiplier tube, PMT) และเครื่องจ่ายไฟฟ้าคงที่ (potentiostat) เท่านั้น เพราะว่าแหล่งกำเนิดแสงจะอยู่ในสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอยู่แล้ว จึงไม่จำเป็นที่จะต้องใช้อุปกรณ์แยกแสงความยาวคลื่นเดียว เพื่อมาแยกความแตกต่างของช่วงความยาวคลื่นอีก และจะเพิ่มขีดความสามารถในการเกิดโฟโตเคมีลูมิเนสเซนซ์ด้วยอนุภาคนาโนควอนตัมดอท (quantum dots) Chen และคณะ (2013) บางชนิดที่มีรายงานว่าสามารถเพิ่มความเข้มของแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ได้ โดยระบบการตรวจวัดจะอาศัยเครื่องมือง่ายๆ เพื่อลดความยุ่งยาก และขั้นตอนของการวิเคราะห์หลังให้น้อยที่สุด สามารถพัฒนาต่อยอดสำหรับใช้เป็นอุปกรณ์ต้นแบบสำหรับงานภาคสนามได้

โดยคณะผู้วิจัยจะทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบใหม่ที่สามารถเพิ่มเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ สารปนเปื้อนกลุ่มยาต้านการจุลชีพ โดยมุ่งเน้นไปยังสารเคมีในกลุ่มเตตราซัยคลิน (tetracycline) ไนโตรฟิวราน (nitrofurans) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) หรือสารเคมีบางชนิดที่ถูกเติมลงไปเพื่อรักษาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรกลุ่มสารที่ใช้ในการถนอมอาหารเช่นซัลไฟต์ ไนไตรท์ กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ให้สามารถทำการตรวจวัดได้แม้มีการปนเปื้อนอยู่ในระดับต่ำๆ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ได้ภายในขอบเขตของค่ามาตรฐานของสำนักงานอาหารและยาหรือองค์การอนามัยโลก หรือข้อจำกัดในการส่งออกและนำเข้าของสหภาพยุโรป ซึ่งคาดว่าจะสามารถช่วยเกษตรกรผู้ผลิต ผู้ส่งออก หรือหน่วยงานรับวิเคราะห์ทดสอบ นำไปใช้ในการตรวจยืนยันถึงการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือเพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องมือทางเลือกสำหรับตรวจสอบเบื้องต้น ในการติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนของตัวยาบางชนิดเหล่านี้ในอาหารหรือผลผลิตแปรรูปทางการเกษตรที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ทดแทนเครื่องมือวิเคราะห์ราคาแพง แต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำและต่อเนื่อง เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากจะใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในปริมาณน้อยแล้ว ยังมีราคาถูก สามารถใช้แล้วทิ้งได้ ซึ่งช่วยประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ทดสอบตัวอย่างในปริมาณมากๆ ได้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

งานวิจัยนี้เพื่อออกแบบและสร้าง เครื่องมือ สำหรับใช้การตรวจวิเคราะห์สารต้านจุลชีพบางชนิด ด้วยเทคนิคระบบปฏิบัติการขนาดจิ๋ว (mesofluidics) จากวัสดุราคาถูกละเอียดสามารถใช้แล้วทิ้งได้เช่นกระดาษ และพัฒนา ตัวตรวจวัดที่มีสภาพไวสูงชนิดอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์มีลูมิเนสเซนซ์ (electrochemiluminescence) ร่วมกับการใช้อนุภาคนาโนควอนตัมดอท (quantum dots) ที่ช่วยเหนี่ยวนำ หรือขยายสัญญาณทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนสารต้านจุลชีพบางชนิดในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยสารเคมี และวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ แสดงในตารางที่ 1 และ 2

สารเคมี

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อสารเคมี	เกรด/ ความบริสุทธิ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. Alkenyl ketene dimer	commercial	YanCui	China
2. 2,2' bipyridyl ($C_{10}H_8N_2$)	AR	Sigma-Aldrich	USA
3. Cadmium chloride ($CdCl_2$)	HPLC	Sigma-Aldrich	USA
4. L-cysteine ($C_3H_7NO_2S$)	AR	Fisher	UK
5. Furaltadone ($C_{13}H_{16}N_4O_6$)	HPLC	Sigma-Aldrich	USA
6. Furazolidone ($C_8H_7N_3O_5$)	HPLC	Sigma-Aldrich	USA
7. 3-mercaptopropionic acid (MPA) ($C_3H_6O_2S$)	AR	Sigma-Aldrich	USA
8. Nitrofuratoin ($C_8H_6N_4O_5$)	HPLC	Sigma-Aldrich	USA
9. Phosphinic acid (H_3PO_4)	AR	Sigma-Aldrich	USA
10. Ruthenium (III) chloride ($RuCl_3$)	AR	Fluka	UK
11. Sodium borohydride ($NaBH_4$)	AR	Sigma-Aldrich	USA
12. Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	AR	CARLO ERBA	Italy
13. Tellurium powder	AR	Fluka	UK

เครื่องมือและอุปกรณ์

ตารางที่ 2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
1. เครื่องโพเทนชิโอสแตท	Metrohm รุ่น Autolab PGSTAT101	Switzerland
2. เครื่องชั่งชนิด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Mettler Toledo รุ่น AB304-S	Switzerland
3. Carbon screen-printed electrode	Dropsens	Spain
4. Digital multimeter	UT60F	Hong Kong
5. Photomultiplier tubes	Thorn-EMI 9828SB	UK
6. Inkjet Printer	Cannon, Pixma iP2770	Thailand
7. Quartz cuvette	Hellma	Germany
8. Voltage power supply	Thorn-EMI 9828SB	UK

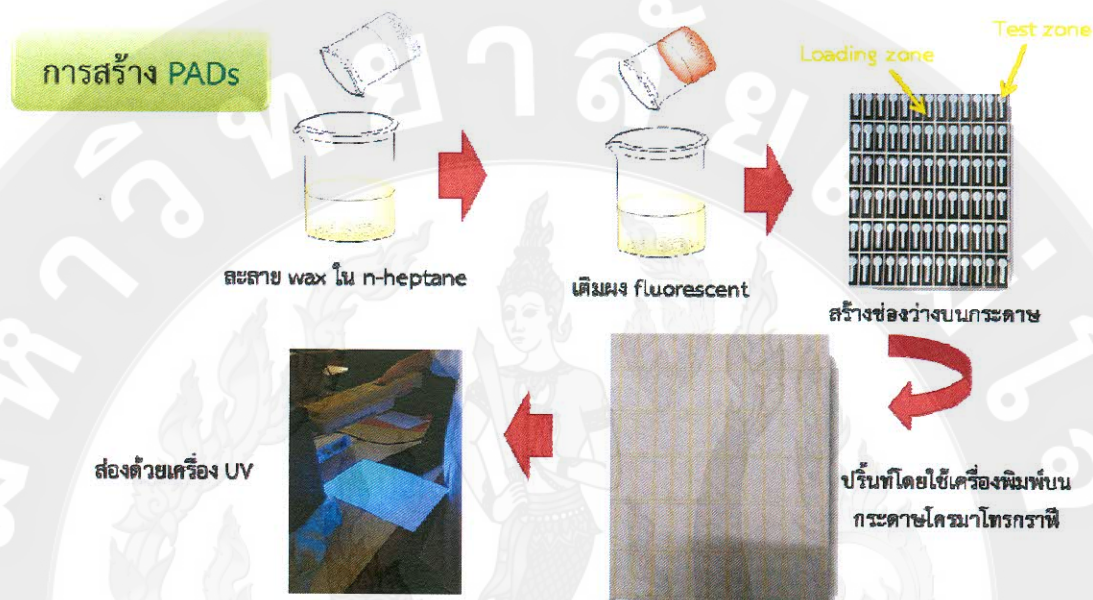
วิธีการวิจัย

การออกแบบและสร้างระบบปฏิบัติการขนาดจ้ว (mesofluidics) จากวัสดุราคาถูกสามารถใช้แล้วทิ้งได้เลยเช่นกระดาษ สำหรับใช้งานเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีสภาพไวสูง มีราคาถูก ซึ่งจะประกอบไปด้วยกระบวนการต่างๆ ที่สำคัญดังนี้

1. ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม รวมทั้งสำรวจการใช้และการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะ สารต้านจุลชีพต่างๆ ที่พบการปนเปื้อนสูงในผลิตภัณฑ์อาหาร ที่ตรวจเก็บในเขตภาคเหนือตอนบน (เน้นเขตจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน)
2. ออกแบบ และศึกษาดัดแปลงเครื่องมือ เครื่องพิมพ์เลเซอร์ที่มีอยู่ เพื่อพัฒนาเป็นระบบปฏิบัติการขนาดจ้ว (mesofluidics) ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนบนอุปกรณ์ตรวจวัดมิโซฟลูอิดิกส์ชนิดกระดาษเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ และเพื่อลดการใช้ปริมาณสารรีเอเจนต์ให้น้อยลง แต่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.1 การประดิษฐ์อุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบใช้แล้วทิ้งด้วยกระดาษ

ทำได้โดยการเตรียมสารละลายแวกซ์ จากสารละลาย Alkenyl Ketene dimer (AKD) 5 % w/v ด้วยสารละลายเฮปแทนโดย เติม Florescent 0.1g ที่ละลายในไอโซโพรพานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปใน AKD 5 % w/v ปรับปริมาตรเป็น 50 ml



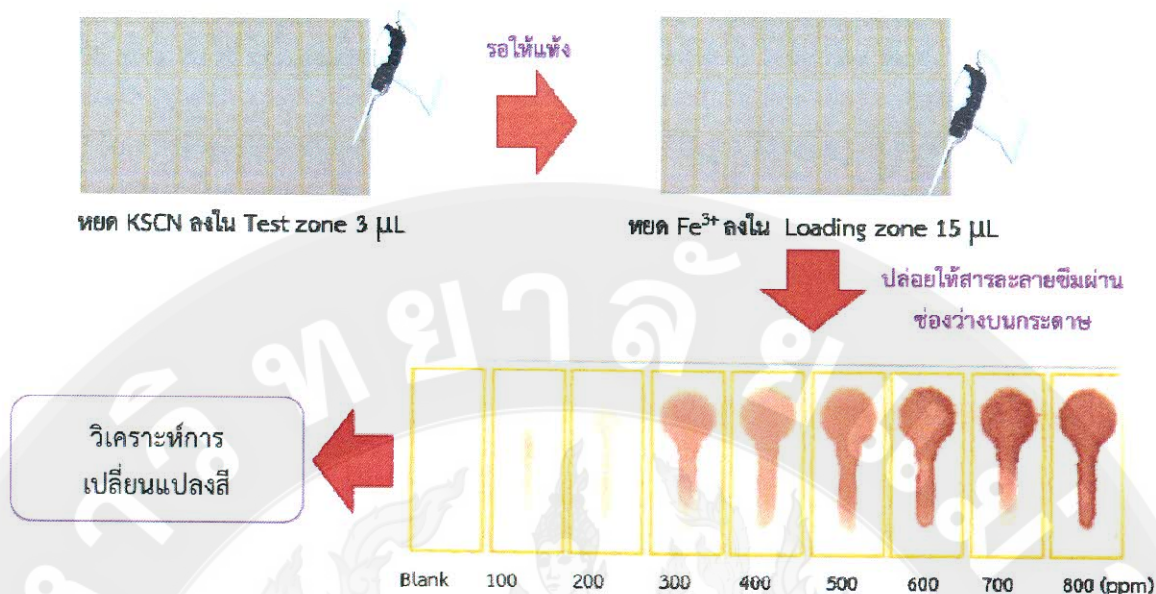
รูปที่ 5 การออกแบบใช้งาน meso-fluidics channel สำหรับวิเคราะห์

2.2 การทดสอบอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบใช้แล้วทิ้งด้วยกระดาษเบื้องต้น

โดยนำอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์ที่ประดิษฐ์ขึ้น ไปทดลองใช้วิเคราะห์ทดสอบหาปริมาณเหล็กโดยวิธีสเปกโทรสโกปี โดยใช้สารละลายโปแทสเซียมไซยาไนด์ ทำปฏิกิริยากับไอออนเหล็ก ตามปฏิกิริยาด้านล่าง



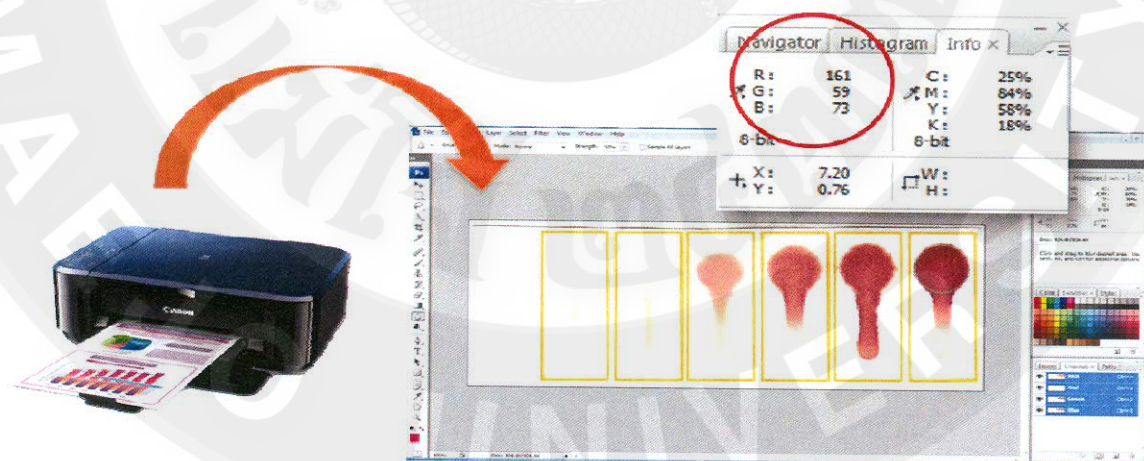
เมื่อเกิดปฏิกิริยาขึ้นจะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีแดง ขึ้นบนอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบกระดาษตามลวดลายที่ได้ออกแบบไว้



รูปที่ 6 การทดสอบอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์เหล็ก

2.3 วิธีวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสี โดยใช้ RGB model จากโปรแกรม Photoshop

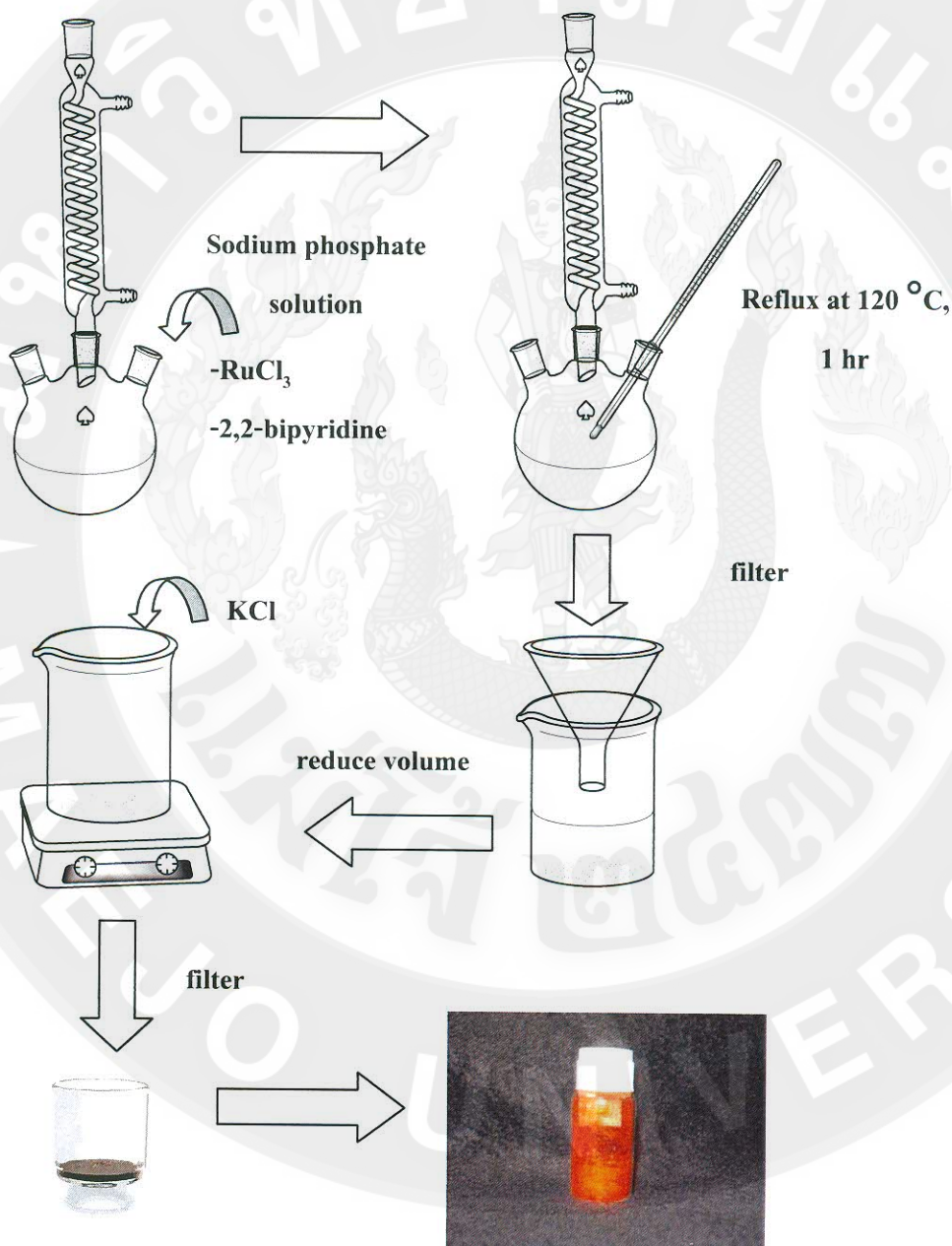
การตรวจหาโดยการเทียบสี (colorimetric detection) โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสีของสารจากปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า หรือใช้เครื่องสแกนเนอร์ตรวจหาความเข้มของสีในแผ่นมีโซฟลูอิดิกส์ ด้วยโปรแกรมโฟโตชอปส์



รูปที่ 7 การตรวจหาความเข้มของสีในแผ่นมีโซฟลูอิดิกส์ ด้วยโปรแกรมโฟโตชอปส์

3. ศึกษาปฏิกิริยาเคมีของสารปนเปื้อนบางชนิดที่ปนเปื้อนในอาหาร ในกลุ่มไนโตรฟิวรานกับสารเคมีที่มักเกิดการเรืองแสงด้วยปฏิกิริยาเคมี tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III), ด้วยวิธีเคมีลูมิเนสเซนซ์ ร่วมกับเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

ส่วนการสังเคราะห์ Tris(2, 2'-bipyridyl)ruthenium (II) หรือ $(\text{Ru}(\text{bpy})_3)^{2+}$ ได้ทำการทดลองโดยอาศัยวิธีของ Broomhead และ คณะ (2007) โดยมีแผนผังการทดลองดังรูปที่ 8



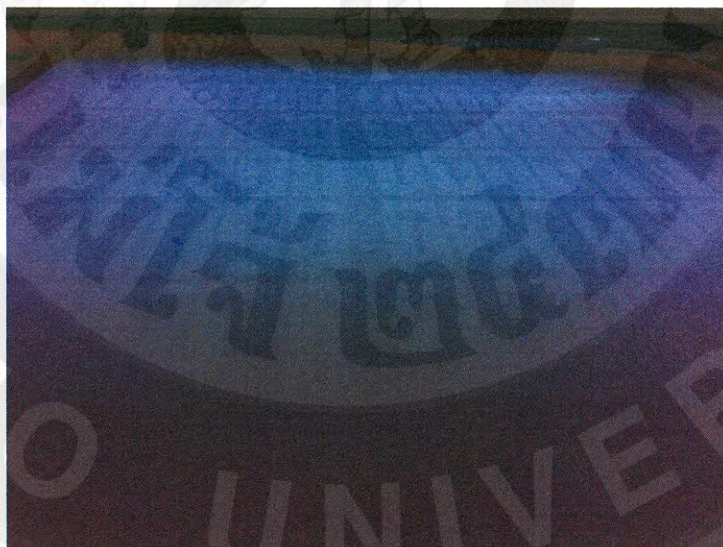
รูปที่ 8 แผนผังการสังเคราะห์สารประกอบ tris(2, 2'-bipyridyl)ruthenium (II) $(\text{Ru}(\text{bpy})_3)^{2+}$.

4. ทดลองเพิ่มสภาพไวของปฏิกิริยา โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ โดยศึกษาตัวแปรทางกายภาพ และตัวแปรทางเคมีอื่นๆ เช่นอุณหภูมิ ความดัน คำนวณค่าคงที่
5. ศึกษาผลของ interferences ที่อาจกระทบต่อการวิเคราะห์ พร้อมทั้งวิธีหลีกเลี่ยง และวิธีการกำจัดสารรบกวนต่างๆ
6. ศึกษาคุณลักษณะของการวิเคราะห์ เช่นความแม่นยำ ความเที่ยงตรง จัดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดอัตราเร็วของการวิเคราะห์ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีมาตรฐานขององค์กรด้านอาหาร เช่น AOAC เป็นต้น
7. นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์กับการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารหรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ใช้เป็นตัวอย่างจริงในการเปรียบเทียบความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์
8. เพื่อสรุปผล วิจัย และเขียนรายงาน

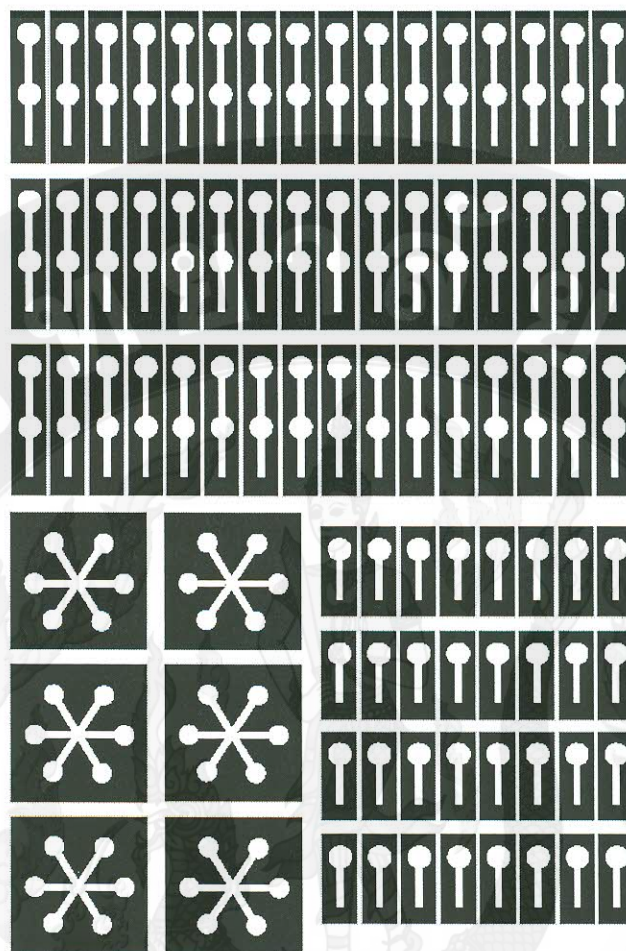
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การพิมพ์และการออกแบบลวดลายบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

การพิมพ์และออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้นใช้ในงานวิจัยนี้ สร้างขึ้นจากกระดาษ เกรด 4 ที่มีความหนา 0.205 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Whatman โดยใช้เครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ท ยี่ห้อ CanonTM ip2700 โดยใช้สารละลาย Alkenyl Ketene Dimer (AKD) เข้มข้น 5% w/v ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการพิมพ์ทั่วไป มาแทนที่หมึกพิมพ์ของเครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ทปกติ โดยได้ออกแบบลวดลายซึ่งอาศัยแนวคิดในการทำวิจัยจากงานวิจัยของ Jayawardane และคณะ [2012] โดยในขั้นตอนการทำอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์ ได้ทำการออกแบบบล็อกในการทำแผ่นสกรีน ใช้โปรแกรม Microsoft Word แล้วบันทึกเป็นนามสกุล PDF เพื่อป้องกันการคลาดเคลื่อน มีรูปแบบของลวดลายต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 9 โดยใช้เครื่องปริ้นแบบ Inkjet printer (Canon Pixma ip2770) ที่มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด ใช้สารละลาย AKD เข้มข้น 5 % w/v แทนน้ำหมึกในตลับปริ้นเตอร์ โดยนำกระดาษโครมาโทกราฟี ที่มีขนาด A4 แทนกระดาษทั่วไป หลังจากปริ้นเสร็จ นำกระดาษไปฉายด้วยแสง UV (คลื่นยาว) เพื่อตรวจสอบความเรียบร้อยของลายปริ้น ดังรูปที่ 10 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ AKD ซึมลงในกระดาษโครมาโทกราฟี เกิดเป็นลวดลายตามที่ได้ออกแบบไว้



รูปที่ 9 ลวดลายแผ่นสกรีนบนกระดาษโครมาโทกราฟี ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



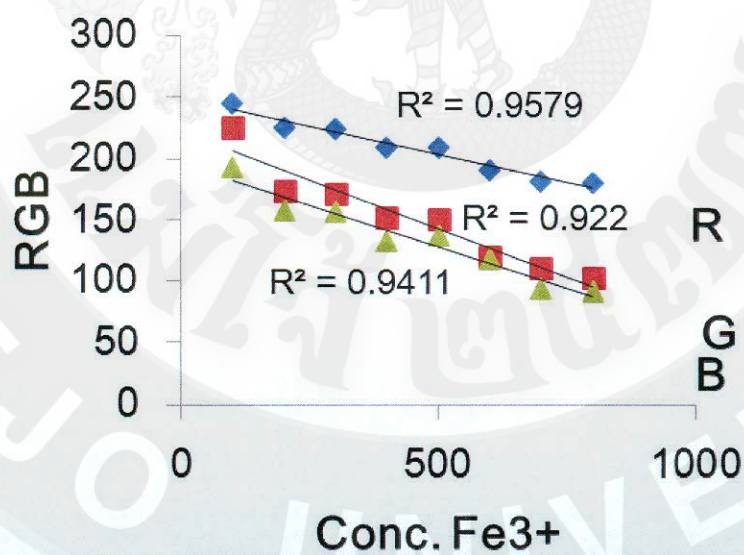
รูปที่ 10 การออกแบบลวดลายแผ่นสกรีน

1.1 การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์แบบกระดาษที่ประดิษฐ์ขึ้น

โดยในเบื้องต้นนี้ได้นำอุปกรณ์มีโซฟลูอิดิกส์ที่ประดิษฐ์ขึ้น ไปใช้วิเคราะห์ทดสอบหาปริมาณเหล็กโดยวิธีสเปกโทรสโคปี โดยใช้สารละลายโปแทสเซียมไซยาไนด์ เพื่อหาความเป็นไปได้ในการทำไปใช้งาน และทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น โดยใช้สารละลายโปแทสเซียมไซยาไนด์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.1 – 2.0 โมลาร์ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ทดสอบกับสารละลายเหล็ก (Fe^{3+}) เข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ผลดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 รูปภาพแสดงการเกิดสีบนแผ่นอุปกรณ์มิโซฟลูอิดิกส์แบบกระดาษที่ใช้ในการทดสอบ ปริมาณไอออนเหล็กด้วยไซโอไซยานต



รูปที่ 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเปลี่ยนแปลงสี (RGB) กับความเข้มข้นของ Fe³⁺

การตรวจหาโดยการเทียบสี (colorimetric detection) อาศัยการเปลี่ยนแปลงของสีของสารจากปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า หรือใช้เครื่องสแกนเนอร์ในการตรวจหาแม่สี แดง เขียว และน้ำเงิน (RGB) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 12

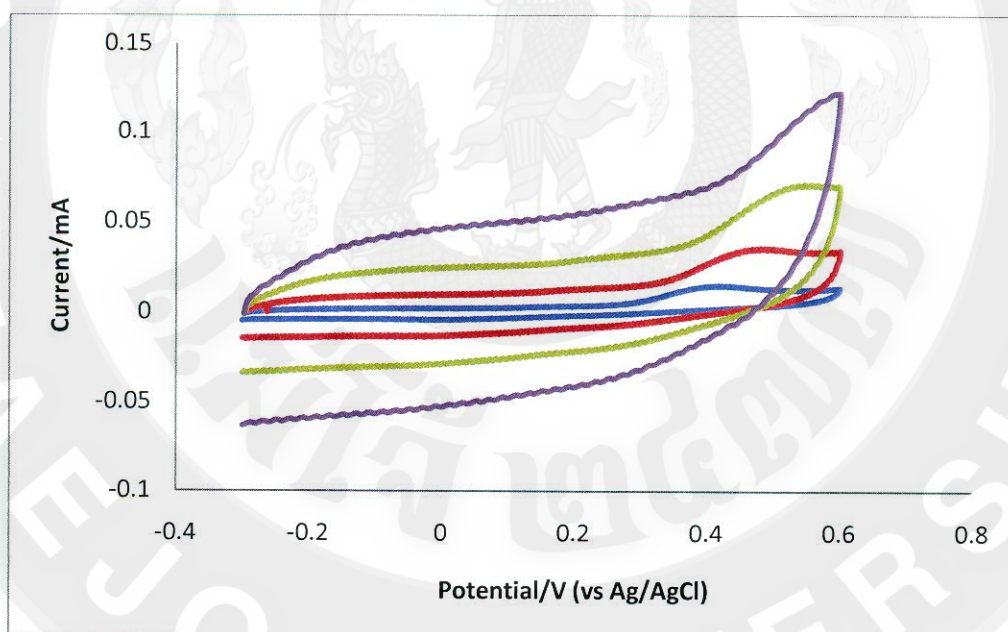
โดยจากการศึกษาเบื้องต้นนี้พบว่าสามารถผลิตอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษได้จากวัสดุอุปกรณ์ ทั่วไปที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเคมี ทำให้ได้ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ราคาถูกลงแบบใช้แล้วทิ้งที่สามารถนำไปใช้งานจริงในภาคสนามได้

ซึ่งขั้นตอนต่อไปจะเป็นการศึกษาหาแนวทางในการนำเอาเทคนิคการตรวจวัดการเรืองแสงจากการเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้ามาใช้ในการตรวจวัดสารต้านจุลชีพที่ปนเปื้อนในอาหาร และมีอยู่ในปริมาณน้อยๆ ได้อย่างจำเพาะ

2. การศึกษาปฏิกิริยาเคมีในสเซนส์ของสารต้านจุลชีพกลุ่มไนโตรฟิวรานด้วยวิธีอิเล็กโทรเคมีในสเซนส์แบบเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าโดยทำการจุ่มขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนอุปกรณ์ตรวจวัดลงในสารละลายดังกล่าวที่บรรจุในคิวเวทท์ แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี(CV) โดยใช้

2.1 การศึกษาไซคลิกโวลแทมเมตรีของสารประกอบ tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium(III)

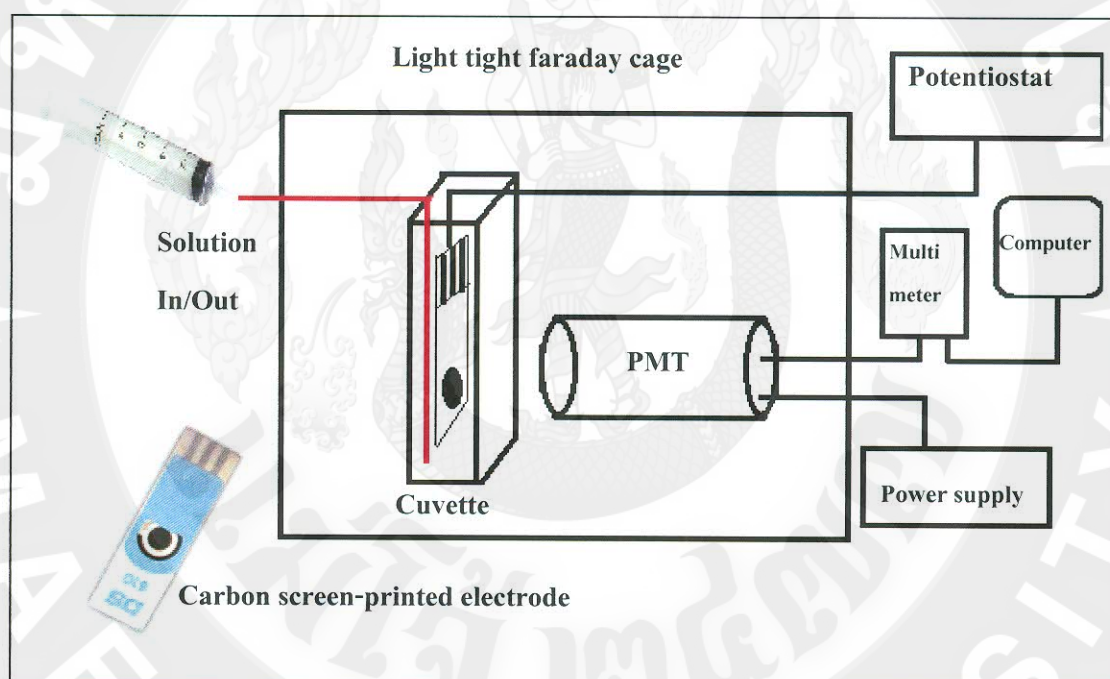
ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สาร tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) , $(\text{Ru}(\text{bpy})_3)^{3+}$ ที่มีความเข้มข้น 5 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารตั้งต้นในการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีในสเซนส์แบบเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าโดยทำการจุ่มขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนอุปกรณ์ตรวจวัดลงในสารละลายดังกล่าวที่บรรจุในคิวเวทท์ แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี(CV) โดยใช้อัตราการสแกนในช่วง 0.05 V s^{-1} to 1.0 V s^{-1} ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 13 จากผลการทดลองที่ได้พบสัดส่วนของพีค cathodic และ anodic มีความใกล้เคียงกัน แสดงว่าปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นแบบ reversible และเมื่อเพิ่ม อัตราการสแกนขึ้น จะทำให้ได้ค่าความสูงของพีค (ΔE_p) เพิ่มขึ้น จึงทำให้สาร $(\text{Ru}(\text{bpy})_3)^{3+}$ ที่เป็นสาร redox สามารถเกิดการแพร่ และเกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีได้ไวขึ้นนั่นเอง



รูปที่ 13 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารประกอบ tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium(III) เข้มข้น 5 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1M pH เท่ากับ 7 ที่อัตราการสแกนเท่ากับ 0.05, 0.2, 0.5, และ 1.0 V s^{-1}

2.2 การตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูราน ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์

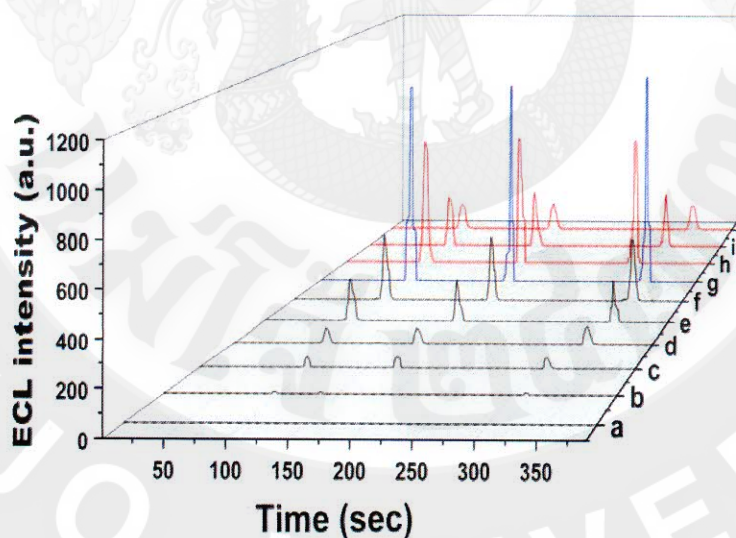
ในการศึกษาทดสอบเบื้องต้นของสารกลุ่มไนโตรฟูราน ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ ได้ทดลองโดยใช้กระบวนการและอุปกรณ์ในการตรวจวัดดังแสดงในรูปที่ 14 ซึ่งกระบวนการตรวจวัดมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ เติมสารละลายผสมระหว่างสารมาตรฐานกลุ่มไนโตรฟูราน และสารละลาย $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ลงในคิวเวทท์ที่มีขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนชนิดคาร์บอน (SPE) อยู่ หลังจากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้าผ่านขั้วไฟฟ้า SPE ดังกล่าว ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ลงไปในสารละลายผสมระหว่าง $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ และสารกลุ่มไนโตรฟูราน จะเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ พร้อมกับคายแสงลูมิเนสเซนซ์ออกมา ทำการตรวจวัดแสงที่เกิดขึ้นด้วยหลอดขยายสัญญาณแสง (PMT) และแปลงสัญญาณแสงที่ได้เป็นความสูงของพีคสัญญาณ



รูปที่ 14 ชุดเครื่องมือสำหรับตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูรานด้วยเทคนิคอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์

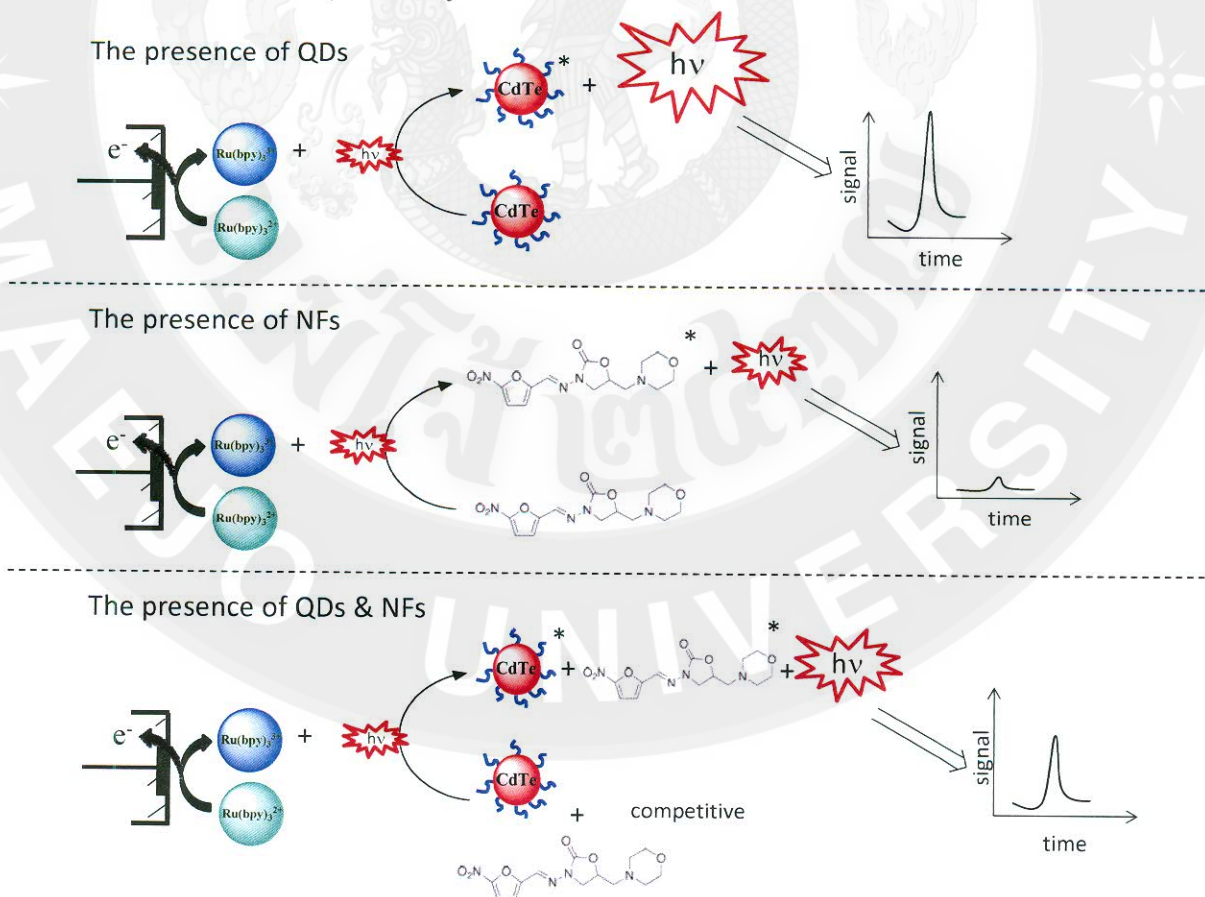
จากผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 15 เมื่อสารละลายมาตรฐานฟูราตาโดนเป็นตัวแทนของสารต้านจุลชีพกลุ่มไนโตรฟูรานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ $100 \mu\text{M}$ ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) เข้มข้น 0.1 M มาวัดการคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ชนิดเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า โดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีในช่วงตั้งแต่ $0.4\text{--}1.6 \text{ V}$ และอัตราเร็วในการสแกนเท่ากับ 0.05 Vs^{-1} พบว่าไม่สามารถวัดสัญญาณได้ แสดงว่าสารกลุ่มไนโตรฟูรานไม่เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ (a) ในขณะที่เดียวกันเมื่อทดสอบกับสารละลาย

ควอนตัมดอท (CdTe-QDs) ที่ห่อหุ้มด้วยซีสเทอีน ในสารละลาย PBS เข้มข้น 0.1 M ปรากฏว่าสามารถตรวจวัดค่าสัญญาณการคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ที่เกิดขึ้นได้ แต่มีค่าเพียงเล็กน้อย (b) แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นสารละลาย $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ผสมกับสารละลายมาตรฐานฟูราลทาโดนที่ความเข้มข้น 0, 500, 1000 และ 1500 μM พบว่าค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้ เพิ่มขึ้นตามระดับของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟูราลทาโดนที่เติมลงไป (c-f) อาจเนื่องจากสารกลุ่มไนโตรฟูรานเป็นตัวช่วยให้ปฏิกิริยาอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ของ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ เกิดได้ดีขึ้น แต่เมื่อพิจารณาจากสัญญาณที่ตรวจวัดได้ ยังไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงเติมอนุภาคควอนตัมดอท CdTe-QDs ลงไปในระบบการตรวจวัด ผลการทดลองพบว่า ค่าสัญญาณที่ได้มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเป็น 26 เท่า (c.g) เมื่อเทียบกับสัญญาณที่เกิดจากไม่มีการเติม CdTe-QDs ลงไป เป็นเพราะเมื่อ CdTe-QDs เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ แสงลูมิเนสเซนซ์ที่คายออกมามีช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 480-650 nm สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ [2010] และจะไปส่งเสริมแสงลูมิเนสเซนซ์ของ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ซึ่งจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นเท่ากับ 560 nm ซึ่งสัมพันธ์กับงานวิจัยของ Paris และ Brandt [1959]



รูปที่ 15 ค่าสัญญาณแสงจากปฏิกิริยาอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ (a) FTD concentration at 100 μM ; (b) L-cysteine CdTe-QDs concentration at 1 mM; (c) 5 mM of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$; (d-f) 5 mM of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ with 500, 1000 and 1500 μM FTD, respectively; (g) 5 mM of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ /L-cysteine CdTe-QDs without FTD; (h-j) 5 mM of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ /L-cysteine CdTe-QDs with 50, 100 and 200 μM of FTD, respectively.

ในขณะเดียวกันเมื่อในระบบการตรวจวัดที่มี Ru(bpy)_3^{2+} และ CdTe-QDs พร้อมกับการเติมสารละลายมาตรฐานฟูราทาโคนลงไป พบว่าค่าสัญญาณแสงที่วัดได้มีค่าลดลง (h-j) และลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟูราทาโคนที่เติมลงไป ซึ่งอาจเกิดจากสารกลุ่มของไนโตรฟูรานเกิดกระบวนการยับยั้ง หรือแข่งขันปฏิกิริยาของอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ของ CdTe-QDs/ Ru(bpy)_3^{2+} นั้นเอง จากผลการศึกษาเบื้องต้นที่ได้ สามารถอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ของ CdTe-QDs/ Ru(bpy)_3^{2+} และสารกลุ่มไนโตรฟูรานดังแสดงในรูปที่ 15 เมื่อ Ru(bpy)_3^{2+} ถูกกระตุ้นด้วยศักย์ไฟฟ้าจะทำให้เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์พร้อมกับเกิดการคายแสงลูมิเนสเซนซ์ออกมา ซึ่งพลังงานแสงดังกล่าวจะไปกระตุ้นทำให้ CdTe-QDs ที่อยู่ระบบเกิดการคายแสงเสริมออกมา และเช่นเดียวกันกับระบบที่มี Ru(bpy)_3^{2+} กับสารกลุ่มไนโตรฟูราน แต่ต่างกันตรงที่พลังงานแสงที่เกิดขึ้นมีค่าที่น้อยกว่า แต่เมื่อในระบบการตรวจวัดมีสารทั้ง 3 ชนิดอยู่รวมกันจะทำให้เกิดการแข่งขันการรับพลังงานแสงของ Ru(bpy)_3^{2+} ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก CdTe-QDs และสารกลุ่มไนโตรฟูรานที่อยู่ในระบบ ส่งผลทำให้แสงที่เกิดขึ้นมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับระบบไม่มีสารกลุ่มไนโตรฟูราน ดังนั้นจากผลการศึกษาที่ได้ทำให้สามารถใช้กระบวนการดังกล่าวมาทดสอบสารกลุ่มไนโตรฟูรานได้



รูปที่ 16 กลไกการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ของ Ru(bpy)_3^{2+} /QDs ECL/Nitrofurans

2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบการตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูรานด้วยเทคนิคอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์

ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการการตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูรานจะทำการศึกษารูปแบบ univariate ประกอบไปด้วยการศึกษา ค่าศักย์ไฟฟ้า และ scan rate ของไซคลิกโวลแทมเมตรี ค่าศักย์ไฟฟ้าของหลอดขยายสัญญาณแสง ชนิดและค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสารละลาย $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ และ CdTe-QDs ที่เหมาะสม ที่จะส่งผลทำให้ค่าสัญญาณของการตรวจวัดการคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์มีค่าสูงที่สุด

ผลของอัตราเร็วในการสแกนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

ทำการศึกษาอัตราเร็วในการสแกนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ตั้งแต่ 0.02 Vs^{-1} to 0.5 Vs^{-1} โดยใช้สารละลาย $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ใน 0.1 M ของสารละลาย PBS โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ $0.4\text{-}1.6 \text{ V}$. แล้วบันทึกค่าสัญญาณของแสงที่ปล่อยออกมาในรูปของสัญญาณที่ความสูงต่อฟีดสัญญาณของระบบ(S/N) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าที่ค่า scan rate เท่ากับ 0.05 Vs^{-1} จะทำให้ได้ค่าสัญญาณสัญญาณการคายแสงต่อสัญญาณพื้นหลัง (S/N) สูงที่สุดดังแสดงในรูป 16 (a)

ผลของค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้แกหลอดขยายสัญญาณแสง (PMT)

ผลของค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายให้แก่หลอดขยายสัญญาณแสง (PMT) โดยทำการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายในช่วง $700\text{-}1,000 \text{ V}$ ในการตรวจวัดสัญญาณที่ได้จากหลอด PMT โดยทำการตรวจวัดการคายแสงหลังจากที่ให้ศักย์ไฟฟ้าแก่สารละลาย $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ในคิวเวท จากผลการทดลองที่ได้พบว่าค่าสัญญาณ(S/N) ที่ดีที่สุดคือที่ค่าศักย์ไฟฟ้าของหลอด PMT เท่ากับ 850 V (b)

ผลของชนิดสารละลายบัฟเฟอร์

ในการศึกษาขั้นตอนนี้ได้ทำการเติมสารละลายมาตรฐานฟูราลทาโดน เข้มข้น 0.5 mM ลงไปในระบบที่มีสารละลายของ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ได้แก่ 0.1 M acetate buffer, 0.1 M phosphate buffer, 0.1 M borate buffer, 0.1 M ammonium buffer และ 0.1 M carbonate buffer ผลการทดลองที่ได้พบว่าค่าสัญญาณการคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ที่ได้สูงที่สุด เมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (c) เป็นตัวกลางในการศึกษา

ในขั้นต่อมาได้ทำการศึกษาค่าของ pH ของสารละลาย PBS ที่เหมาะสม โดยได้ทำการศึกษาค่าของ pH ตั้งแต่ $5.7\text{-}8.0$ ผลการทดลองที่ได้(d) พบว่าเมื่อค่าของ pH เพิ่มขึ้นค่าของสัญญาณตรวจวัดก็จะเพิ่มขึ้นตาม และค่าสัญญาณจะเริ่มคงที่เมื่อค่า pH เท่ากับ 7.5 ดังนั้นค่าของ pH ของสารละลาย PBS ที่เหมาะสมคือเท่ากับ 7.5

ผลของความเข้มข้นสารละลาย $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ และ *L*-cysteine-capped CdTe-QDs

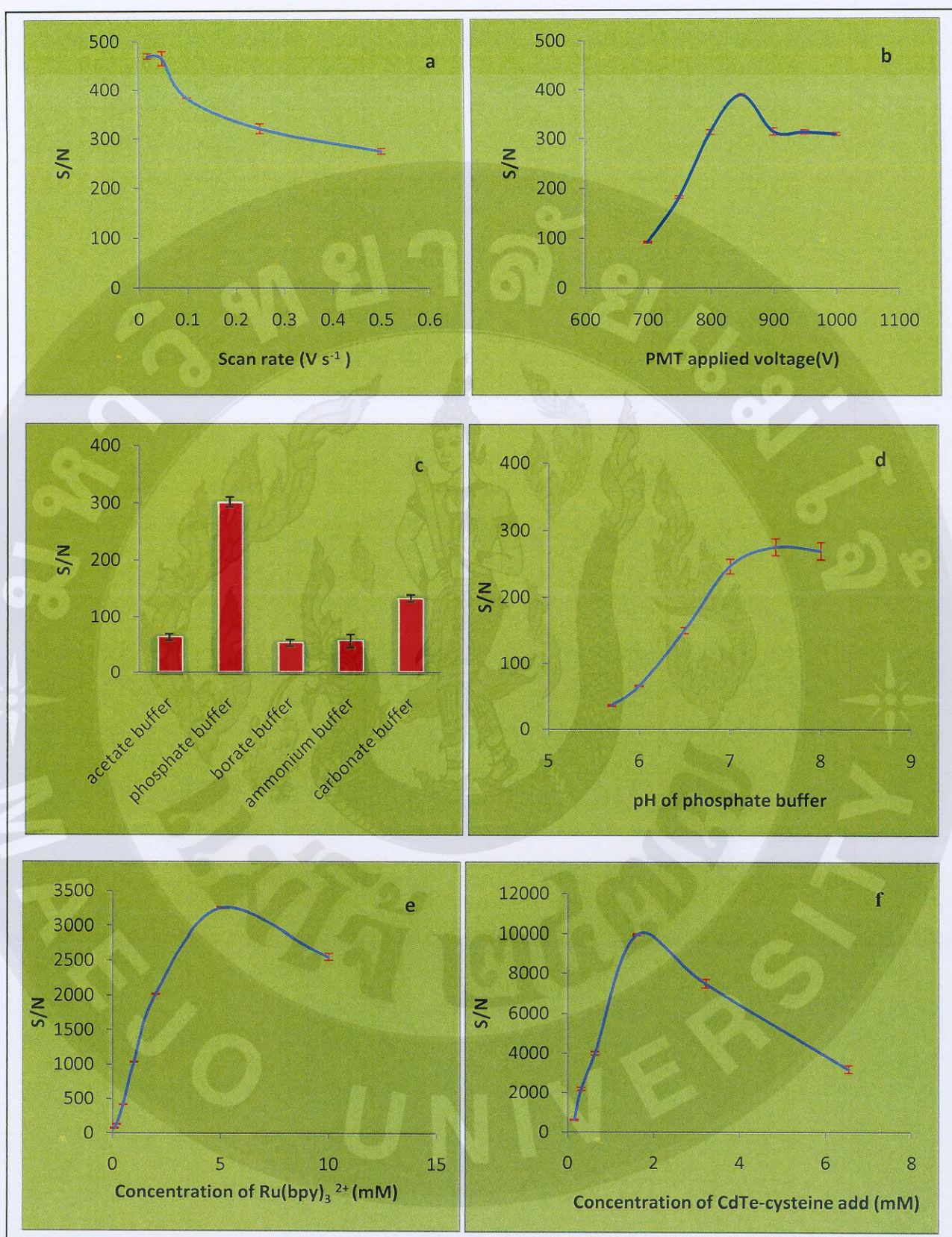
ความเข้มข้นของสารละลาย $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ที่ได้ทำการศึกษามีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-10.0 mM ผลการทดลองที่ได้พบว่า ที่ความเข้มข้น 5.0 mM จะทำให้ค่าสัญญาณที่ได้มีค่าดีที่สุด เมื่อความเข้มข้นของ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ เพิ่มมากขึ้นค่าสัญญาณจะมีค่าลดลง ดังแสดงในรูปที่ 21(e) สำหรับความเข้มข้นของ CdTe-QDs ที่ได้ทำการศึกษานั้น มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.16-6.53 mM โดยเติมลงในระบบที่มีสารละลายสาร $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.61 mM ค่าสัญญาณที่ได้จะมีค่ามากที่สุด (f) ดังนั้นจึงทำการเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการทดสอบสารกลุ่มไนโตรฟูรานต่อไป

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการทดสอบแบบ Simplex

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการทดสอบแบบ Simplex นั้น ได้ใช้การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม Multisimplex software (2.1 trial version) โดยสภาวะที่ได้ทำการศึกษาและผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4 จากผลการทดลองพบว่าต้องทำการทดลองทั้งหมด 13 สภาวะการทดลองตามที่โปรแกรมได้ออกแบบมาให้ ถึงจะทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด พบว่าสภาวะที่ทำให้ระบบการตรวจวัดมีค่าสัญญาณดีที่สุด คือ สารละลาย PBS เข้มข้น 110 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ เข้มข้น 5.25 mM และ ความเข้มข้นของ CdTe-QDs เท่ากับ 1.77 mM ตามลำดับ โดยผลการเปรียบเทียบการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการทดสอบแบบ univariate เปรียบเทียบกับวิธี simplex

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบตรวจวัดแบบ univariate และ simplex

Parameter	Univariate optimization		Simplex optimization		
	Range studied	Optimal value	Range studied	Initial step size	Optimal value
PMT applied voltage (V)	700-1000	850	-	-	-
Type of buffer	phosphate buffer, acetate buffer, borate buffer, ammonium buffer and carbonate buffer	phosphate buffer	-	-	-
pH of phosphate buffer	5.7-8.0	7.5	-	-	-
Phosphate buffer concentration (mM)	10-250	100	90-135	20	110
$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ concentration (mM)	0.1- 10.0	5.0	4.75-5.25	0.5	5.25
<i>L</i> -cysteine CdTe-QDs concentration (mM)	0.16-6.53	1.61	1.45-2.15	0.10	1.77



รูปที่ 17 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูรานแบบ univariate

(a) scanrate, (b) PMT applied voltage, (c) buffer solutions, (d) pH of phosphate buffer solutions, (e) the concentration of $Ru(bpy)_3^{2+}$, and (f) the concentration of cysteine-capped CdTe QDs.

2.5 การประยุกต์ใช้วิธีอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนซ์ในการวิเคราะห์สารต้านจุลชีพกลุ่มไนโตรฟูรานในตัวอย่างอาหารสัตว์

การศึกษาคูณลักษณะของวิธีการตรวจวัด

ในการศึกษาคูณลักษณะของวิธีการตรวจวัด จะประกอบไปด้วยการศึกษาความแม่นยำ ความเที่ยงตรง ขีดต่ำสุดของการตรวจวัด และช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด รวมถึงผลของการรบกวนสัญญาณตรวจวัดจาก องค์ประกอบชนิดอื่น ๆ ที่พบในตัวอย่างอาหารสัตว์

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด โดยใช้สารมาตรฐานกลุ่มไนโตรฟูราน ได้แก่ สารมาตรฐานฟูราทาโดน (FTD) ฟูราโซลิโดน (FZD) และไนโตรฟูแรนโทอิน (NFT) แล้วทำการตรวจวัดด้วยระบบที่ได้พัฒนาขึ้น นำค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้ของแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐานกลุ่มไนโตรฟูราน (ΔI)

เมื่อ

$$\Delta I = I_0 - I_s$$

I_0 is the background ECL intensity of the $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{CdTe-QDs}$ system in the absence of NFs

I_s is the intensity in the presence of a standard or unknown sample with NFs, and C is the concentration of each nitrofurantoin (μM).

ผลการทดลองที่ได้พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้มีค่าอยู่ในช่วงความเข้มข้น 10-100 μM และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.995 สำหรับขีดต่ำสุดของการตรวจวัดคำนวณได้จากค่า $3\sigma/s$ เมื่อค่า s คือค่าความชันของกราฟมาตรฐานที่ได้ ส่วน σ คือค่าที่ได้จากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) ของจุดตัดแกน y (Ogren และคณะ. 2009). ในส่วนของความแม่นยำของวิธีการตรวจวัดได้จากการวัดสารมาตรฐานแต่ละชนิดของสารกลุ่มไนโตรฟูราน ที่ระดับความเข้มข้น 60 μM ทั้งหมด 15 ซ้ำ ผลที่ได้การศึกษาคูณลักษณะของวิธีการตรวจวัด แสดงดังตาราง 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาคูณลักษณะของการวิเคราะห์

Compounds	Regression equations ^a	Linear range (μM)	Correlation coefficient (r^2)	Detection limits (μM) ^b	Precision (%RSD) ^c
FTD	$\Delta I = (1.016 \pm 0.03)C + (116.1 \pm 2.61)$	10-100	0.998	0.40	0.61
FZD	$\Delta I = (1.340 \pm 0.02)C + (131.9 \pm 1.78)$	10-100	0.995	0.73	4.22
NFT	$\Delta I = (1.871 \pm 0.01)C + (49.7 \pm 0.79)$	10-100	0.995	0.60	3.10

a. $\Delta I = I_0 - I_s$, where I_0 is the background ECL intensity of the $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{CdTe-QDs}$ system in the absence of NFs; and I_s is the intensity in the presence of a standard or unknown sample with NFs, and C is the concentration of each nitrofurantoin (μM).

b. Detection limits calculated based on least squares calibration ($3\sigma/s$) c. Precision at each 60 μM of standards NFs ($n=15$).

สำหรับการศึกษาผลของการรบกวนสัญญาณตรวจวัดจากองค์ประกอบชนิดอื่น ๆ ที่อาจพบในตัวอย่างอาหารสัตว์ ซึ่งได้แก่ ไอออนบวก ไอออนลบ และยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่น ๆ ที่มีการเติมลงไปในการตรวจวัด จากการทดลองใช้สารมาตรฐานกลุ่มไนโตรฟูราน ที่ความเข้มข้น 60 μM หลังจากนั้นทำการเพิ่มความเข้มข้นของไอออนบวก ไอออนลบ และยาปฏิชีวนะลงไป พิจารณาสัญญาณตรวจวัดได้ เมื่อสัญญาณที่ได้ของสารมาตรฐานกลุ่มไนโตรฟูราน เพิ่มขึ้น หรือลดลง 5 % แสดงว่าความเข้มข้นของไอออนบวก ไอออนลบ และยาปฏิชีวนะดังกล่าวไปรบกวนสัญญาณการตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูราน

ผลการทดลองที่ได้พบว่าไอออน Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} จะรบกวนระบบการตรวจวัด เมื่อมีความเข้มข้นเป็น 1000 เท่า ของสารกลุ่มไนโตรฟูราน ที่ความเข้มข้น 60 μM ไอออน Ca^{2+} รบกวนระบบเมื่อมีความเข้มข้น เป็น 100 เท่า และ ไอออน NH_4^+ รบกวนระบบเมื่อมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ตามลำดับ ในส่วนของยาปฏิชีวนะนั้นพบว่าที่ความเข้มข้น 1000 เท่าของเพนิซิลินความเข้มข้น 100 เท่าของ นิโอมัยซิน และ คล็อกซาซิน ความเข้มข้น 10 เท่าของยา เตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน ส่วนคลอแรมฟินิคอลที่ความเข้มข้น 1 เท่า จะไปรบกวนสัญญาณการตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูรานได้ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวนี้ทำให้ทราบว่าวิธีการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมา ยังไม่มีความจำเพาะมากนักเมื่อเทียบกับเทคนิคทางด้านโครมาโทกราฟี แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าวิธีการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น มีความง่ายและไวซึ่งสามารถใช้สำหรับเป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นได้ ดังนั้นในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคของการสกัดด้วยของแข็ง (SPE) เข้ามาช่วยเพื่อที่จะทำการกำจัดสารรบกวนระบบการตรวจวัดก่อนการตรวจวัดได้

การตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูรานในตัวอย่างอาหารสัตว์

นำวิธีการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมาทำการตรวจวัดสารกลุ่มไนโตรฟูรานที่ตกค้างในตัวอย่างอาหารสัตว์ปีก และอาหารสุกร โดยทำการสุ่มจากร้านขายอาหารสัตว์ทั่วไปในจังหวัดเชียงใหม่ หลังจากนั้นทำการสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของแข็ง (SPE) ตามวิธีการของ Barbosa และคณะ (2007). และ Thongsrisomboon และคณะ 2010 เมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไประเหยให้แห้ง ละลายสายสกัดที่ได้ด้วย 5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.11 โมลาร์ แล้วจึงนำไปตรวจวัด ผลการวิเคราะห์จากวิธีที่พัฒนาขึ้นจะนำไปเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ตามวิธีการของ Barbosa และคณะ (2007) ผลการทดสอบที่ได้แสดงดังตาราง 6 พบว่าในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ทำการสุ่ม

ตรวจ พบสารฟูราลาโดน และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ในส่วนของการศึกษาความแม่นยำของวิธีการตรวจวัดทำได้โดยการเติมสารมาตรฐานกลุ่มไนโตรฟูรานในช่วงความเข้มข้น 25-85 μM ลงในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่เตรียมขึ้นมา แล้วทำการตรวจวัดด้วยวิธีการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมา ร่วมกับเทคนิคการสกัดแบบ SPE จากการทดลองพบว่าค่าร้อยละการกลับคืน (% recoveries) มีค่าตั้งแต่ 93.33-96.86 % ดังแสดงในตารางที่ 6 จากการตรวจวัดที่ได้สรุปได้ว่าวิธีการตรวจวัดที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมาสามารถใช้ในการตรวจสอบสารกลุ่มไนโตรฟูรานที่ตกค้างในอาหารสัตว์ที่ระดับความเข้มข้นตามมาตรฐานกำหนดได้ อย่างมีความแม่นยำ และเที่ยงตรง

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดสารฟูราลาโดนในอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์ และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Feed sample	Amount found (mg kg^{-1}) \pm SD		t-value
	ECL method ^a	HPLC method ^b	
Feed A	1.49 \pm 0.04	1.45 \pm 0.02	1.74
Feed B	1.54 \pm 0.05	1.50 \pm 0.10	0.59
Synthetics Feed1	1.85 \pm 0.02	1.81 \pm 0.02	2.50
Synthetics Feed2	1.90 \pm 0.05	1.88 \pm 0.03	0.43
Synthetics Feed3	1.97 \pm 0.06	1.95 \pm 0.04	0.48

Standard deviation from three determinations each, for the proposed method and the reference method.

a. LOD of ECL method = 0.06 mg kg^{-1} (0.40 μM).

b. LOD of HPLC method = 0.047 mg kg^{-1} .

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาร้อยละการกลับคืน (% recoveries) ของสารกลุ่มไนโตรฟูราน

Feed sample	Add (μM)	% Recoveries		
		FTD	FZD	NFT
Synthetics Feed	25	93.33 \pm 2.31	90.91 \pm 3.03	90.93 \pm 1.23
	55	95.76 \pm 2.78	96.43 \pm 1.38	97.51 \pm 1.12
	85	96.86 \pm 2.96	96.15 \pm 0.89	99.03 \pm 2.17

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาพบว่าเทคนิคอิเล็กโตรเคมีลูมิเนสเซนซ์สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารต้านจุลชีพกลุ่มไนโตรฟูรานได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุนาโนควอนตัมดอท L-cysteine-capped CdTe-QDs สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพของความเข้มแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ของ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ได้ สำหรับระบบการตรวจวัด $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / L-cysteine-capped CdTe-QDs/NFs โดยสารกลุ่มไนโตรฟูรานจะพบว่าการเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์แบบยับยั้งทำให้สัญญาณที่ได้มีค่าลดลงจากคุณสมบัติดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างกลุ่มไนโตรฟูรานที่ตกค้างในอาหารสัตว์ได้ ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นได้ไวขึ้น และวิธีการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ได้กับห้องปฏิบัติการที่ต้องการควบคุมคุณภาพของการส่งออกอาหารในเรื่องของปริมาณสารตกค้างได้ เป็นต้น

นอกจากนั้นจากการทดลองศึกษาผลการทดลองเพื่อหาความเป็นไปได้ในการใช้อุปกรณ์มีโซฟลิคส์แบบกระดาษในการวิเคราะห์สารปนเปื้อนแบบใช้แล้วทิ้ง ในเบื้องต้นนี้พบว่าการสร้างอุปกรณ์ดังกล่าวสามารถทำได้โดยใช้เครื่องพิมพ์แบบอิงค์เจต และให้ผลดี และอยู่ระหว่างการศึกษาเพื่อนำไปใช้ร่วมสารรูทีเนียมไบโพรดิล และอนุภาควอนตัมดอทชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นตัวเสริมปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ชนิดเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า โดยคาดว่าจะต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมอีกสักระยะหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

- พิเศษ นามจันทร์. เอกสารคำสอนวิชาเคมีคลินิก. Available from: http://www.rsu.ac.th/medtech/files/photometry54%20_1_.pdf, Accessed date: 4/9/55
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2540. การใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์บกและสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์. 66 น.
- ศูนย์ความเป็นเลิศด้านฟิสิกส์. ไมโครฟลูอิดิกส์(microfluidics). Available from:http://www.thep-center.org/src/qa_read.php?question_id=1, Accessed date: 3/9/2555
- Apilux, A., W. Siangproh, N. Praphairaksit and O. Chailapakul, Simple and rapid colorimetric detection of Hg(II) by a paper-based device using silver nanoplates. *Talanta*, 2012. **97**: p. 388-394.
- Barbosa, J., S. Moura. R. Barbosa and F. Ramando. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 2007, **586**: p. 359-367.
- Chen, H., L. Lin, H. Li, J.-M. Lin, Quantum dots-enhanced chemiluminescence: Mechanism and application, *Coordination Chemistry Reviews*, 2013, *in press*.
- Delaney, J. L., C. Horgan, J. Tianand and W. Shen, Electrogenerated Chemiluminescence Detection in Paper-Based Microfluidic Sensors. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**: p. 1300-1306.
- Draisci, R., L. Giannetti. L. Lucentini. L. Palleschi. G. Brambilla. L. Serpe and P. Gallo. Determination of nitrofur residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1997, **777**: p. 201-216.
- Fiorini, G. S. and D. T. Chiu, Disposable microfluidics devices: fabrication, function, and application, *BioTechniques* 2005, **38**: p. 429-446.
- Garcia-Campana A. M., and W. R. G. Baeyens, *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
- Ge, L., J. Yan, X. Song, M. Yan, S. Ge and J. Yu, Three dimension paper-based electrochemiluminescence immunodevice for multiplexed measurement of biomarkers and point-of-care testing, *Biomaterials*, 2012, **33**: p. 1024-1031.

- Jayawardane, B. M., I. D. McKelvie, S. D. Kolev, A paper-based device for measurement of reactive phosphate in water. *Talanta*, 2012. **100**: p. 454–460
- Jonsson, H., Microfluidics for lab-on-a-chip applications, M.S. Thesis in Engineering Physics. 2012, Lunds University. Lund.
- Laitip, N., Fabrication and Utilization of Microfluidic Device for Determination of Nitrite and Nitrate in Water and Soil Samples, M.S. Thesis in Chemistry, Faculty of Science. 2011, Mahidol University. p. 120.
- Li, Y.-S., Y.-D. Du, T.-M. Chen and X.-F. Gao. 2010. A novel immobilization multienzyme glucose fluorescence capillary biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6): 1382–1388.
- Liu, X., H. Jiang, J. Lei and H. Ju, Anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots and its energy transfer for detection of catechol derivatives. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**: p. 8055–8060.
- Martinez, A. W., S. T. Phillips, M. J. Butte, G.M. Whitesides, Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays, *Angewandte Chemie*, 2007, **46**(8): p. 1318–1320.
- Ong, S. E., S.Z. H. Du, Y. Fu, Fundamental principles and applications of microfluidic systems. Available from: <http://www3.ntu.edu.sg/mae/Research/Programmes/Thinfilms/pdffpapers/microfluidicsystems.pdf>, Accessed date: 9/09/2012
- Ogren, P. J., A. Meetze, W.C. Duer, The Limit of Detection in Generalized Least-Squares Calibrations: An Example Using Alprazolam Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Data, *Journal of Analytical Toxicology*, 33 (2009) 129.
- Paris, J.P. and W. W. Brandt. Charge transfer luminescence of a ruthenium(II) chelate. *Journal of American Chemical Society*, 1959 (81):5001–5002.
- Rattanarat, P., W. Dungchai, W. Siangproh, O. Chailapakul and C. S. Henry, Sodium dodecyl sulfate-modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **744**: p. 1–7.
- Richter, M. M., Electrochemiluminescence (ECL), *Chemical Reviews*, 2004, **104**: p. 3003–3036.
- Satturpinat, T., Fabrication and Utilization of microfluidic device for arsenic monitoring in water sample, M.S. Thesis in Chemistry, Faculty of Science. 2011, Mahidol University.

- Schilling, E., Basic Microfluidic Concepts. Available from: <http://faculty.washington.edu/yagerp/microfluidicstutorial/basicconcepts/basicconcepts.htm>, Accessed date: 9/09/2012
- Tokel, N. E. and A. J. Bard, Electrogenated chemiluminescence. IX. Electrochemistry and emission from systems containing tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride, *Journal of American Chemical Society*, 1972, **94**: p. 2862–2863.
- Thongsrisomboon, P., B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, S. Satienperakul, Determination of nitrofurans residues in animal feeds by flow injection chemiluminescence procedure, *Food Chemistry*, 123 (2010) 834.
- Verdon, E., P. Coueder and P. Sanders, Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry-In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. *Analalytica Chimica Acta* 2007, **586**: p. 336-345.
- Wang, X., X. Yin, and H. Cheng, Microflow injection chemiluminescence system with spiral microchannel for the determination of cisplatin in human serum, *Analytica Chimica Acta*, 2010. **678**(2): p. 135-139.
- Wang, J., H. Han, X. Jiang, L. Huang, L. Chen, and N. Li, Quantum dot-based near-infrared electrochemiluminescent immunosensor with gold nanoparticle-graphene nanosheet hybrids and silica nanospheres double-assisted signal amplification, *Analytical Chemistry*, 2012, **84**: p. 4893–4899.