



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคไมโครโฟลอะนาลิซิสสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อน
ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดร่วมกับการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์
**Development of Microflow Analysis Procedure for the Determination of
Selected Contaminant in Foods Based on Chemiluminescence Detection**

โดย

ศักดิ์ชัย เสดียรพีระกุล

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2554



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาเทคนิคไมโครฟลูอิดิกส์สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อน
ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดร่วมกับการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์

**Development of Microflow Analysis Procedure for the Determination of
Selected Contaminant in Foods Based on Chemiluminescence Detection**

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2552

จำนวน 280,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายศักดิ์ชัย เถียรพระกุล

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

17 / กุมภาพันธ์ / 2554

การพัฒนาเทคนิคไมโครฟลูอิดิกส์สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนใน
ผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดร่วมกับการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์

Development of Microflow Analysis Procedure for the Determination of
Selected Contaminant in Foods Based on Chemiluminescence Detection

ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล

Sakchai Satienperakul

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ได้ประดิษฐ์ระบบไมโครฟลูอิดิกขึ้นร่วมกับการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนร่วมกับอนุภาคนาโนทองคำ (AuNP/GODx) เพื่อพัฒนาขึ้นเป็นไบโอรีแอคเตอร์สำหรับการวิเคราะห์กลูโคสในของเหลวทางชีวภาพและเครื่องดื่ม กลูโคสออกซิเดส/ทองคำนาโนไบโอรีแอคเตอร์เตรียมขึ้นโดยการเคลือบผิวหน้าแท่งดินสอคาร์บอนด้วยสารละลายอนุภาคนาโนทองคำตามด้วยกลูโคสออกซิเดสและกลูตารัลดีไฮด์ตามลำดับ แล้วนำไปฝังลงในร่องของอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกที่ทำจากแผ่นอะคริลิกซึ่งแกะสลักด้วยแสงเลเซอร์ที่มีขนาดยาว 20 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร และลึก 150 ไมโครเมตร เมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่มีกลูโคสอยู่เข้าไปยังอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกก็จะเกิดปฏิกิริยา เปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนไบโอรีแอคเตอร์ จากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็จะถูกตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์ของลูมินอล/โคบอลต์ (II) ในสถานะต่าง ส่วนเพอร์สตาติคปั๊มจะถูกใช้เพื่อปั๊มสารละลายตัวพาและรีเอเจนต์เข้าสู่ระบบ จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมทั้งทางกายภาพและทางเคมีเพื่อให้ได้สถานะของระบบไมโครฟลูอิดิกโพลีเมอไรเซชันเคมีลูมิเนสเซนซ์ที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด โดยช่วงความเป็นเส้นตรงของความเข้มแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของกลูโคสอยู่ในช่วง 0.5×10^{-4} ถึง 12.0×10^{-4} โมลาร์ ($r^2 = 0.9941$) และพบว่ามีขีดจำกัดของการตรวจวัด (3 σ) เท่ากับ 1.0×10^{-5} โมลาร์ กลูโคสออกซิเดส/ทองคำนาโนไบโอรีแอคเตอร์นี้สามารถใช้ได้ 15 วัน เมื่อยังคงมีการตอบสนองเคมีลูมิเนสเซนซ์มากกว่า 50% เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีที่ได้นำเสนอนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและว่องไวสูงต่อการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างชีวมวลและเครื่องดื่มให้พลังงานต่างๆ

ABSTRACT

A microfluidic (μ FI) system incorporating a carbon rod immobilized with gold nano particle/glucose oxidase (AuNP/GODx) was developed as a bioreactor for the determination of glucose in biological fluids and beverages. The AuNP/GODx bioreactor was prepared by drop casting gold nano particle solution on the surface of pencil carbon rod followed by glucose oxidase and glutaraldehyde activation. The AuNP/GODx bioreactor was then loaded into a laser engraved planar acrylic microfluidic device that was 20 mm long, 2 mm wide and 150 μ m deep channel. When the sample containing glucose was injected into the microfluidic device, it reacted by changing into hydrogen peroxide due to enzymatic activity of AuNP/GODx bioreactor. From there, the chemiluminescence (CL) reaction of luminol/ Co^{2+} was examined in various conditions. After the carrier and reagent solutions, were pumped using the peristaltic pump, the appropriate physical and chemical parameters were thoroughly investigated to obtain the optimum μ FI-CL conditions in a CL intensity linear relationship with glucose concentrations from 0.5×10^{-4} to $12.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($r^2 = 0.9941$) and was found that detection limit (3σ) was equivalent to $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. The AuNP/GODx bioreactor could be used within 15 days when CL response was more than 50% at the storage temperature of 4°C . This method was shown to provide a high selectivity and sensitivity towards quantitative analysis of glucose in the blood serum and energy drink samples.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาเทคนิคไมโครโฟลอะนาไลซิสสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดร่วมกับการตรวจวัดแบบเคมีภูมิเนสเซนส์ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ช่วยสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์สำหรับการดำเนินงาน จนกระทั่งงานทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นอกจากนี้ขอขอบคุณ ดร.ชานินทร์ แดงกวารัมย์ ดร.ภูสิต ปุณณณ ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษา นางสาววัชรินทร์ สีละมัด นางสาวนิตา ศิริเขียว นายอาสาพร พรหมมินตะ ผู้ช่วยวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมีตลอดการทดลอง จนทำให้งานทดลองสำเร็จอย่างสมบูรณ์

ผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2554



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	8
การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ	8
การประดิษฐ์อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิก	9
การประกอบระบบไมโครฟลูอิดิกโพลีเมอริกเจลบนเคมีลูมินเนสเซนซ์	10
การตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนร่วมกับอนุภาคนาโน	11
การศึกษาความเป็นไปได้ของระบบไมโครฟลูอิดิกที่มีการตรวจวัดแบบเคมีลูมินเนสเซนซ์	12
การศึกษาความสามารถของระบบการวิเคราะห์กลูโคสด้วยการปรับปรุงแท่งคาร์บอนด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสร่วมกับอนุภาคนาโนทองคำสำหรับเป็นไบโอรีแอคเตอร์ที่มีการตรวจวัดแบบ μ FI-CL	16
การศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนที่สำคัญ	20
การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด	20
การหาลอยละการกลับคืน	22
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	22
การหาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยระบบ μ FI-CL	23
การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำสำหรับเป็นตัวเชื่อมต่อการตรึงเอนไซม์	31
	หน้า

การทดสอบการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนด้วยอนุภาคนาโนทองคำสำหรับใช้เป็นไบโอรีแอคเตอร์ในการตรวจวัดแบบไมโครฟลูอิดิ	
โพลีอินเจกชันเคมีลูมิเนสเซนซ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส	33
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์	33
การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์	43
การศึกษาค่าความแม่นยำของเครื่องมือ	44
การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้	45
การศึกษาค่าพิสัยของสารรบกวนที่สำคัญ	47
การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด	48
การหาค่าร้อยละการกลับคืน	49
สรุปผลการวิจัย	50
ข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม	54



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างการใช้ไมโครโพลในการวิเคราะห์กลูโคสและสารต่างๆ ในของเหลวทางชีวภาพ	6
2 ตัวอย่างการใช้ไมโครโพลในการวิเคราะห์สารต่างๆ ที่มีการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนส์	7
3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	8
4 อัตราส่วนของทอง (III) คลอไรด์ไตรไฮเดรตต่อไตรโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรตในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ	9
5 สภาวะที่ใช้ในการหาค่าวิเคราะห์สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$	12
6 สภาวะที่ใช้ในการหาค่าวิเคราะห์สารละลายกลูโคส ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ด้วยระบบ AuNP/GODx	16
7 การเปิดสารที่นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีมาตรฐาน	21
8 สภาวะเริ่มต้นในการทดสอบระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	24
9 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$	29
10 ผลการศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$	30
11 สภาวะเริ่มต้นในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยระบบ AuNP/GODx	34
12 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยระบบ AuNP/GODx	40
13 ผลการศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กลูโคส	41
14 ผลการศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือ AuNP/GODx	44
15 การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกใน 1 วัน	45
16 การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกใน 15 วัน	46
17 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนที่สำคัญ	48
18 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด โดยวิธี AuNP/GODx เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน	49
19 ร้อยละการกลับคืนของกลูโคสในตัวอย่างซีรัม	49

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเบต้า-ดี-กลูโคส	2
2	ระบบการตรวจวัดแบบ laser-induced fluorescence ดำแสงกระตุ้นถูกผลิตด้วย argon ion laser light ซึ่งจะถูกโฟกัสด้วยเลนส์	5
3	ลายวงจรของไมโครฟลูอิดิกซ์สำหรับวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	9
4	ลายวงจรของไมโครฟลูอิดิกซ์สำหรับวิเคราะห์กลูโคส	10
5	ระบบ μ FI-CL สำหรับวิเคราะห์กลูโคส และภาพถ่าย	11
6	การตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนร่วมกับอนุภาคทองคำนาโน	12
7	การออกซิไดส์ลูมินอลด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโคบอลต์ (II) ไปเป็นสารตัวกลาง	23
8	การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ง่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์	24
9	การศึกษาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)	25
10	การศึกษาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	26
11	การศึกษาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)	26
12	การศึกษ้อัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา	27
13	การศึกษ้อัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์	27
14	การศึกษ้อัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)	28
15	การศึกษาปริมาณสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ และ อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	28
16	ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยระบบ μ FI-CL	30
17	พิกัดสัญญาณ μ FI-CL ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	31
18	สารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ในอัตราส่วนต่าง ๆ	31
19	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่อัตราส่วนต่าง ๆ	32
20	ระบบไมโครฟลูอิดิกโฟลอินเจกชันเคมีลูมินเนสเซนซ์ สำหรับวิเคราะห์กลูโคส	33
21	การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ง่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์	34
22	การศึกษาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)	35

ภาพ	หน้า
23 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	36
24 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	36
25 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	37
26 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	38
27 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์ และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	38
28 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	39
29 การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสม และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง	40
30 ผลการศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กลูโคส	42
31 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส	42
32 พิกัดสัญญาณ $\mu\text{FI-CL}$ ของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	43
33 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในการวิเคราะห์กลูโคสโดยวิธี AuNP/GODx	43
34 สัญญาณ $\mu\text{FI-CL}$ ในการศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือ	45
35 สัญญาณ $\mu\text{FI-CL}$ ในการทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกใน 1 วัน	46
36 ตัวอย่างสัญญาณ $\mu\text{FI-CL}$ ในวันที่ 2 ของการทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกใน 15 วัน	47
37 สรุปกลไกการเกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ด้วยไบโอรีแอคเตอร์กลูโคสออกซิเดส/ทองนาโน	50

คำนำ

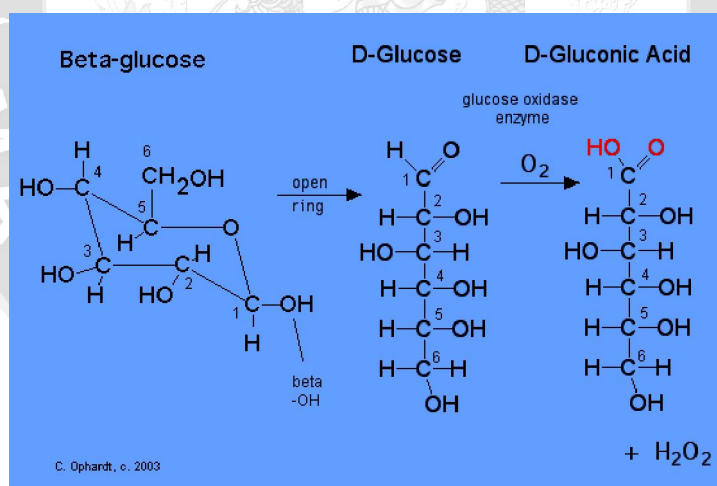
วิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมไม่ว่าจะเป็นวิธีวิเคราะห์ทางเคมีหรือการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ จะเป็นวิธีการวิเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง (batch wise methods) ต้องอาศัยผู้ปฏิบัติการหรือนักวิจัยเป็นจำนวนมากในการชั่งตวงวัดสารละลาย ซึ่งอาจเป็นสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ ชนิดต่างๆ ใส่ในภาชนะที่เหมาะสม เช่น ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลอง หรือเซลล์ของเครื่องมือเฉพาะใดๆ โดยใช้เครื่องมือตวงวัดที่เหมาะสม เช่น บิวเรต ปิเปต หรือกระบอกตวง เป็นต้น การวัดผลเกิดจากปฏิกิริยาโดยอ่านจากมิเตอร์ของเครื่องตรวจวัดและการใช้นาฬิกาจับเวลา เมื่อพิจารณาขั้นตอนของการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมจะเห็นได้ว่าความเที่ยง และความแม่นยำ ของผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมขึ้นอยู่กับฝีมือและความชำนาญของผู้ปฏิบัติการ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าความคลาดเคลื่อนจากการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมนั้นเกิดจากผู้ทำการทดลองเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมต้องใช้เวลาในการทำทดลองนาน อีกทั้งต้องใช้สารเคมีในปริมาณมากและมีการผลิตของทิ้งหรือเสียในปริมาณมาก ซึ่งสารเคมีที่ใช้หลังจากวิเคราะห์แต่ละครั้งย่อมมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ เช่น เกิดมลภาวะทางน้ำและทางอากาศ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงเคมีสะอาดเพื่อลดการใช้สารเคมีและสารตัวอย่าง ตลอดจนควบคุมให้เกิดของเสียน้อยที่สุดทำได้ด้วยความรวดเร็วและให้ข้อมูลเป็นที่เชื่อถือได้แนวทางในการนำไปสู่การบรรลุเป้าหมายคือ การพัฒนาเทคนิคอัตโนมัติ

การพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาถูกลงที่มีการลดการใช้สารตัวอย่างและสารเคมีที่มีพิษและหาสารทดแทนที่มีพิษน้อยหรือไม่มีพิษจึงเป็นงานวิจัยที่เป็นที่สนใจในแวดวงนักวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน เทคนิคที่นักเคมีวิเคราะห์มีความสนใจและแข่งขันกันในการพัฒนามากที่สุดคือเทคนิคการวิเคราะห์แบบการไหลชนิด หรือโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส (flow injection analysis) หรือนิยมเรียกย่อ ๆ ว่าเอฟไอเอ (FIA) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติควบคู่กับเทคนิคการไหลชนิด ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเคมีสะอาด (greener analytical chemistry)

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเคมีสะอาดในปัจจุบันที่ใช้แนวทางในการวิจัยโดยอาศัย การลดขนาดหรือการย่อส่วนเชิงเคมี (miniaturization in chemistry) หรือเรียกใหม่ว่า แล็บ-ออน-อะ-ชิพ ซึ่งมีชื่อเรียกหลายรูปแบบคือ ระบบไมโครโททัลอะนาไลซิส (micro total analysis) หรือเรียกย่อ ๆ เป็น μ TAS ระบบไมโครฟลูอิดิก (microfluidic system) หรือไมโครโฟลอะนาไลซิส (micro flow analysis) ส่วนประกอบหลักสำคัญของเทคนิคนี้คือการออกแบบและประดิษฐ์อุปกรณ์สำหรับทำปฏิกิริยาขนาดจิ๋ว หรือที่เรียกว่าไมโครรีแอกเตอร์ (micro reactor) ใน

กรณีส่วนมากจะทำการย่อส่วนระบบการไหลหรือเอฟไอเอไว้บนแผ่นวัสดุที่เรียกว่าชิพ (chip) ซึ่งอาจเป็นแก้ว พลาสติกหรือโลหะเพื่อปฏิกิริยาเคมีซึ่งมีขนาดเล็ก ๆ ไม่เกิน 3-4 ซม. สารที่เข้าทำปฏิกิริยาเคมีชนิดต่างๆ จะไหลด้วยอัตราการไหลที่ต่ำมากในระดับไมโครลิตรต่อนาที ซึ่งจะมาบรรจบกันที่ตำแหน่งเดียวกันบนชิพ ส่งผลให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นบนชิพ บนพื้นที่ขนาดเท่ากับเหรียญหนึ่งบาทเท่านั้น ซึ่งเป็นที่มาของชื่อเทคนิคนี้ว่าไมโครฟลูอิดิกส์ ระบบนี้ใช้สำหรับนำสารเคมีเข้าสู่เครื่องตรวจวัดชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับเทคนิคเอฟไอเอ แต่ประสิทธิภาพเคมีทั้งที่เป็นสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ตั้งแต่ 1,000 เท่าขึ้นไป (จากไมโครลิตรเป็นนาโนลิตร) สำหรับตัวตรวจวัด (detector) ที่ใช้ในไมโครฟลูอิดิกส์อะนาลิซิส มีได้หลากหลายชนิดคล้ายคลึงกับดีเทคเตอร์ที่ใช้ในงานในระบบฟลูอิดิกส์อะนาลิซิส แต่ดีเทคเตอร์ที่เป็นที่นิยมใช้มากได้แก่ เครื่องตรวจวัดเชิงไฟฟ้าเคมีและเครื่องตรวจวัดเชิงแสง

การวัดระดับน้ำตาลในเลือดสามารถวัดได้โดยการใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสซึ่งจำเพาะต่อ ดี-กลูโคสเท่านั้น เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งหมายถึงว่ามันสามารถถูกออกซิไดส์ได้โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะกระตุ้นออกซิเดชันของเบต้า-ดี-กลูโคส (β -D-glucose) ไปเป็นกรดดี-กลูโคนิก (D-gluconic acid) โดยอัลฟา-ดี-กลูโคส (α -D-glucose) สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบเบต้า (beta form) ได้ ดังนั้นกลูโคสในเลือดทั้งหมดจึงวัดได้ในคราวเดียวกัน ดังภาพ 1



ภาพ 1 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเบต้า-ดี-กลูโคส

ที่มา : Swoboda and Massey (1965)

จากภาพ 1 ออกซิเจนสองอะตอมจากอากาศซึ่งเป็น oxidizing agent จะเข้าทำปฏิกิริยากับ glucose reducing agent เมื่อวงแหวนเปิดออกและคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ซึ่งเป็นหมู่อัลดีไฮด์กลายเป็นกรดดี-กลูโคนิก ในขณะที่ตัวออกซิเจนในน้ำก็จะกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂)

นอกจากนั้นเมื่อนำ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นมาทำปฏิกิริยากับลูมินอลสามารถเกิดปฏิกิริยาโดยมีสารออกซิแดนท์ให้สารผลิตภัณฑ์ที่สภาวะเร็ว จากนั้นสารผลิตภัณฑ์ที่สภาวะเร็วจะเปล่งพลังงานออกมาในรูปของพลังงานแสง ซึ่งสามารถที่จะวัดความเข้มของคลื่นแสงที่เปล่งออกมาโดยใช้ตัวตรวจวัด (detector) ที่เหมาะสม เช่น หลอดขยายสัญญาณแสง (photomultiplier tube) เป็นต้น เรียกคลื่นแสงที่เปล่งออกมาว่าเคมีลูมินเนสเซนซ์ซึ่งการตรวจวัดการเกิดเคมีลูมินเนสเซนซ์ที่คายออกมาด้วยหลอด PMT สามารถวัดปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นหรือปริมาณศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงได้

ด้วยความก้าวหน้าทางด้านนาโนเทคโนโลยีสำหรับการพัฒนาโครงสร้างขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร เช่น nanospheres, nanofibers และ nanotubes เป็นต้น ได้รับความสนใจสำหรับการนำมาใช้ตรึงเอนไซม์ ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูป คือ ลดข้อจำกัดในการแพร่ และเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จะอาศัยความสัมพันธ์ของการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อทำการออกซิไดส์กลูโคสในตัวอย่างด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ถูกตรึงอยู่บนวัสดุรองรับแท่งคาร์บอนที่มี กลูตารัลดีไฮด์และทองนาโนเป็นตัวช่วยในการปรับปรุงการติดของเอนไซม์กับวัสดุรองรับ โดยที่ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะแปรผันโดยตรงกับแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ที่เปล่งออกมาจากปฏิกิริยาของลูมินอลในสารละลายต่างที่ตรวจวัดได้ด้วยระบบไมโครฟลูอิดที่มีระบบตรวจวัดชนิดเคมีลูมินเนสเซนซ์ จากนั้นทำการประดิษฐ์ไมโครฟลูอิดอย่างง่ายโดยใช้แผ่นอะคริลิกในการทดสอบปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้ววิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของระบบเพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์กลูโคสด้วย AuNP/GODx ไบโอดีแอคเตอร์ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเคมีลูมินเนสเซนซ์ โดยศึกษาตัวแปรทางกายภาพ เช่น อัตราเร็วของกระแสตัวพา กระแสรีเอเจนต์ลูมินอล กระแสโคบอลต์ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในระบบ และตัวแปรทางเคมีอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของกระแสตัวพา กระแสรีเอเจนต์ลูมินอล กระแสโคบอลต์ เป็นต้น และทำการศึกษาผลของสารรบกวนต่างๆ ที่อาจกระทบต่อการวิเคราะห์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ตัวอย่างกลูโคสในอาหารและของเหลวทางชีวภาพเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ในรายงานครั้งนี้จะนำไปสู่วิธีการวิเคราะห์กลูโคสที่มีความสะดวกและแม่นยำถูกต้องมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

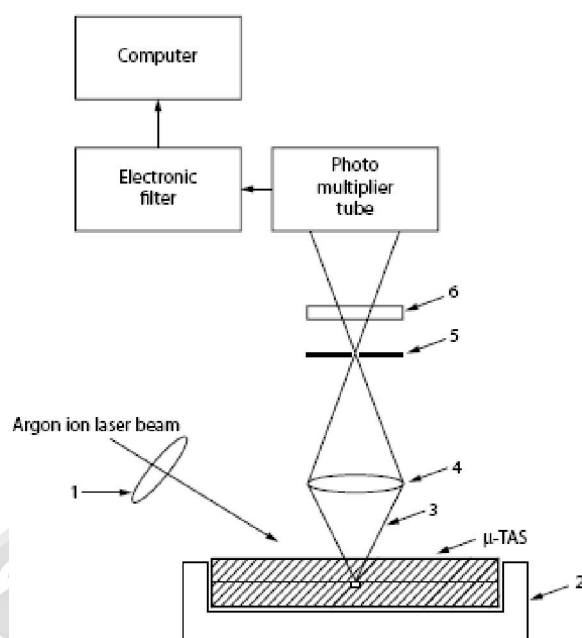
1. เพื่อออกแบบและสร้างเครื่องมือราคาถูกลงแต่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการตรวจวิเคราะห์กลูโคสด้วยเทคนิคไมโครฟลูอิดิกส์หรือแล็บออนชิป (Lab-on-chip) แบบใหม่ที่มีส่วนตรวจวัดที่มีสภาพไวสูงชนิดเคมีลูมินเนสเซนซ์
2. เพื่อนำเอาเครื่องมือและเทคนิคที่พัฒนาขึ้น มาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์กลูโคสในสารตัวอย่างทางชีวภาพ
3. เพื่อศึกษาและสร้างองค์ความรู้ใหม่ โดยเน้นในด้านเคมีวิเคราะห์สมัยใหม่ ที่ใช้เครื่องมือราคาถูกลงและสารเคมีน้อย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานในสาขาเคมีวิเคราะห์ที่เป็นการปรับปรุงความไวของกลูโคสเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสอาหารและในเลือด ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ที่ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย

การตรวจเอกสาร

ในการวิเคราะห์สารต่างๆ โดยใช้ไมโครฟลูอิดิกส์ได้มีงานวิจัยหลายงาน ที่ได้ทำการวิเคราะห์กลูโคสและสารต่างๆ ในตัวอย่างที่หลากหลายด้วยกัน เช่น การวิเคราะห์กลูโคสในซีรัม การวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์นั้นจะขึ้นอยู่กับสมบัติและปฏิกิริยาของสารที่ต้องการวิเคราะห์ รวมด้วยเครื่องตรวจวัดแบบต่างๆ ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจวัดหลายชนิดที่เหมาะสมสำหรับรูปแบบการวิเคราะห์ขนาดเล็กได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับฟลูอิดิกไมโครชิปด้วย ซึ่งรวมถึงการตรวจวัดเชิงแสง การตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้า และเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ด้วย (Karlinsey and Lander, 2008) ในการตรวจวัดเชิงแสง ระบบตรวจวัดที่ถูกนำมาใช้โดยทั่วไปมากที่สุดสำหรับการประยุกต์ใช้กับไมโครชิป คือ laser-induced fluorescence (LIF) โดยใน LIF ลำแสงกระตุ้นจะถูกผลิตจากเลเซอร์เพื่อเพิ่มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่จะถูกวัดและเพื่อลดจำนวนของลำแสงกระตุ้นที่จะเข้าไปในโฟโตดีเทกเตอร์ จึงได้มีการใช้ band-pass emission filters ดังภาพ 2



ภาพ 2 ระบบการตรวจวัดแบบ laser-induced fluorescence ถ้าแสงกระตุ้นถูกผลิตด้วย argon ion laser light ซึ่งจะถูกโฟกัสด้วยเลนส์

(1) ไปบนร่องสำหรับแยกในไมโครชิพซึ่งถูกยึดไว้บน Plexiglas holder

(2) การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์

(3) ซึ่งจะถูกรวมด้วย microscope objective

(4) แล้วถูกโฟกัสไปบน spatial filter

(5) emission filter

(6) แล้วจึงถูกตรวจวัดด้วยหลอด PMT

ที่มา : Karlinsey and Lander (2008)

การตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้าเป็นเทคนิคการตรวจวัดที่อาศัยหลักการวัดทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งรวมถึงการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าในโพเทนชิโอเมตรี การวัดความต้านทานในคอนดักติวิตี การวัดกระแสในแอมเปอร์โรเมตรี และการวัด current-voltage profile ในโวลต์แทมเมตรี ตัวอย่างเช่นการใช้ไมโครฟลูอิดิกโฟลเซลล์ร่วมกับการตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้า (โวลต์แทมเมตรี) ในการวิเคราะห์ไดโพลีโรนของกลุ่มวิจัย Daniel and Gutz (2003) ในตาราง 1

แต่เนื่องจากการตรวจวัดโดยใช้เครื่องมือที่กล่าวมาข้างต้นมักพบว่ามีราคาสูง จึงนำไปสู่การตรวจวัดที่มีราคาข่อมเยว่แต่ยังคงมีประสิทธิภาพที่ดีอยู่ จึงพบว่ามีงานวิจัยจำนวนมากที่นำการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์มาใช้ร่วมกับฟลูอิดิกไมโครชิพเพื่อการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารต่างๆ เช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กลูโคส เป็นต้น ซึ่งได้สรุปไว้ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 1 ตัวอย่างการใช้ไมโครโพลในการวิเคราะห์กลูโคสและสารต่างๆ ในของเหลวทางชีวภาพ

ตัวอย่างที่ศึกษา	สารที่ใช้ทำปฏิกิริยา	ระดับความเข้มข้นที่วัดได้	ขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์	เอกสารอ้างอิง
กลูโคสในซีรัม	Fluorescene isothiocyanate-labeled bovin serum albumin (FITC-BSA)	0-0.8 และ 0-30.0 mmol L ⁻¹	6.5 μmol L ⁻¹	Qing Zhang et al., 2006
กลูโคส	4-amino antipyrine (4-AAP), N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine (TOPS), peroxidase	9-100 mg dL ⁻¹	9-15 mg dL ⁻¹	Vijay Srinivasav et al., 2004
เซลล์เม็ดเลือดแดงและ เซลล์เม็ดเลือดขาว	EDTA-K ₂ และ 0.9% NaCl	เซลล์เม็ดเลือดแดง >95% เซลล์เม็ดเลือดขาว 27.4%	-	Xing Chen et al., 2007
กลูโคส	Resolufin fluorescene, Horseradish peroxidase	10-250 mg dL ⁻¹	-	Jeong Y. Kim et al., 2006
ไดไฟโรน	K ₃ Fe(CN) ₆ , KCl, 0.1 M NaAc/HAc	1.35 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹	-	Daniela Daniel et al., 2003
กลูโคส	Ferrocenecarboxylic acid	0-5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹	-	Jingxian Yu et al., 2008

ตาราง 2 ตัวอย่างการใช้ไมโครโพลในการวิเคราะห์สารต่างๆ ที่มีการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนส์

ตัวอย่างที่ศึกษา	สารที่ใช้ทำปฏิกิริยา	ระดับความเข้มข้นที่วัดได้	ขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์	เอกสารอ้างอิง
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	Peroxyoxalate	-	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Xuhua Wang et al., 2006
C-reactive protein (CRP) cardiac และ inflammation marker	CRP antigen, IgG, HRP (horseradish peroxidase) enzyme	-	0.1 mg L^{-1}	A. Bhattacharyya และ C.M. Klapperich 2007
กลูโคส	Glucose oxidase, luminol และ ferricyanide	1.1-110 mmol L^{-1}	0.1 mmol L^{-1}	Yi Lv et al., 2003
ดีเอ็นเอ	Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (HRP-SA)	-	0.5 nmol L^{-1}	Y. Sunaga et al., 2007
Alpha-fetoprotein (AFT)	Rabbit AFT antibody, horseradish peroxidase labeled goat antirabbit AFT antibody, luminal	1-800 ng mL^{-1}	0.23 ng mL^{-1}	Hui Huang et al., 2008
Promethazine	Promethazine-luminol-potassium ferricyanide chemiluminescence system	1.0×10^{-8} - 1.0×10^{-6} g mL^{-1}	1.6×10^{-9} g mL^{-1}	Yi Xu et al., 2009

อุปกรณ์และวิธีการ

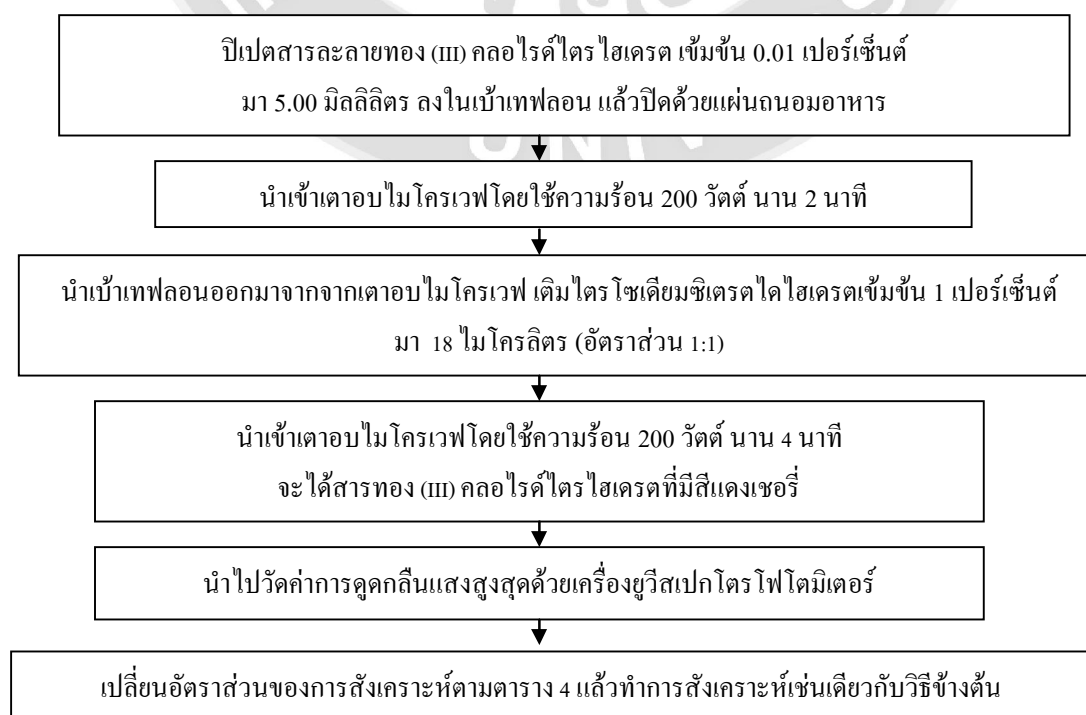
ในการศึกษาวิจัยนี้ มีเครื่องมือและอุปกรณ์ ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตาราง 3 ตามลำดับ

ตาราง 3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ-อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
1. Digital multimeter	Uni-Trend, UT60D	Hong Kong
2. Flow-rated tygon pump tube	TACS	Australia
3. Four-channeled peristaltic pump	Gilson	France
4. High voltage power supply	Sentech, PM20	UK
5. Mars carbon 5B	Staedtler	Germany
6. pH meter	Metrohm, 827 pH lab	Switzerland
7. Photomultiplier tube	Thorn-EMI 9878SB	USA
8. Platinum auxiliary electrode	Sigma	USA
9. Six-port injection valve	Upchurch Scientific	France
10. Ultrasonic bath	Ney Dental Inc., 136H	
11. UV Spectrophotometer	Hitachi, U-2900	Japan

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ

สามารถเตรียมได้จากวิธีไมโครเวฟที่รายงานโดย Tangkuarum et al. 2007 ดังแผนภาพ



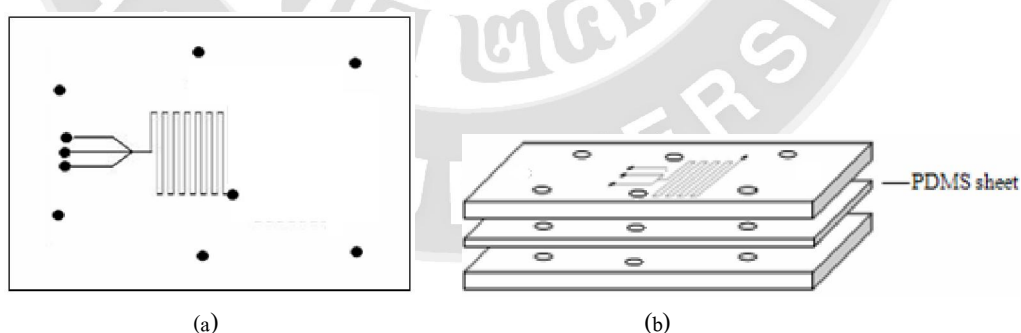
ตาราง 4 อัตราส่วนของทอง (III) คลอไรด์:ไตรไฮดรตต่อไตรโซเดียมซัลเฟต:ไตรไฮดรตในการ
สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ

อัตราส่วน	ทอง (III) คลอไรด์:ไตรไฮดรต เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตร)	ไตรโซเดียมซัลเฟต:ไตรไฮดรต เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครลิตร)
1:1	5	18
1:5	5	92
1:10	5	184
1:15	5	276
1:20	5	368

การประดิษฐ์อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิก

1. อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกสำหรับการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไมโครฟลูอิดิกชิปประกอบด้วยแผ่นอะคริลิก 2 แผ่น ที่แกะสลักลายวงจรด้วยแสงเลเซอร์บนแผ่นใดแผ่นหนึ่ง การประดิษฐ์อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกทำโดยใช้โปรแกรม Adobe illustration 10 ในการออกแบบลวดลาย จากนั้นนำไปเจาะด้วยสว่านเพื่อเชื่อมต่อเข้ากับท่อต่อเชื่อม ดังภาพ 3 จากนั้นนำแผ่นอะคริลิกทั้งสองแผ่นนี้มาประกบกันแบบแซนด์วิช โดยมีแผ่น PDMS แทรกระหว่างกลาง จากนั้นขันให้พอดีด้วยสกรู



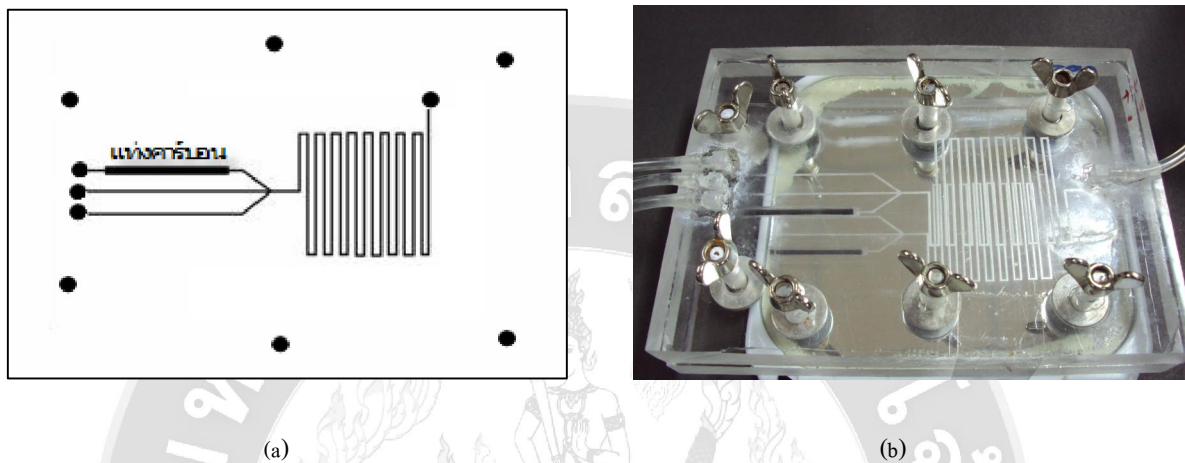
ภาพ 3 ลายวงจรของไมโครฟลูอิดิกชิปสำหรับวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

(a) ลายวงจรจากมุมมองด้านบน (b) แผ่นชิปจากมุมมองด้านข้าง

2. อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกสำหรับการวิเคราะห์กลูโคสด้วย AuNP/GODx

ไบโอรีแอคเตอร์

การประดิษฐ์อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกสำหรับการวิเคราะห์กลูโคสมีวิธีทำโดยเพิ่มส่วนไมโครคอลลัมน์เพื่อทำการฝังแท่งคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์สำหรับใช้เป็นไบโอรีแอคเตอร์ในการวิเคราะห์กลูโคสลงไปในชิพ ดังภาพ 4



ภาพ 4 ลายวงจรของไมโครฟลูอิดิกชิพสำหรับวิเคราะห์กลูโคส

(a) ลายวงจรจากมุมมองด้านบน (b) ภาพถ่ายแผ่นชิพที่ใช้ในการศึกษา

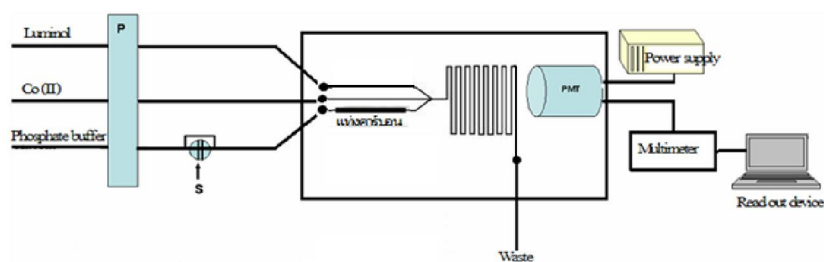
การประกอบระบบไมโครฟลูอิดิกโพลีเมอร์เจคชันเคมีลูมินเนสเซนซ์

1. ระบบ μ FI-CL สำหรับทดสอบระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

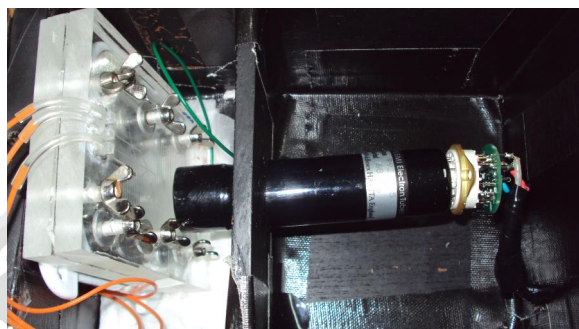
นำไมโครฟลูอิดิกชิพที่ประดิษฐ์ขึ้นมาประกอบเข้ากับอุปกรณ์ต่างๆ ให้เป็นระบบ μ FI-CL ซึ่งประกอบด้วยภาชนะบรรจุสารละลายตัวพา รีเอเจนต์ และสารละลายมาตรฐาน เพอร์ออกไซด์ ปัมป์ เครื่องตรวจวัดและเครื่องบันทึกสัญญาณ ดังภาพ 4 และวางกระบอกเงาไว้ด้านหลังของไมโครฟลูอิดิกชิพ (Leanne Marle and Gillian M. Greenway, 2005) เพื่อเพิ่มสัญญาณที่เกิดขึ้นเพื่อทดสอบการทำงานของระบบ μ FI-CL โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารตัวอย่างในการทดสอบ

2. ระบบ μ FI-CL สำหรับวิเคราะห์กลูโคส (AuNP/GODx)

นำไมโครฟลูอิดิกชิพที่ประดิษฐ์ขึ้นมาประกอบเข้ากับอุปกรณ์ต่างๆ ให้เป็นระบบ μ FI-CL ที่มีแท่งคาร์บอนปรับปรุงด้วย AuNP/GODx เป็นส่วนของไบโอรีแอคเตอร์สำหรับการวิเคราะห์กลูโคส ร่วมกับการตรวจวัดแบบเคมีลูมินเนสเซนซ์ ดังภาพ 5



(a)



(b)

ภาพ 5 ระบบ μ FI-CL สำหรับวิเคราะห์กลูโคส และภาพถ่าย

(a) ระบบ μ FI-CL สำหรับวิเคราะห์กลูโคส (b) ภาพถ่าย

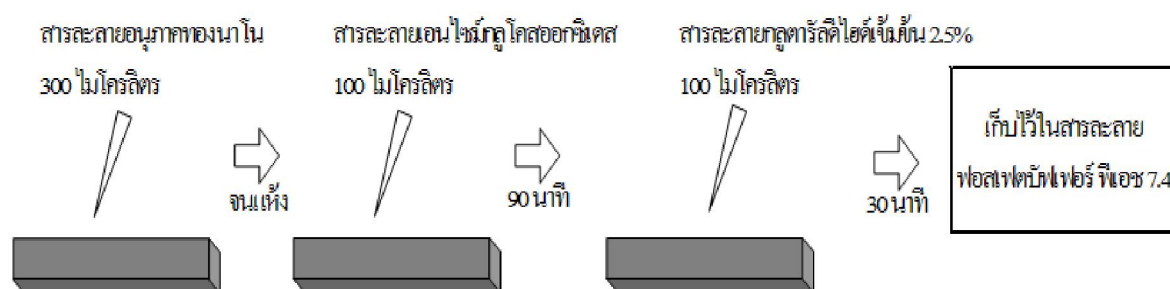
P = peristaltic pump

S = standard

PMT = photomultiplier tube

การตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนร่วมกับอนุภาคทองคำนาโน

เหลาแท่งคาร์บอนให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ให้มีความยาว 2.5 เซนติเมตร ขัดผิวหน้าด้วยกระดาษทรายอย่างละเอียด ล้างให้สะอาดด้วยน้ำปราศจากไอออน ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู แล้วนำมาเคลือบด้วยสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง ปิดเตาละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนแท่งคาร์บอนที่แห้งแล้วนี้ วางทิ้งไว้ 90 นาที จากนั้นปิดเตาละลายกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ มา 100 ไมโครลิตร ลงบนแท่งคาร์บอนแล้วเกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้ 30 นาที นำมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.015 โมลาร์ (พีเอช 7.4) แล้วเก็บไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์นี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำออกมาใช้ ดังแสดงในภาพ 6



ภาพ 6 การตรึงอนุภาคทองคำนาโนบนแท่งคาร์บอนร่วมกับอนุภาคทองคำนาโน

การศึกษาความเป็นไปได้ของระบบไมโครฟลูอิดิกที่มีการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์

1. การศึกษาการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ในระบบ $\mu\text{FI-CL}$ โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวอย่างในการทดสอบระบบ

จากบทความวิจัยของ Zhou et al. (1999) พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถเกิดปรากฏการณ์เคมีลูมิเนสเซนซ์ได้กับสารละลายลูมินอลในสถานะที่เป็นต่าง จึงได้ทำการทดลองใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายลูมินอลในสถานะที่เป็นต่าง ที่ใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ในระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ดังแสดงในภาพ 5 เพื่อพัฒนาให้ระบบไมโครฟลูอิดิกร่วมกับเคมีลูมิเนสเซนซ์มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น โดยนำสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ มาทดลองฉีดวิเคราะห์ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ด้วยสถานะที่แสดงในตาราง 5 โดยมีกระแสตัวพาเป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

ตาราง 5 สถานะที่ใช้ในการฉีดวิเคราะห์สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$

Parameter	สถานะที่ศึกษา
1. Luminol solution	$2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
2. Co (II) solution	$1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
3. Phosphate buffer solution	0.025 mol L^{-1}

ในเบื้องต้นของการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการหาสถานะที่เหมาะสมของตัวแปรชนิดต่างๆ ทั้งตัวแปรทางกายภาพและทางเคมีของระบบ $\mu\text{FI-CL}$ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็น

เครื่องมือตรวจวัดและประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้การตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนส์ต่อไป

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพระบบ $\mu\text{FI-CL}$

หลังจากเลือกชนิดของระบบตรวจวัดที่เหมาะสมในระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ได้จากงานวิจัยของ Zhou et al. (1999) แล้ว จึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบการวิเคราะห์ด้วยวิธี $\mu\text{FI-CL}$ จะต้องมีการศึกษาถึงผลของตัวแปรต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ต่างๆที่ใช้ ปริมาตรสารที่ฉีดลงไปในระบบ ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ ฯลฯ ซึ่งในการศึกษาผลของตัวแปรเหล่านี้ได้ทำการศึกษาโดยกำหนดตัวแปรอื่นๆให้มีค่าคงที่ไว้ แล้วทำการปรับตัวแปรหนึ่งให้ได้สภาวะการทดลองที่ให้สภาพไวสูงสุด (เพื่อใช้ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานเป็นดัชนีชี้บอก) โดยหากได้ค่าที่คงที่สำหรับตัวแปรนั้นๆ แล้วก็จะเปลี่ยนไปศึกษาผลของตัวแปรชนิดอื่นๆ ต่อไป ซึ่งวิธีนี้เรียกว่า univariation method เพื่อทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ จึงต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ดังต่อไปนี้

2.1 การศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์

ได้ทำการศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่จ่ายให้แก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ในช่วง 600-900 โวลต์ โดยทำการปรับศักย์ไฟฟ้าไปที่ค่าเริ่มต้น 600 โดยมีโคบอลต์ (II) เข้มข้น 1.0×10^{-5} โมลาร์ กระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.025 โมลาร์ (พีเอช 7.4) กระแสรีเอเจนต์ลูมินอลเข้มข้น 2.0×10^{-4} โมลาร์ ละลายในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นทำการฉีดสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ เข้าไปเพื่อวัดความเข้มแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ของระบบ $\mu\text{FI-CL}$ โดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง โดยปรับศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นครั้งละ 50 โวลต์ นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่างสัญญาณต่อพื้นหลัง (signal-to-noise ratio) กับศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายให้แก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ เพื่อหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่ให้ค่าสัญญาณต่อพื้นหลังสูงสุดต่อไป

2.2 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)

เมื่อได้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์แล้ว (800 โวลต์) จึงได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์ (II) ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-8} - 1.0×10^{-4} โมลาร์ โดยมีกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.025 โมลาร์ (พีเอช 7.4) และกระแสรีเอเจนต์ลูมินอลเข้มข้น 2.0×10^{-4} โมลาร์ ละลายในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยฉีดสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ เข้าไปเพื่อวัดความเข้มแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ที่เกิดขึ้นภายในระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ที่เกิดขึ้นโดยทำ

การฉีดซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำค่าความสูงของฟิคที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความสูงของฟิคกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์ (II) ที่จะนำไปใช้ต่อไป

2.3 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์ (II) แล้ว (1.0×10^{-6} โมลาร์) จึงได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของลูมินอลที่ใช้ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-4} - 5.0×10^{-4} โมลาร์ โดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์เท่ากับ 800 โวลต์ กระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.025 โมลาร์ (พีเอช 7.4) จากนั้นทำการฉีดสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ ลงไปเพื่อวัดความเข้มแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายในระบบ μ FI-CL ที่เกิดขึ้นโดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าความสูงของฟิคที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความสูงของฟิคที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอลที่จะนำไปใช้ต่อไป

2.4 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของลูมินอลแล้ว (5.0×10^{-4} โมลาร์) ในการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ได้กำหนดให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.001-0.05 โมลาร์ โดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์เท่ากับ 800 โวลต์ ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) เท่ากับ 1.0×10^{-6} โมลาร์ เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ ซ้ำ 3 ครั้ง โดยจะนำค่าความสูงของฟิคที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความสูงของฟิคที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) ที่จะนำไปใช้ต่อไป

2.5 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) แล้ว (0.015 โมลาร์) ในการศึกษาอัตราการไหลของกระแสตัวพา จะควบคุมให้อัตราการไหลของกระแสไอออนต์ให้มีค่าคงที่ ซึ่งจะศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.10-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อนำไปใช้ศึกษาผลที่มีต่อความเข้มแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ โดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์เท่ากับ 800 โวลต์ ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) เท่ากับ 1.0×10^{-6} โมลาร์ และความเข้มข้นของลูมินอลเท่ากับ 5.0×10^{-4} โมลาร์ เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ ซ้ำ 3 ครั้ง เข้าไปในระบบ μ FI-CL โดยจะนำค่าความสูงของฟิคที่ได้ไป

เขียนกราฟระหว่างความสูงของพีคที่สัมพันธ์กับอัตราการไหลของกระแสตัวพา เพื่อหาอัตราการไหลของกระแสตัวพาที่เหมาะสม

2.6 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสรีเอเจนต์ลูมินอล

ในการศึกษาอัตราการไหลของกระแสตัวรีเอเจนต์ จะศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.10-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับการศึกษาอัตราการไหลของกระแสตัวพาเพื่อนำไปใช้ศึกษาผลที่มีต่อความเข้มแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ เพื่อหาอัตราการไหลของกระแสรีเอเจนต์ที่เหมาะสม

2.7 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสโคบอลต์

ในการศึกษาอัตราการไหลของกระแสโคบอลต์ จะศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.10-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับการศึกษาอัตราการไหลของกระแสรีเอเจนต์ลูมินอล เพื่อนำไปใช้ศึกษาผลที่มีต่อความเข้มแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ เพื่อหาอัตราการไหลของกระแสโคบอลต์ที่เหมาะสม

2.8 การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ

หลังจากปรับอัตราการไหลที่เหมาะสม จะทำการศึกษาหาปริมาตรสารตัวอย่างสำหรับฉีดลงไปในกระแสตัวพาในช่วงปริมาตร 10-50 ไมโครลิตร เพื่อหาความสูงของพีคที่เกิดขึ้นจากการคายแสงเคมีลูมินেসซ์กับปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดลงในระบบที่สัมพันธ์กับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมงให้เหมาะสม เพื่อที่จะทำให้ได้พีคสัญญาณสูงสุด โดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์เท่ากับ 800 โวลต์ ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) เท่ากับ 1.0×10^{-6} โมลาร์ และความเข้มข้นของลูมินอลเท่ากับ 5.0×10^{-5} โมลาร์ เมื่อนิยดสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5.0×10^{-5} โมลาร์ ฉ่ำ 3 ครั้ง เข้าไปในระบบ $\mu\text{FI-CL}$

3. การศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วง 1.0×10^{-5} ถึง 5.0×10^{-5} โมลาร์ มาฉีดเข้าระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ที่มีสภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาไว้แล้ว วัดความเข้มแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์เพื่อหาความสูงของพีคแต่ละความเข้มข้นเพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานและหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์

การศึกษาความสามารถของระบบการวิเคราะห์กลูโคสด้วยการปรับปรุงแท่งคาร์บอนด้วย เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสร่วมกับอนุภาคนาโนทองคำ สำหรับเป็นไบโอรีแอคเตอร์ที่มีการตรวจวัด แบบ $\mu\text{FI-CL}$

1. การศึกษาการตรวจวัดแบบ $\mu\text{FI-CL}$ ในระบบที่มี AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ ในการหาปริมาณกลูโคส

โดยนำสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มาทดลองฉีดวิเคราะห์ ด้วยระบบ AuNP/GODx ดังแสดงในภาพ 5 ด้วยสภาวะที่แสดงในตาราง 6

ตาราง 6 สภาวะที่ใช้ในการฉีดวิเคราะห์สารละลายกลูโคส ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ด้วยระบบ AuNP/GODx

Parameter	สภาวะที่ศึกษา
1. Luminol solution	$2.0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$
2. Co (II) solution	$1.0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$
3. Phosphate buffer solution (pH 7.4)	0.015 molL^{-1}

ในเบื้องต้นของการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของตัวแปร ชนิดต่างๆ ทั้งตัวแปรทางกายภาพและทางเคมีของระบบ $\mu\text{FI-CL}$ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็น เครื่องมือตรวจวัดและประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้การตรวจวัดแบบ เคมิลูมิเนสเซนซ์ที่มี AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ร่วมในการปรับปรุงคุณภาพของวิธีการ วิเคราะห์

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในระบบ $\mu\text{FI-CL}$

หลังจากเลือกชนิดของระบบตรวจวัดที่เหมาะสมในระบบ AuNP/GODx แล้ว การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบการวิเคราะห์ด้วยวิธี AuNP/GODx จะต้องมีการศึกษาถึง ผลของตัวแปรต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ต่างๆ ที่ใช้ ปริมาตรสารที่ฉีดลงไปในระบบ ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ ฯลฯ ซึ่งในการศึกษาผลของตัวแปรเหล่านี้ได้ ทำการศึกษาโดยกำหนดตัวแปรอื่นๆ ให้มีค่าคงที่ไว้ แล้วทำการปรับตัวแปรหนึ่งให้ได้สภาวะการ ทดลองที่ให้สภาพไวสูงสุด (เพื่อใช้ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานเป็นดัชนีชี้บ่ง) โดยหากได้ ค่าที่คงที่สำหรับตัวแปรนั้นๆ แล้วก็จะเปลี่ยนไปศึกษาผลของตัวแปรชนิดอื่นๆต่อไป ซึ่งวิธีนี้

เรียกว่า univariation method เพื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ จึงต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ AuNP/GODx ไปโริแอคเตอร์ดังต่อไปนี้

2.1 การศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติฟลายเออร์

ได้ทำการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่จ่ายให้แก่หลอดโฟโตมัลติฟลายเออร์ ในช่วง 700-1,000 โวลต์ ในการทดลองจะทำการปรับศักย์ไฟฟ้าไปที่ค่าเริ่มต้น 700 โดยมีโคบอลต์ (II) เพิ่มขึ้น 1.0×10^{-6} โมลาร์ กระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น 0.015 โมลาร์ (พีเอช 7.4) กระแสรีเอเจนต์ลูมินอลเพิ่มขึ้น 2.0×10^{-4} โมลาร์ ละลายในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นทำการนิตสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เข้าไปเพื่อวัดความเข้มแสงเคมีลูมินิสเซนซ์ของระบบ AuNP/GODx โดยทำการนิตซ้ำ 3 ครั้ง โดยปรับศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นครั้งละ 50 โวลต์ นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่าง สัญญาณต่อพื้นที่หลังกับ ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายให้แก่หลอดโฟโตมัลติฟลายเออร์ เพื่อหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่ให้ค่าสัญญาณต่อพื้นที่หลังสูงสุดต่อไป

2.2 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์ (II)

เมื่อได้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติฟลายเออร์ (950 โวลต์) ที่ได้จากข้อ 2.1 แล้ว จึงได้ทำการศึกษาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์ (II) ในช่วงความเข้มข้น $1.0 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-5}$ โมลาร์ โดยมีกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น 0.015 โมลาร์ (พีเอช 7.4) กระแสรีเอเจนต์ลูมินอลเพิ่มขึ้น 2×10^{-4} โมลาร์ ละลายในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยนิตสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เข้าไปเพื่อวัดความเข้มแสงเคมีลูมินิสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายในระบบ AuNP/GODx ที่เกิดขึ้นโดยทำการนิตซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำค่าความสูงของพีคที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความสูงของพีคกับความเข้มข้นของกลูโคส เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์ (II) ที่จะนำไปใช้ต่อไป

2.3 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของลูมินอล

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์ (II) ที่ได้จากข้อ 2.1-2.2 แล้ว (1.0×10^{-7} โมลาร์) จึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของลูมินอลที่ใช้ในช่วงความเข้มข้น $1.0 \times 10^{-4} - 5.0 \times 10^{-4}$ โมลาร์ โดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติฟลายเออร์เท่ากับ 950 โวลต์ มีกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น 0.015 โมลาร์ (พีเอช 7.4) จากนั้นทำการนิตสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ลงไปเพื่อวัดความเข้มแสงเคมีลูมินิสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายในระบบ AuNP/GODx ที่เกิดขึ้นโดยทำการนิตซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าความสูงของพีคที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความสูงของพีคที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของกลูโคส เปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการ

วิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอลที่จะนำไปใช้ต่อไป

2.4 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7)

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของลูมินอลที่ได้จากข้อ 2.1-2.3 แล้ว (4.0×10^{-4} โมลาร์) จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) กำหนดให้มีความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.07 โมลาร์ โดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์เท่ากับ 950 โวลต์ ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) เท่ากับ 1.0×10^{-7} โมลาร์ เมื่อนิดสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ซ้ำ 3 ครั้ง โดยจะนำค่าความสูงของพีคที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความสูงของพีคที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของกลูโคสเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ที่จะนำไปใช้ต่อไป

2.5 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ที่ได้จากข้อ 2.1-2.4 แล้ว (0.05 โมลาร์) จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์กำหนดให้มีความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.10 โมลาร์ โดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์เท่ากับ 950 โวลต์ ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) เท่ากับ 1.0×10^{-7} โมลาร์ ความเข้มข้นของลูมินอลเท่ากับ 4.0×10^{-4} โมลาร์ เมื่อนิดสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ซ้ำ 3 ครั้ง โดยจะนำค่าความสูงของพีคที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความสูงของพีคที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่จะนำไปใช้ต่อไป

2.6 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา

ในการศึกษาอัตราการไหลของกระแสตัวพา จะควบคุมให้อัตราการไหลของกระแสรีเอเจนต์ให้มีค่าคงที่ ซึ่งจะศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.30-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อนำไปใช้ศึกษาผลที่มีต่อความเข้มแสงเคมีลูมินิสเซนซ์ เมื่อนิดสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ซ้ำ 3 ครั้ง เข้าไปในระบบ AuNP/GODx โดยจะนำค่าความสูงของพีคที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความสูงของพีคที่สัมพันธ์กับอัตราการไหลของกระแสตัวพาเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง เพื่อหาอัตราการไหลของกระแสตัวพาที่เหมาะสม

2.7 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสรีเอเจนต์ลูมินอล

ในการศึกษาอัตราการไหลของกระแสตัวรีเอเจนต์ ซึ่งจะศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.10-0.90 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้อัตราการไหลของกระแสตัวพา ตามที่ศึกษาได้ศึกษาไว้แล้ว เพื่อนำไปใช้ศึกษาผลที่มีต่อความเข้มแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ เพื่อหาอัตราการไหลของกระแสรีเอเจนต์ที่เหมาะสม

2.8 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสโคบอลต์

ในการศึกษาอัตราการไหลของกระแสโคบอลต์ ซึ่งจะศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.10-0.90 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้อัตราการไหลของกระแสรีเอเจนต์ลูมินอลที่ได้จากข้อ 2.1-2.7 เพื่อนำไปใช้ศึกษาผลที่มีต่อความเข้มแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ เพื่อหาอัตราการไหลของกระแสโคบอลต์ที่เหมาะสม

2.9 การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ

หลังจากปรับอัตราการไหลที่เหมาะสมแล้วที่ได้จากข้อ 2.1-2.8 จะทำการศึกษาหาปริมาตรสารตัวอย่างสำหรับฉีดลงไปในกระแสตัวพาในช่วงปริมาตร 20-100 ไมโครลิตร เพื่อหาความสูงของพีคที่เกิดขึ้นจากการคายแสงเคมีลูมินีสต์กับปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดลงในระบบที่สัมพันธ์กับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมงให้เหมาะสมที่จะทำให้เกิดพีคสัญญาณสูงสุด

3. การศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กลูโคส

ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วงตั้งแต่ 1×10^{-4} – 15×10^{-4} โมลาร์ มาฉีดเข้าระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ไปโอรีแอคเตอร์ที่มีสถานะที่เหมาะสมสูงสุดตามที่ได้ศึกษาไว้แล้ว โดยการวัดความเข้มแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์เพื่อหาความสูงของพีคสำหรับใช้เปรียบเทียบความเข้มข้นของกลูโคสแต่ละความเข้มข้นเพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานและหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์

4. การศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือ

จากกราฟความเป็นเส้นตรงจะเลือกสารมาตรฐานความเข้มข้นของช่วงที่เป็นเส้นตรงหนึ่งความเข้มข้น เพื่อฉีดเข้าไปในระบบ AuNP/GODx ทั้งหมด 12 ครั้ง เพื่อหาความแม่นยำของเครื่องมือในการศึกษาวิจัยนี้เลือกใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 6×10^{-4} โมลาร์

5. การศึกษาหาคิดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำๆ ระหว่าง 1×10^{-6} - 1×10^{-3} โมลาร์ มาฉีดเข้าไปในระบบ AuNP/GODx เพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้

โดยพิจารณาจากค่าสัญญาณพื้นหลัง (signal-to-noise ratio) ที่มีค่ามากกว่า 3 เท่า เปรียบเทียบกับ สัญญาณพื้นหลัง (3σ)

การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้ของ AuNP/GODx

หลังจากทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนแล้ว นำ AuNP/GODx ไปโอรีแอคเตอร์ที่ได้มาทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้ภายใน 1 วัน โดยทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ เข้าไปในระบบ AuNP/GODx เพื่อทดสอบว่าใน 1 วัน นิติครั้งฟิคจึงลดลง 5% และ 50% และฉีดวันละหนึ่งครั้ง ได้ กี่วันฟิคจึงลด 50%

การศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนที่สำคัญ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ มาฉีดเข้าระบบ μ FI-CL เพื่อใช้เป็นฟิคเปรียบเทียบ
2. เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ ที่ผสมกับสารละลาย กรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ ลงไปในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ในขวดเดียวกัน (อัตราส่วน 1:1) แล้วนำมาฉีดเข้าระบบ μ FI-CL เปรียบเทียบฟิคที่ได้กับฟิคจากข้อ 1 หากฟิคที่ได้มีความสูงเพิ่มขึ้นหรือลดต่ำลงเกินกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จะถือว่าเกิดการรบกวนขึ้น
3. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2 โดยเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 1:10, 1:100 และ 1:1000 ตามลำดับ
4. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 โดยเปลี่ยนสารละลายของสารรบกวนเป็น สารต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ ดี-กาแลกโตส กรดซิตริก กรดออกซาลิกคาเฟอีน 4-อะซีตา มิโด ฟีนอล กรดยูริก คอเลสเตอรอล และกรดซาลิไซลิก

การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

ได้เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ทำการทดลองและอาสาสมัครจำนวน 6 ตัวอย่าง

2. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์โดยวิธี AuNP/GODx

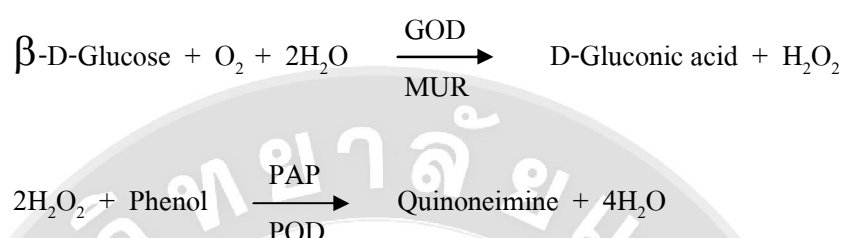
2.1 ตัวอย่างซีรัม

เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ทำการทดลองและอาสาสมัครมาคนละ 10 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดเซรุ่มฟิวซ์ที่มีโซเดียมฟลูออไรด์อยู่ เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นโดย เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 3,600 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปวิเคราะห์โดยวิธี

μ FI-CL ที่มี AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ เพื่อวัดค่าความเข้มแสงเคมีลูมิเนสเซนส์เทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟวิเคราะห์กลูโคสโดยวิธีมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือดโดยวิธีมาตรฐาน (Enzymatic assay)

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสทั้งหมดในซีรัมอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังสมการ



จากสมการ เบต้า-ดี-กลูโคส จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นกรดดี-กลูโคนิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกออกซิไดส์ด้วย 4-อะมีโนแอนติไพรีนและฟีนอลโดยการทำงานของเปอร์ออกซิเดส เกิดสารควิโนอิมินที่มีสีแดง ซึ่งความเข้มของสารเชิงซ้อนที่มีสีนี้จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอยู่ ซึ่งมีขั้นตอนการวัดดังนี้

3.1 ปิเปตเอนไซม์รีเอเจนต์ 1,000 ไมโครลิตรลงไปในคิวเวตต์

3.2 เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (เลือดหรือสารมาตรฐาน) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปในรีเอเจนต์ในข้อ 3.1 เขย่าให้เข้ากัน แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

ตาราง 7 การปิเปตสารที่นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีมาตรฐาน

	แบลงค์	สารมาตรฐาน	สารตัวอย่าง
สารมาตรฐาน	-	10 ไมโครลิตร	-
สารตัวอย่าง	-	-	10 ไมโครลิตร 1,000
เอนไซม์รีเอเจนต์	1,000 ไมโครลิตร	1,000 ไมโครลิตร	ไมโครลิตร

3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เปรียบเทียบกับรีเอเจนต์แบลงค์

3.4 คำนวณปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง

การหาค่าความเข้มข้นของสารเคมี

1. การหาค่าความเข้มข้นของสารเคมีโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน

ทำการเจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง มาทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารเคมีในตัวอย่างโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างในปริมาตรที่เท่ากันลงในขวดวัดปริมาตรแต่ละขวด จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงในขวดวัดปริมาตรแต่ละขวดในปริมาตรที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition) ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี $\mu\text{FI-CL}$ ที่มี AuNP/GODx ไปโอรีแอคเตอร์ เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของสารเคมีในตัวอย่างที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแบบเติมสารมาตรฐาน แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. คำนวณร้อยละการกลับคืนของตัวอย่างเลือด

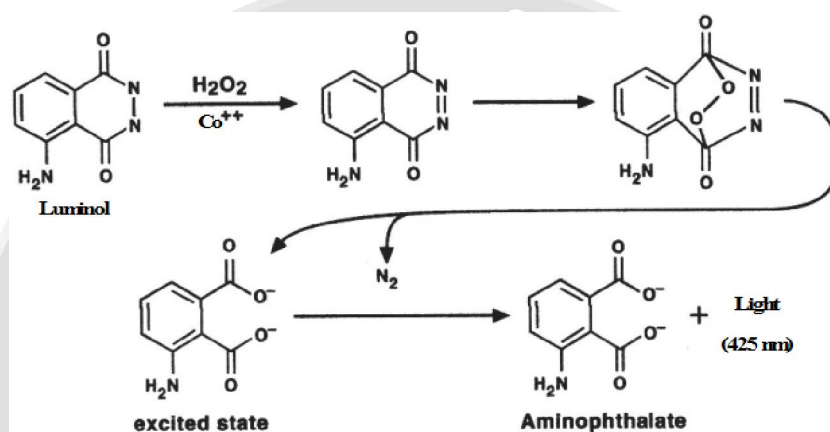
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

ในการวิจัยฉบับนี้เบื้องต้นได้ทำการประดิษฐ์และทดสอบไมโครฟลูอิดอย่างง่ายโดยใช้การตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ เพื่อใช้ในการทดสอบระบบไมโครฟลูอิดิกโดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยนำเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์แบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ เนื่องจากเทคนิคนี้มีข้อดีคือสามารถวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีสภาพไวสูง รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและสารทำปฏิกิริยาน้อยมาก ทำให้เกิดของเสียที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย นอกจากนั้นระบบที่ใช้วิเคราะห์เป็นระบบปิด ผลดีให้ผู้ปฏิบัติการทดลองไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีโดยตรง และยังช่วยลดขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างให้น้อยลง ทำให้การวิเคราะห์ทำได้อย่างรวดเร็วมากยิ่งขึ้น ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวประกอบไปด้วย การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ของตัวแปรชนิดต่างๆ ทั้งตัวแปรทางกายภาพและทางเคมีเพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็นเครื่องมือตรวจวัดและประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนสำหรับเป็นไบโอรีแอคเตอร์ในการวิเคราะห์กลูโคส เบื้องต้น Alamo (2010) ได้ทดลองตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนสำหรับเป็นมินิคอลัมน์ไบโอรีแอคเตอร์ในการวิเคราะห์กลูโคสโดยใช้การตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ หลังจากนั้นจึงนำวิธีการวิเคราะห์นี้มาทดสอบหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด ซึ่งผลการทดลองมีดังนี้

ในการทดลองขั้นต้น ได้ทำการศึกษาและออกแบบการตรวจวัดแบบ $\mu\text{FI-CL}$ ที่ใช้ลูมินอลเป็นรีเอเจนต์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยมีกระแสตัวพาฟอสเฟต

บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.025 โมลาร์ (พีเอช 7.4) สารละลายโคบอลต์ (II) เข้มข้น 1.0×10^{-5} โมลาร์ กระแสรีเอเจนต์ลูมินอลเข้มข้น 2.0×10^{-4} โมลาร์ ที่ละลายในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ทฤษฎีของการวิเคราะห์คือ เมื่อนี้ดสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าไปในกระแสดั้วพา สารละลายตัวพาจะถูกปั๊มนำเอาสารละลายผสมของตัวพาและสารละลายมาตรฐานเข้าสู่ระบบ $\mu\text{FI-CL}$ โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารผสมจะเข้าทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ลูมินอลตรงบริเวณที่เชื่อมต่อกันที่ โดยมีโคบอลต์ (II) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในสถานะต่าง ดังภาพ 7



ภาพ 7 การออกซิไดส์ลูมินอลด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโคบอลต์ (II) ไปเป็นสารตัวกลาง
ที่มา : Van Dyke and Woodfork (2002)

แสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ที่เปล่งออกมาจะถูกตรวจวัดโดยเครื่องลูมิโนมิเตอร์อย่างง่ายที่ประกอบขึ้นเอง โดยใช้หลอดวัดแสงโฟโตมัลติพลายเออร์ (PMT) ตรวจวัดแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ที่เปล่งออกมาเมื่อมีการควบคุมศักย์ไฟฟ้าที่ง่ายให้หลอดวัดแสง เพื่อสามารถวัดเคมีลูมินเนสเซนซ์ที่คายออกมาได้ในเวลาที่เหมาะสม

แสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ที่คายออกมามีความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 425 นาโนเมตร โดยแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกตรวจวัดโดยหลอดวัดแสง PMT และส่งสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณเพื่อบันทึกผลที่ได้ออกมาในภาพของฟลักซ์สัญญาณ

1. การหาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยระบบ $\mu\text{FI-CL}$

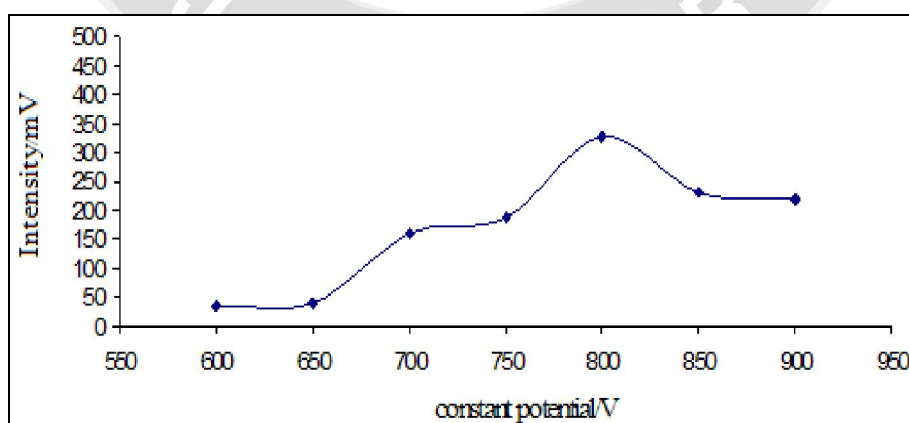
ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ได้กำหนดสถานะเริ่มต้นก่อนที่จะทำการศึกษหาสถานะที่เหมาะสมโดยเลียนแบบระบบการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยวิธี FI-CL ของ Zhou et al. (1999) ดังตาราง 8

ตาราง 8 สภาวะเริ่มต้นในการทดสอบระบบ μ FI-CL ด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

พารามิเตอร์	สภาวะเริ่มต้น
กระแสตัวพา	
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) (โมลาร์)	0.025
กระแสรีเอเจนต์	
ความเข้มข้นของลูมินอล (โมลาร์)	2.0×10^{-4}
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)	0.10
ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) (โมลาร์)	1.0×10^{-5}
ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอด PMT (โวลต์)	850
อัตราการไหลของกระแสรีเอเจนต์และกระแสตัวพา (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.4
ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	20

1.1 การศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์

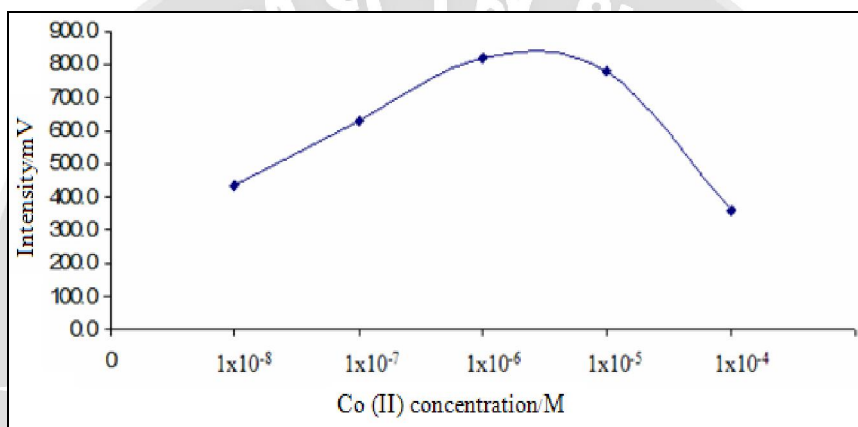
การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ ในช่วง 600-900 โวลต์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 8 โดยค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ ที่เหมาะสมที่ทำให้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์กับลูมินอลที่มีต่อสัญญาณพื้นหลัง (signal-to-noise ratio) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 800 โวลต์ ซึ่งการเพิ่มค่าศักย์ไฟฟ้ามากกว่า 800 โวลต์ ไม่ทำให้สัญญาณการคายแสงเพิ่มขึ้นแต่กลับทำให้สัญญาณลดต่ำลง เนื่องจากสัญญาณรบกวนจากพื้นหลังมีมากขึ้น



ภาพ 8 การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์

1.2 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)

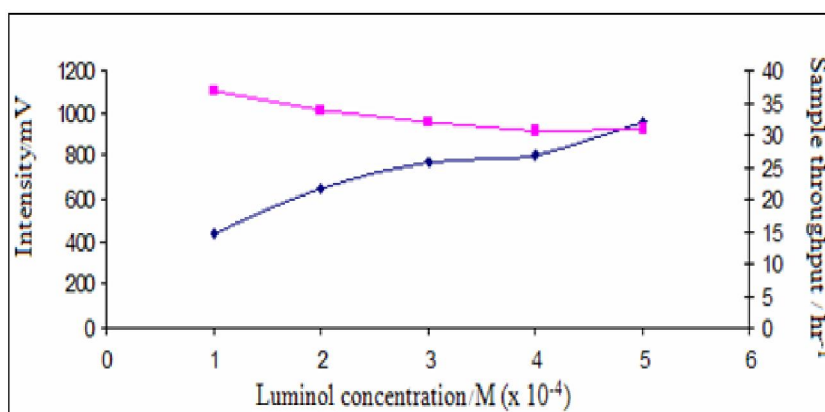
จากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1 นำมาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-8} - 1.0×10^{-4} โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 9 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) ที่ช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.0×10^{-6} โมลาร์ ซึ่งถ้าเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 1.0×10^{-6} โมลาร์ ก็ไม่ทำให้สัญญาณการคายแสงเพิ่มขึ้นแต่กลับทำให้สัญญาณลดต่ำลง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงจะกำหนดให้ความเข้มข้นของสารละลายโคบอลต์ (II) มีค่าเท่ากับ 1.0×10^{-6} โมลาร์



ภาพ 9 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)

1.3 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.2 มาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอลในกระแสรีเอเจนต์ ที่ถูกปรับให้มีสภาพเป็นด่างในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งกำหนดการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-4} - 5.0×10^{-4} โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 10 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 5.0×10^{-4} โมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง เนื่องจากปริมาณลูมินอลมากเกินไปจะทำให้ฟลักที่ได้นั้นมีฐานฟลักกว้าง จึงทำให้จำนวนครั้งในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมงมีค่าลดลง จึงจะเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการทดลองขั้นต่อไป



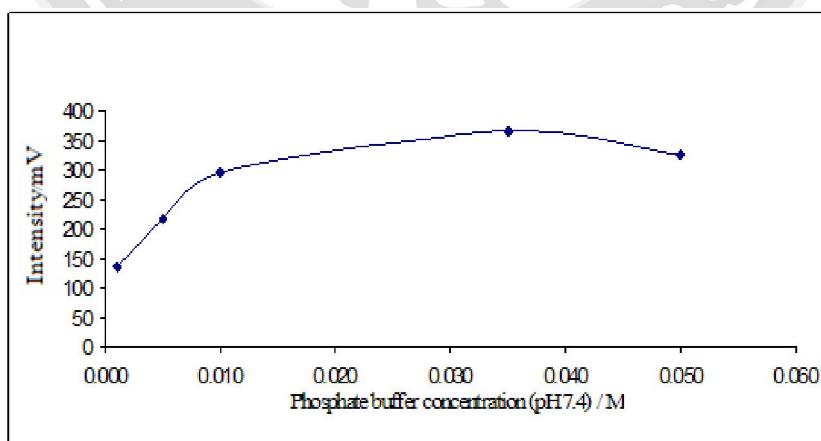
ภาพ 10 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

(◆) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล

(—■) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.4 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

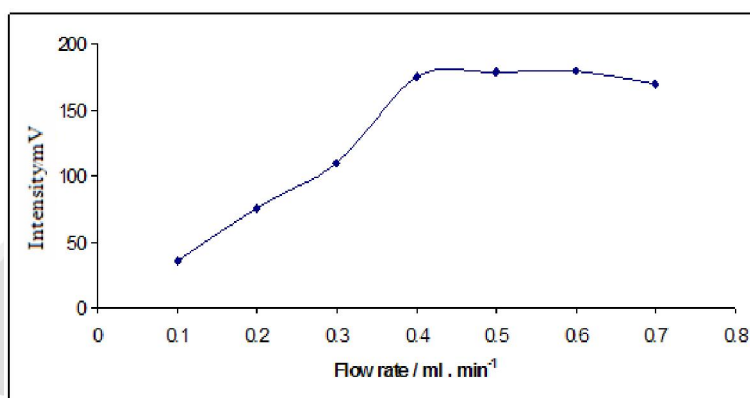
โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.3 มาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.05 โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 11 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีปริมาณเท่ากับ 0.015 ถึง 0.02 โมลาร์



ภาพ 11 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

1.5 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

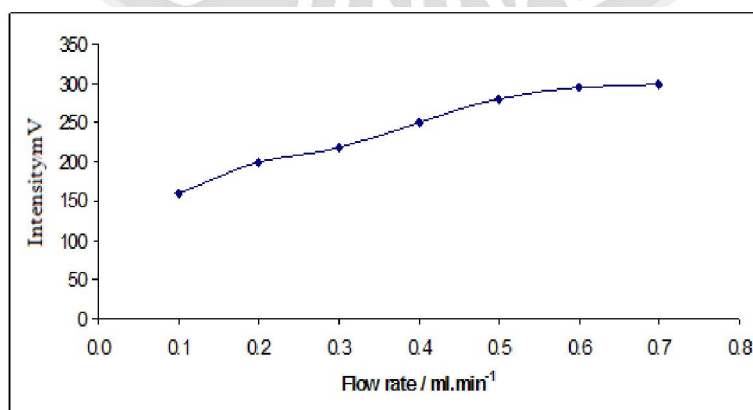
โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ ข้อ 1.1-1.4 มาใช้ในการหาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ในช่วง 0.10-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 12 โดยอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพาที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพ 12 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา

1.6 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์

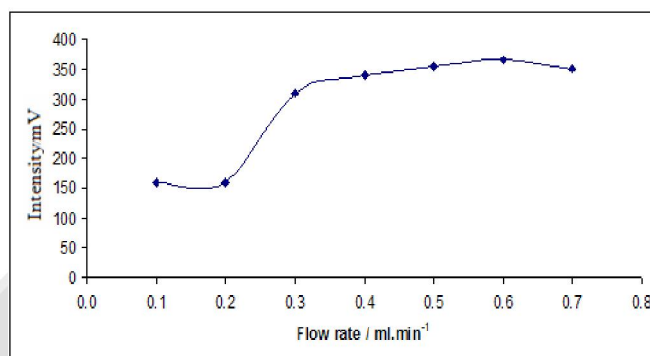
โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ ข้อ 1.1-1.5 มาใช้ในการหาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา ในช่วง 0.10-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 13 โดยอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพาที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากอัตราการไหลที่มากเกินไปทำให้ฟีดมีสัญญาณพื้นหลังสูงและเกิดการรั่วภายในแผ่นชิปได้ง่าย



ภาพ 13 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์

1.7 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)

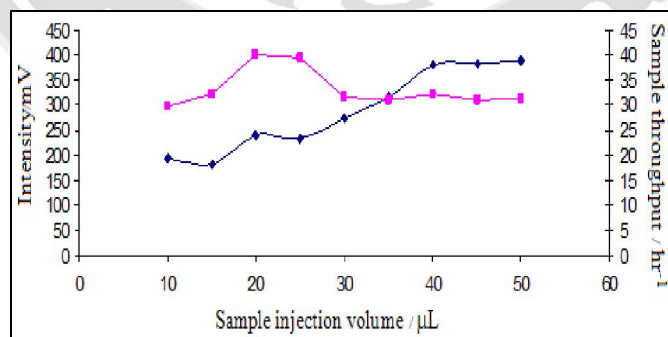
โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.6 มาใช้ในการหาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) ในช่วง 0.10-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าได้ผลดังภาพ 14 โดยอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพ 14 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)

1.8 การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.7 มาใช้ในการหาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบในช่วง 10-50 ไมโครลิตร พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 15 โดยปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ได้สูงสุดมีค่าประมาณ 35 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมงที่ทำให้อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมงมีค่าเหมาะสม



ภาพ 15 การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ และ อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

- (—◆—) ปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ
- (—■—) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.8 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทดสอบระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$ สามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นสามารถทำให้ระบบ $\mu\text{FI-CL}$ มีประสิทธิภาพสูงสุด จากปัจจัยต่าง ๆ ทั้งทางกายภาพและทางเคมีได้ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$

พารามิเตอร์	ช่วงการศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
กระแสดั้วพา		
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) (โมลาร์)	0.001-0.05	0.015
กระแสรีเอเจนต์		
ความเข้มข้นของลูมินอล (โมลาร์)	1.0×10^{-4} - 5.0×10^{-4}	5.0×10^{-4}
ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) (โมลาร์)	1.0×10^{-8} - 1.5×10^{-4}	1.0×10^{-6}
ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอด PMT (โวลต์)	600-900	800
ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	10-50	35
อัตราการไหลของกระแสดั้วพาและรีเอเจนต์ (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.10-1.0	0.40

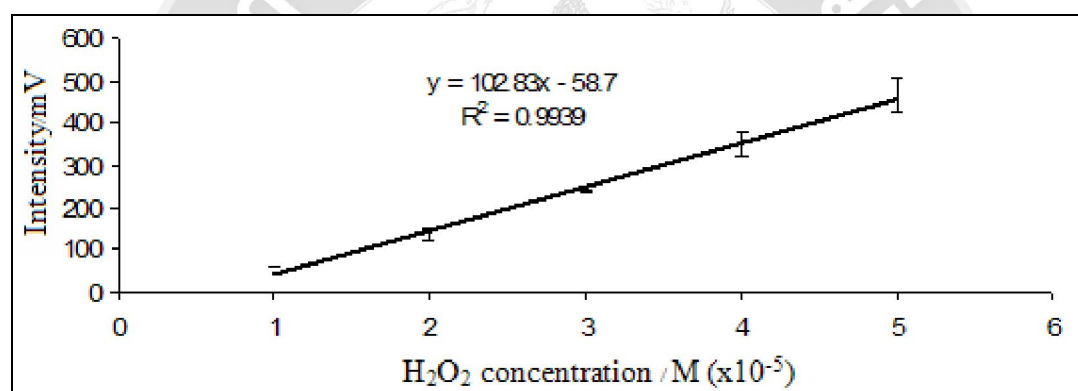
1.9 การศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ในการหาช่วงความเป็นเส้นตรงที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ได้ทำการศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นในช่วง 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-5} โมลาร์ มาฉีดเข้าไปในระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามตาราง 10 พบว่าได้ผลดังตาราง 10 และเมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคสัญญาณกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าได้กราฟความสัมพันธ์ดังภาพ 16

ตาราง 10 ผลการศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$

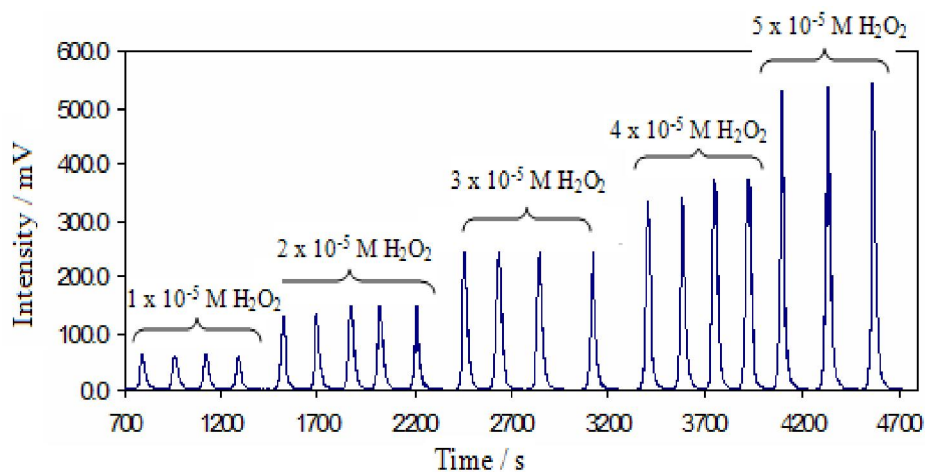
ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($\times 10^{-5}$ โมลาร์)	ความสูงของพีค (มิลลิโวลต์)*
1	59.30 $\pm$ 1.5
2	136.00 $\pm$ 1.7
3	237.70 $\pm$ 1.2
4	349.00 $\pm$ 3.6
5	467.00 $\pm$ 4.6

หมายเหตุ *n=3



ภาพ 16 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$

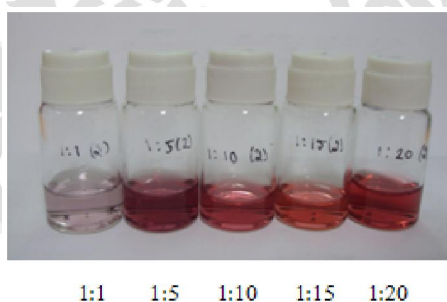
จากภาพ 16 เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ระหว่างสัญญาณเคมีลูมิเนสเซนซ์ (มิลลิโวลต์) กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่ากราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์เชิงสมการ $y = 102.83x - 58.7$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์เท่ากับ 0.9939 โดยลักษณะสัญญาณ $\mu\text{FI-CL}$ ที่ได้แสดงดังภาพ 17 ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมนี้จะนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หากลูโคสโดยวิธี AuNP/GODx โดยใช้ในการตรวจวัดแบบเคมีลูมิเนสเซนซ์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพ 17 พิกัดสัญญาณ $\mu\text{FI-CL}$ ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำสำหรับเป็นตัวเชื่อมต่อการตรึงเอนไซม์

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยวิธีทางเคมีทำโดยใช้สารละลายทอง (III) คลอไรด์ไตรไฮเดรตและตัวรีดิวซ์คือไตรโซเดียมไซเตรตไดไฮเดรตซึ่งทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนกับไอออนของทองคำ โดยได้รับความร้อนจากเตาอบไมโครเวฟ จะได้สารทอง (III) คลอไรด์ไตรไฮเดรตที่มีสีแดงซีดที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ต่อไตรโซเดียมไซเตรตที่อัตราส่วน 1 : 15 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยได้ทำการทดลองที่อัตราส่วนต่างๆ กัน ดังภาพ 18



ภาพ 18 สารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ในอัตราส่วนต่าง ๆ

$$1:1 = (5:18)$$

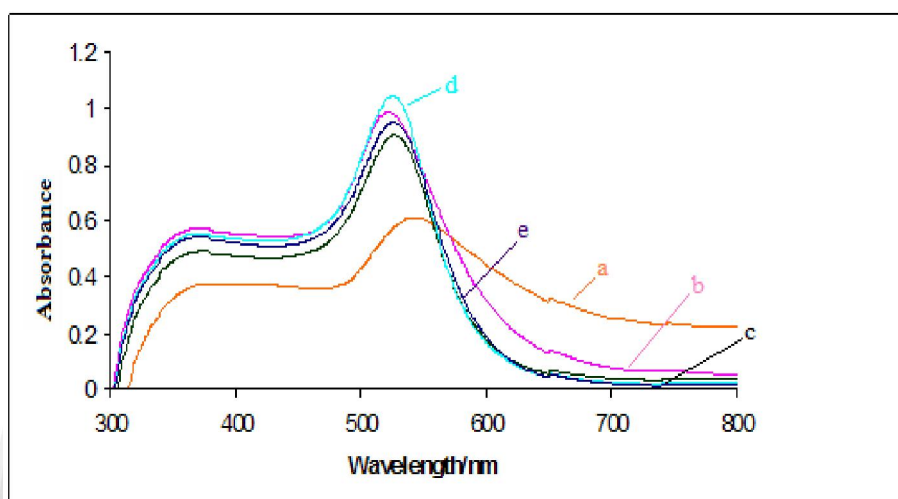
$$1:5 = (5:92)$$

$$1:10 = (5:184)$$

$$1:15 = (5:276)$$

$$1:20 = (5:368)$$

จากนั้นนำสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่ได้เตรียมขึ้นจากทองคลอไรด์กับไตรโซเดียม ซิเตรตด้วยอัตราส่วนต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 300-800 นาโนเมตร แล้วนำข้อมูลไปเขียนสเปกตรัมการดูดกลืน ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (wavelength) และค่าการดูดกลืน (absorbance) ได้ผลดังภาพ 19



ภาพ 19 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่อัตราส่วนต่าง ๆ

a = 1:1

b = 1:5

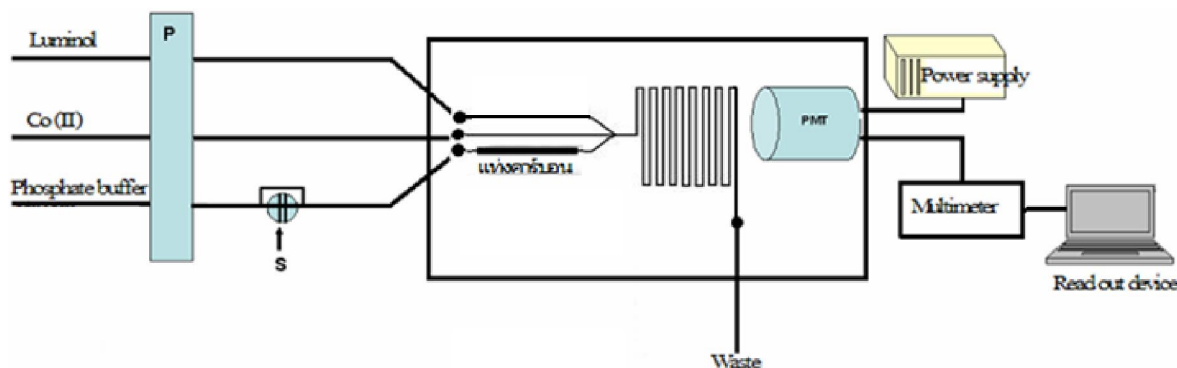
c = 1:10

d = 1:15

e = 1:20

จากภาพ 18 พบว่าชุดข้อมูล 4 ซึ่งมีอัตราส่วนของทอง (III) คลอไรด์:ไตรโซเดียมซิเตรตได้ไฮเดรต เท่ากับ 1:15 โดยโมล ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด จึงได้นำสารละลายอนุภาคนาโนทองคำชุดนี้ไปใช้ในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนต่อไป เนื่องจากเป็นสารละลายที่มีคุณสมบัติของอนุภาคทองคำนาโนมากที่สุดสอดคล้องกับรายงานของ Tangkuarum et al. (2007)

การทดสอบการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนแท่งคาร์บอนด้วยอนุภาคนาโนทองคำสำหรับใช้เป็นไบโอรีแอคเตอร์ในการตรวจวัดแบบไมโครฟลูอิดิกโฟลิมิเนสเซนซ์เคมีลูมินเนสเซนซ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส



ภาพ 20 ระบบไมโครฟลูอิดิกโฟลิมิเนสเซนซ์เคมีลูมินเนสเซนซ์ สำหรับวิเคราะห์กลูโคส

หมายเหตุ CL reagent, 2.0×10^{-4} M luminol, 1.0×10^{-6} M Co(II); carrier solution, 0.015 M phosphate buffer solution (pH 7.4); sample standard, 5.0×10^{-5} M H_2O_2 ; sample injection volume, 35 μ L.

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์

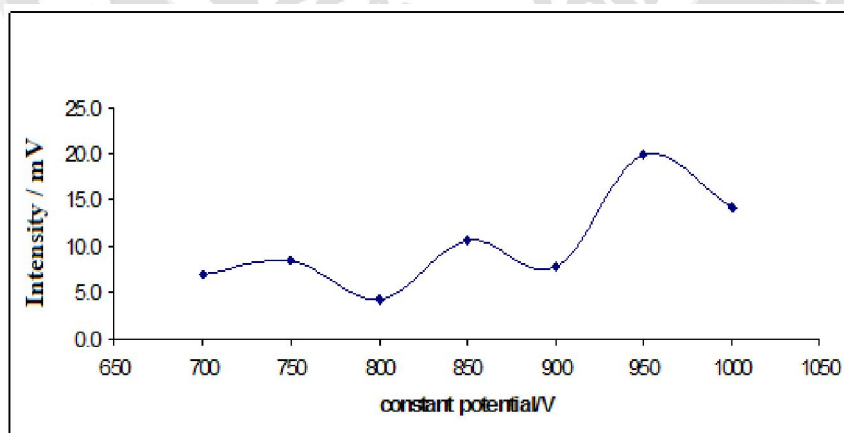
ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์จากแผนภาพการออกแบบระบบการทดลองในภาพ 20 ได้กำหนดสภาวะเริ่มต้นก่อนที่จะทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยเลียนแบบจากผลการทดลองเบื้องต้นที่ได้จากระบบการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยวิธี μ FI-CL ดังตาราง 11

ตาราง 11 สภาวะเริ่มต้นในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยระบบ AuNP/GODx

พารามิเตอร์	สภาวะเริ่มต้น
กระแสตัวพา	
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) (โมลาร์)	0.015
กระแสรีเอเจนต์	
ความเข้มข้นของลูมินอล (โมลาร์)	5.0×10^{-4}
ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) (โมลาร์)	1.0×10^{-6}
ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอด PMT (โวลต์)	800
ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	35
อัตราการไหลของกระแสตัวพาและรีเอเจนต์ (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.40

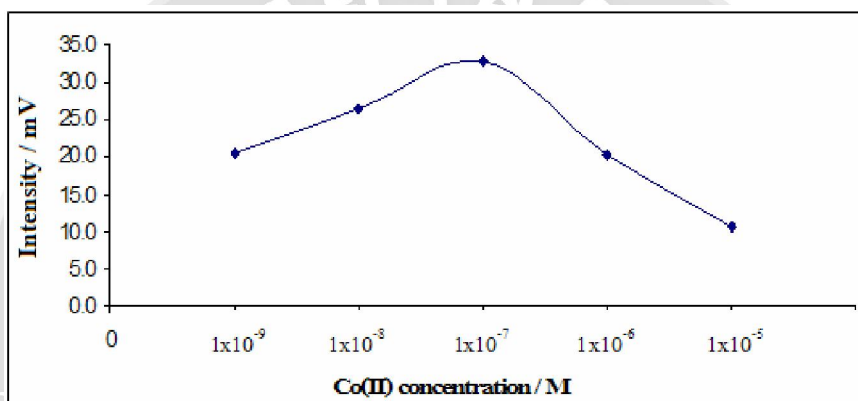
1.1 การศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์

การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ ในช่วง 700-1,000 โวลต์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 21 โดยค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ที่เหมาะสมที่ทำให้การวัดแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์ด้วยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไปโอไรแอคเตอร์ที่มีต่อสัญญาณพื้นหลังมีค่าสูงสุดเท่ากับ 950 โวลต์ ซึ่งการเพิ่มค่าศักย์ไฟฟ้ามากกว่า 950 โวลต์ ไม่ทำให้สัญญาณการคายแสงเพิ่มขึ้นแต่กลับทำให้สัญญาณลดลง และจะทำให้อายุการใช้งานของหลอด PMT สื่อมได้ไวยิ่งขึ้นมากเกินไป



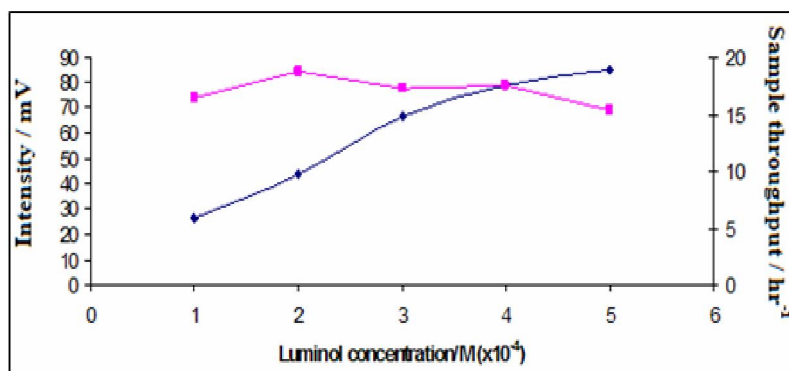
ภาพ 21 การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์

1.2 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) จากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จาก ข้อ 1.1 นำมาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย โคบอลต์ (II) ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-9} - 1.0×10^{-5} โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 22 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย โคบอลต์ (II) ที่ช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.0×10^{-7} โมลาร์ ซึ่งถ้าเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 1.0×10^{-7} โมลาร์ ก็ไม่ทำให้สัญญาณการคายแสงเพิ่มขึ้นแต่กลับทำให้สัญญาณลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงจะกำหนดให้ความเข้มข้นของ สารละลายโคบอลต์ (II) มีค่าเท่ากับ 1.0×10^{-7} โมลาร์



ภาพ 22 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)

1.3 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.2 มาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอลในกระแสรอเจนต์ ที่ถูกปรับให้มีสภาพเป็นด่างด้วย สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งกำหนดการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-4} - 5.0×10^{-4} โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 23 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 4.0×10^{-4} โมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง ซึ่งมีเหตุผลจากความเข้มข้นของลูมินอลที่มีต่อความ กว้างของพีคสัญญาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ลูมินอลที่เข้มข้นมากเกินไป



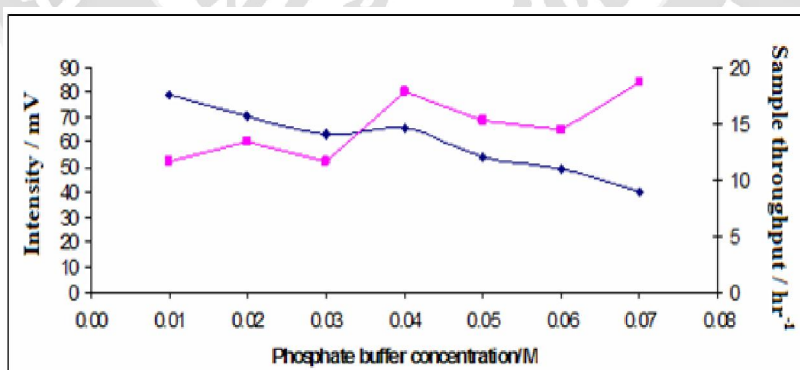
ภาพ 23 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

(◆) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลูมินอล

(■) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.4 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.3 มาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.07 โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 24 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.035 โมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง



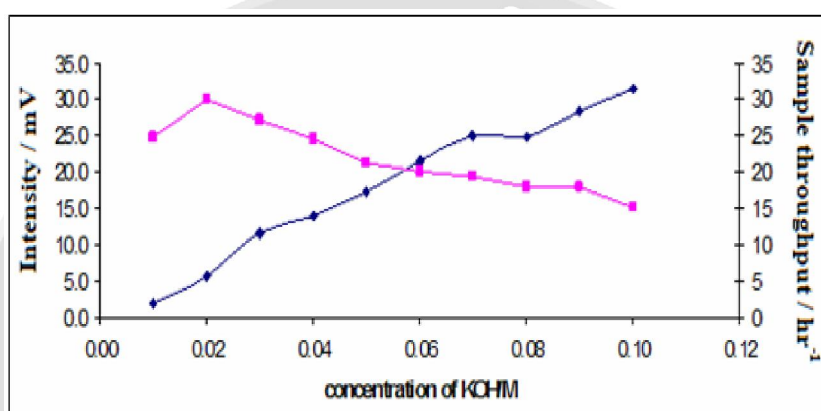
ภาพ 24 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

(◆) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

(■) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.5 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ ข้อ 1.1-1.4 มาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.10 โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 25 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.06 โมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

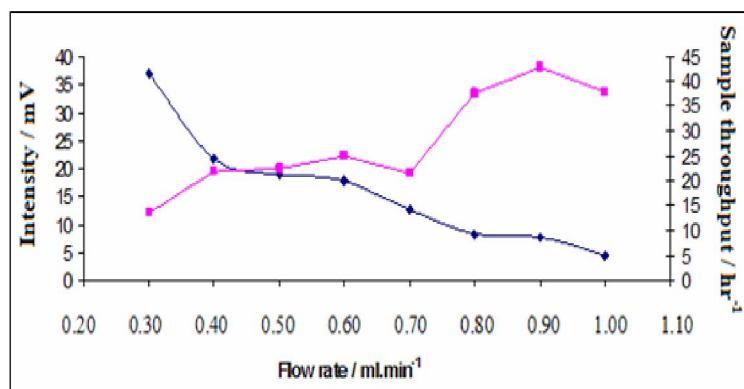


ภาพ 25 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

- (—◆—) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)
- (—■—) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.6 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ ข้อ 1.1-1.5 มาใช้ในการหาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ในช่วง 0.30-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 26 โดยอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพาที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง



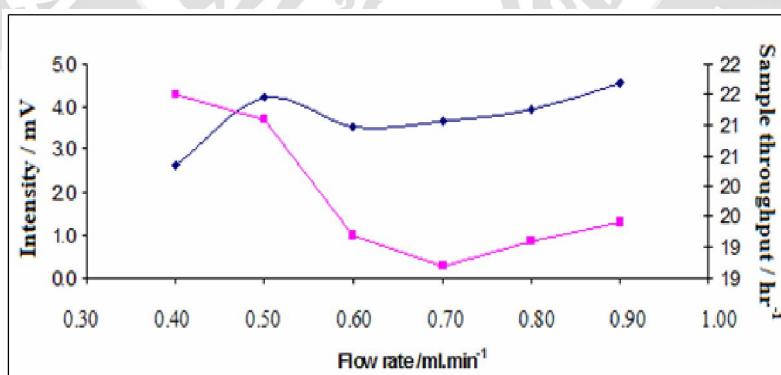
ภาพ 26 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสน้ำ และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

(◆) อัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสน้ำ

(■) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.7 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.6 มาใช้ในการหาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์ ในช่วง 0.40-0.90 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าได้ผลดังภาพ 27 โดยอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง



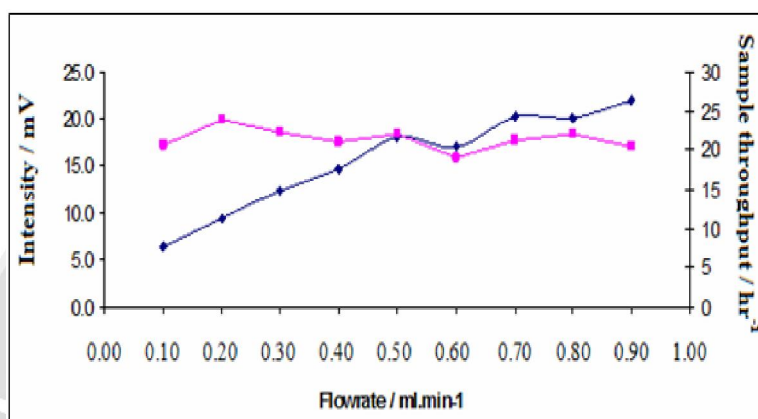
ภาพ 27 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์ และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

(◆) อัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสลูมินอลรีเอเจนต์

(■) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.8 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.7 มาใช้ในการหาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) ในช่วง 0.10-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าได้ผลดังภาพ 28 โดยอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาแสงเคมีมินิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง



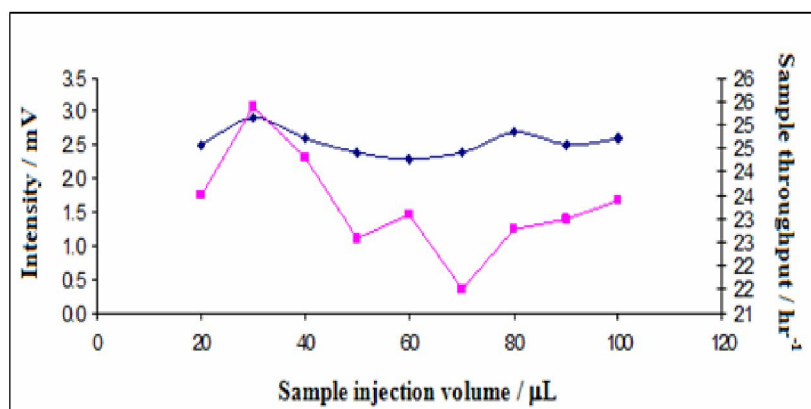
ภาพ 28 การศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II) และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

(◆) อัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายโคบอลต์ (II)

(■) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.9 การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.1-1.8 มาใช้ในการหาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบในช่วง 20-100 ไมโครลิตร พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพ 29 โดยปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงในระบบ ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาแสงเคมีมินิเนสเซนส์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 30 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง ซึ่งปริมาณสารที่ฉีดเข้าไปในระบบแม้ว่าจะฉีดเข้าไปปริมาณมากก็ไม่สามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากความจุของพื้นที่ผิวในการทำปฏิกิริยาของไบโอรีแอคเตอร์ในระบบ μ FI-CL มีพื้นที่ผิวในการเร่งปฏิกิริยาจำกัด



ภาพ 29 การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสม และอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

(◆) ปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสม (■) อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมง

1.10 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไปโอรีแอคเตอร์

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไปโอรีแอคเตอร์ สามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นสามารถทำให้ระบบ AuNP/GODx มีประสิทธิภาพสูงสุด จากปัจจัยต่างๆ ทั้งทางกายภาพและทางเคมีได้ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยระบบ AuNP/GODx

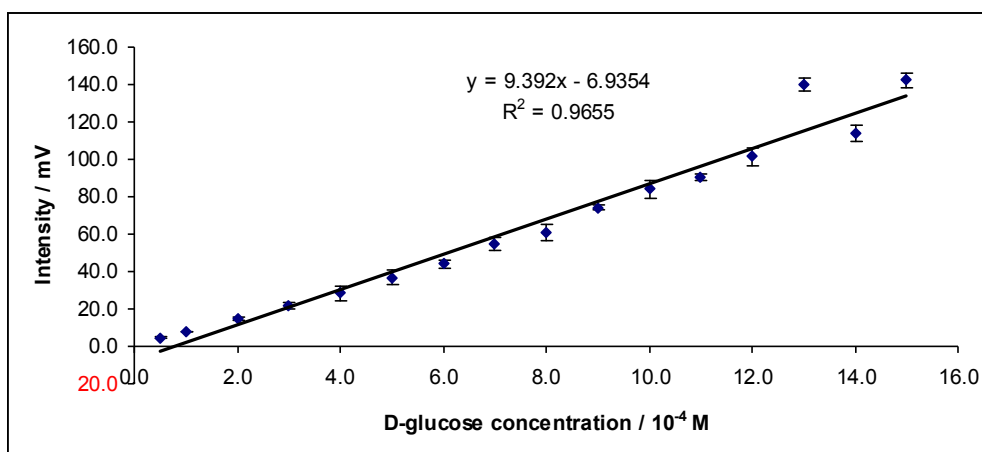
พารามิเตอร์	ช่วงการศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
กระแสตัวพา		
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) (โมลาร์)	0.01-0.07	0.035
กระแสรีเอเจนต์		
ความเข้มข้นของลูมินอล (โมลาร์)	1.0×10^{-4} - 5.0×10^{-4}	4.0×10^{-4}
ความเข้มข้นของโคบอลต์ (II) (โมลาร์)	1.0×10^{-9} - 1.5×10^{-5}	1.0×10^{-7}
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)	0.01-0.10	0.06
ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอด PMT (โวลต์)	700-1,000	950
ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	20-100	30
อัตราการไหลของกระแสตัวพาและรีเอเจนต์ (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.10-1.0	0.50

1.11 การศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กลูโคส ในการหาช่วงความเป็นเส้นตรงที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอดีแอคเตอร์ ได้ทำการศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่มีความเข้มข้นในช่วง 1.0×10^{-4} - 15.0×10^{-4} โมลาร์ มาฉีดเข้าไปในระบบ AuNP/GODx ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามตาราง 13 พบว่าได้ผลดังตาราง 13 และเมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคสัญญาณกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าได้กราฟความสัมพันธ์ดังภาพ 30

ตาราง 13 ผลการศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กลูโคส

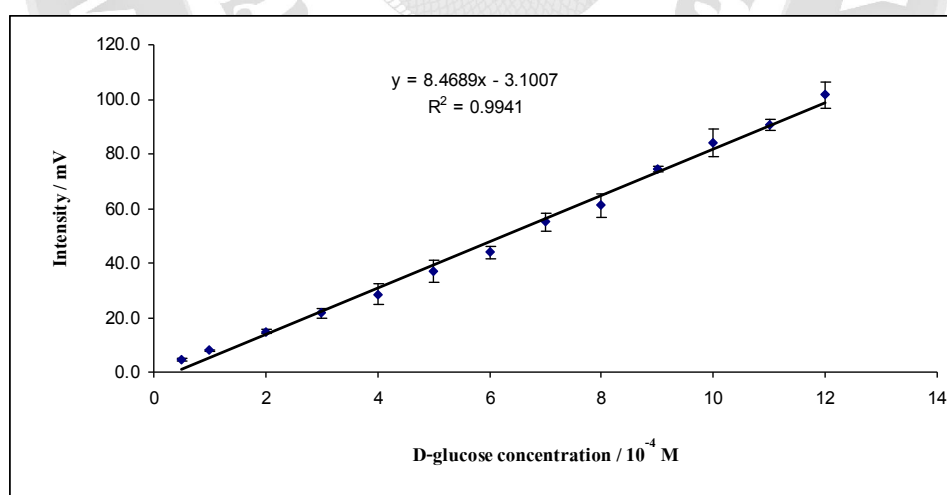
ความเข้มข้นของกลูโคส ($\times 10^{-4}$ โมลาร์)	ความสูงของพีค (มิลลิโวลต์)*
0.5	4.4 $\pm$ 0.5
1	7.9 $\pm$ 0.3
2	14.9 $\pm$ 0.7
3	21.6 $\pm$ 1.6
4	28.4 $\pm$ 3.8
5	36.8 $\pm$ 4.1
6	44.0 $\pm$ 2.3
7	55.0 $\pm$ 3.3
8	61.1 $\pm$ 4.2
9	74.3 $\pm$ 0.9
10	84.0 $\pm$ 4.9
11	90.5 $\pm$ 2.1
12	101.6 $\pm$ 4.7
13	139.8 $\pm$ 3.4
14	114.2 $\pm$ 4.3
15	142.2 $\pm$ 4.0

หมายเหตุ *n=3

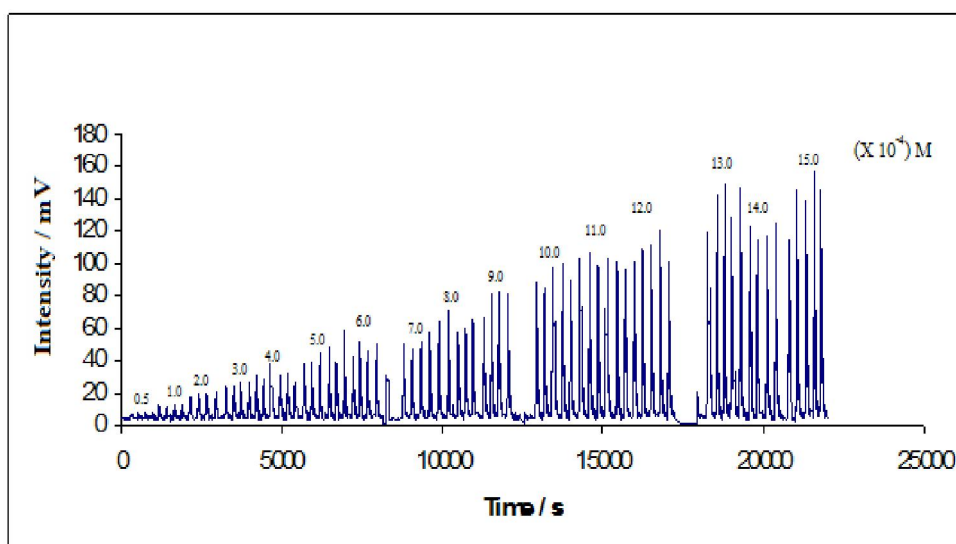


ภาพ 30 ผลการศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กลูโคส

จะสังเกตได้ว่ากราฟความสัมพันธ์ของความสูงของฟลักสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์ มีสมการความสัมพันธ์คือ $y = 9.392x - 6.9354$ อย่างไรก็ตามจากภาพ 30 อาจพอกล่าวได้ว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิค μ FI-CL อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.5×10^{-4} - 12.0×10^{-4} โมลาร์ ซึ่งเมื่อสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ระหว่างสัญญาณเคมีลูมิเนสเซนซ์ (มิลลิโวลต์) กับความเข้มข้นของกลูโคส พบว่ากราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์ดังสมการ $y = 8.4689x - 3.1007$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์เท่ากับ 0.9941 ดังแสดงในภาพ 31 โดยลักษณะของฟลักสัญญาณของ μ FI-CL ที่ได้แสดงดังภาพ 32



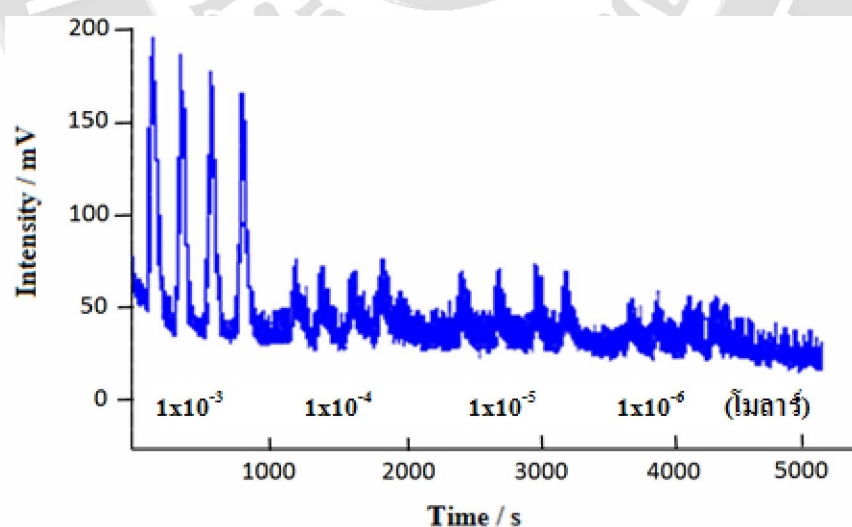
ภาพ 31 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส



ภาพ 32 พิกสัญญาณ μ FI-CL ของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

2. การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์

การหาขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำได้โดยการนำสารมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ในช่วง 1×10^{-6} - 1×10^{-3} โมลาร์ มาฉีดเข้าไปในระบบเพื่อสังเกตความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบพิกสัญญาณได้โดยระบบ AuNP/GODx ที่พัฒนาขึ้น โดยพิจารณาจากความสูงของพิกสัญญาณ เทียบกับพื้นหลังพบว่าได้ผลดังภาพ 33



ภาพ 33 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในการวิเคราะห์กลูโคสโดยวิธี AuNP/GODx

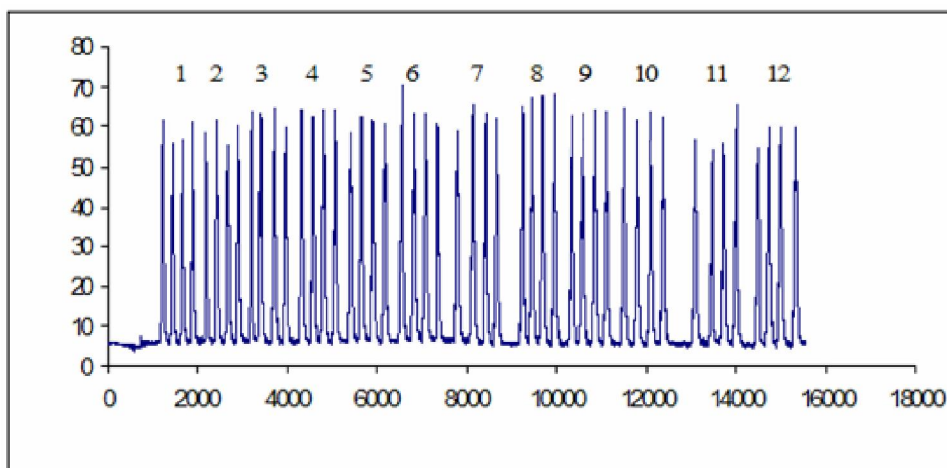
แม่น และอมร (2534) ได้กล่าวว่า ขีดจำกัดของการตรวจหา หมายถึง ความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ซึ่งสามารถให้สัญญาณเป็น 2 หรือ 3 เท่าของพื้นหลังหรือสัญญาณรบกวน ซึ่งอาจอนุมานได้จากกราฟระหว่าง signal-to-noise ratio กับความเข้มข้นของกลูโคสในภาพ 33 ดังนั้นความเข้มข้นที่ 1×10^{-5} โมลาร์ จึงเป็นขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ และทำให้สามารถกล่าวได้ว่า วิธี $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลูโคสที่ต่ำกว่า 1×10^{-5} โมลาร์ ได้

3. การศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือ

ในการศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือในการวิเคราะห์แบบวิธี $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ได้ทำการทดสอบโดยการนำสารมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 6×10^{-4} โมลาร์ มาฉีดเข้าไปในระบบ AuNP/GODx ที่มีสภาวะดังตาราง 13 จำนวน 12 ครั้ง พบว่า ได้ผลดังตาราง 14 และภาพ 34 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 5.47 ซึ่งเป็นค่าที่พอที่จะยอมรับได้

ตาราง 14 ผลการศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือ AuNP/GODx

ครั้งที่	ค่าความสูงของพีค (MV)
1	57.0 $\pm$ 1.0
2	56.8 $\pm$ 1.3
3	57.5 $\pm$ 0.1
4	53.2 $\pm$ 0.1
5	57.1 $\pm$ 0.1
6	58.9 $\pm$ 2.0
7	61.4 $\pm$ 1.5
8	62.5 $\pm$ 0.5
9	52.6 $\pm$ 0.1
10	56.0 $\pm$ 1.0
11	54.5 $\pm$ 4.9
12	53.3 $\pm$ 0.0
ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	56.7
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	3.1
เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)	5.47



ภาพ 34 สัญญาณ μ FI-CL ในการศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือ

4. การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้ อีก

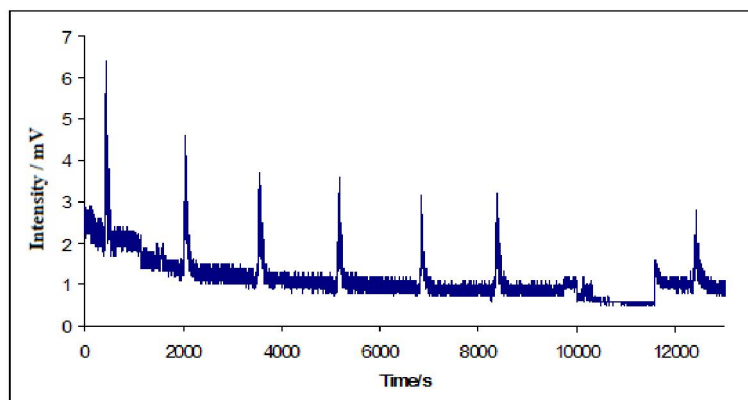
4.1 การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้ อีกใน 1 วัน

ได้นำ AuNP/GODx ไปโอรี่แอคเตอร์ที่ได้มาทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้ อีกภายใน 1 วัน โดยทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ เข้าไปในระบบเพื่อทดสอบว่าใน 1 วัน (ทุกๆ 10 นาที) ฉีดกี่ครั้งฟลักจึงลดลง 5% และ 50% ซึ่งได้ผลการทดสอบดังตาราง 15 และภาพ 35

ตาราง 15 การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้ อีกใน 1 วัน

ครั้งที่ฉีด	ค่าความสูงของฟลัก (mV)	ความสูงของฟลักที่	
		ลดลง	เปอร์เซ็นต์ความสูงของฟลักที่ลดลง
1	3.7	-	-
2	2.9	0.8	21.6
3	2.3	1.4	37.8
4	2.4	1.3	35.1
5	2.1	1.6	43.2
6	2.1	1.6	43.2
7	1.6	2.1	56.8

โดยพบว่าใน 1 วัน AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ จะให้สัญญาณลดลง 50% หลังจากฉีดไปได้ 7 ครั้ง



ภาพ 35 สัญญาณ μ FI-CL ในการทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกใน 1 วัน

4.2 การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกใน 15 วัน

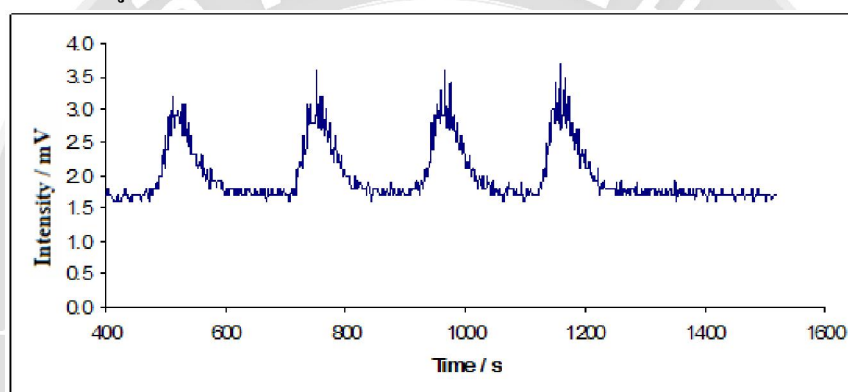
ได้นำ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ที่ได้มาทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกภายใน 15 วัน โดยทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ เข้าไปในระบบเพื่อทดสอบว่าภายใน 15 วัน ฉีดกี่ครั้งฟลักจึงลดลง 5% และ 50% ซึ่งได้ผลการทดสอบดังตาราง 16 และตัวอย่างสัญญาณ μ FI-CL ดังภาพ 36

ตาราง 16 การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกใน 15 วัน

ครั้งที่ฉีด	ค่าความสูงของพีค (mV)	ความสูงของพีคที่ลดลง	เปอร์เซ็นต์ความสูงของพีคที่ลดลง
1	3.7	-	-
2	2.0	1.7	54.0
3	1.6	2.1	56.8
4	1.4	2.3	62.2
5	1.5	2.2	59.5
6	1.7	2.0	54.1
7	1.5	2.2	59.5
8	1.5	2.2	59.5
9	1.7	2.0	54.1

10	1.3	2.4	64.9
11	1.5	2.2	59.5
12	1.6	2.1	56.8
13	1.3	2.4	64.9
14	1.5	2.2	59.5
15	1.4	2.3	62.2

โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปความสูงของพีคที่ลดลงมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ตลอด 15 วันที่ทำการทดสอบ ดังนั้นจึงเลือกใช้ AuNP/GODx ไปโอรีแอคเตอร์ภายหลังการตรึง 1 วันมาใช้ในการวิเคราะห์กลูโคสต่อไป



ภาพ 36 ตัวอย่างสัญญาณ μ FI-CL ในวันที่ 2 ของการทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้อีกใน 15 วัน

5. การศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนที่สำคัญ

การศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนที่สำคัญและพบได้ในตัวอย่างเลือด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก ดี-กาแลกโตส กรดซิทริก กรดออกซาลิกคาเฟอีน 4-อะซีตามิโดฟีนอล กรดยูริก คอเลสเตอรอล และกรดซาลิไซลิก ซึ่งเป็นตัวรบกวนที่สำคัญในการวิเคราะห์กลูโคสด้วยวิธี enzymatic assay สามารถทำได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ มาฉีดเข้าระบบเพื่อให้เป็นพีคมาตรฐานเปรียบเทียบ จากนั้นนำสารละลายอีก 1 ขวดที่ประกอบไปด้วยสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ ผสมกับสารละลายมาตรฐานของสารรบกวนที่ต้องการศึกษาซึ่งมีความเข้มข้น 3×10^{-4} โมลาร์ เช่นกัน (อัตราส่วน 1:1) มาฉีดเข้าระบบเพื่อเปรียบเทียบพีคสัญญาณที่ได้กับพีคมาตรฐานเปรียบเทียบ หากพบว่าพีคสัญญาณจากสารละลายผสมมีความสูงหรือต่ำกว่าพีคมาตรฐานเปรียบเทียบ 10% จะถือว่าเกิดการรบกวน โดย

หากไม่พบการรบกวนก็จะเพิ่มอัตราส่วนความเข้มข้นของสารรบกวนเป็น 1:10, 1:100 และ 1:1000 ซึ่งผลของสารรบกวนในอัตราส่วนต่างๆ ที่ทำให้เกิดการรบกวนต่อฟิสิกส์สัญญาณของการวิเคราะห์ แสดงดังตาราง 17

ตาราง 17 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนที่สำคัญ

Tolerance (ratio)	Interferences
1:1	L-ascorbic acid 4-acetamidophenol uric acid และ salicylic acid
1:10	d-galactose citric acid และ cholesterol
1:100	oxalic acid และ caffeine

จากผลการศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนที่สำคัญซึ่งมีผลต่อความเข้มแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ในการวิเคราะห์กลูโคสด้วยระบบ AuNP/GODx เช่น กรดแอสคอร์บิก 4-อะซีตามิโดฟีโนล กรดยูริก และกรดซาลิไซลิก มีผลทำให้ความเข้มของแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ลดลง

6. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง

6.1 วิธีการหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด

ในการหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด ได้ทำการศึกษาโดยวิธีกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) โดยเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครและผู้ทำการทดลองเอง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนที่เป็นซีรัมมาวิเคราะห์ด้วยวิธี μ FI-AuNP/GODx เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ชนิดสเปกโตรสโคปี เอนไซม์ แอสเสย์ ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าได้ผลดังตาราง 18

6.2 วิธีการหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลัง

ในการหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลังบางชนิดที่เก็บจากท้องตลาดในอำเภอสนทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธีกราฟมาตรฐาน เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี μ FI-AuNP/GODx จากการทดลองหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเครื่องดื่มจำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าระหว่าง 10.12 ± 1.2 ถึง 98.92 ± 0.2 กรัมต่อหน่วยปริมาตร ตามลำดับ

แต่เปรียบเทียบกับกับปริมาณที่ระบุไว้บนฉลากและวิธีมาตรฐานของ AOAC พบว่ายังได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ยังไม่สัมพันธ์กัน อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลหรือสารเติมแต่งชนิดอื่นที่มีอยู่ในเครื่องดื่มๆ ที่เกิดการรบกวนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าว ซึ่งต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อแก้ไขผลการรบกวนดังกล่าว หรือศึกษาวิธีการเตรียมสารตัวอย่างที่เหมาะสมกับอาหารให้การวิเคราะห์ทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและเชื่อถือได้ต่อไป

ตาราง 18 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด โดยวิธี AuNP/GODx เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่าง	DILUTION FACTOR	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิโมลาร์)		
		วิธี AuNP/GODx*	วิธีมาตรฐาน*	t-value (95%)
S1	2	14.0±0.4	14.79±0.64	1.813
S2	2	12.6±0.5	13.11±0.64	1.088
S3	-	9.0±0.2	9.81±0.64	2.093
S4	-	6.6±0.4	7.54±0.64	2.156
S5	-	2.4±0.2	2.57±0.32	0.779
S6	2	7.4±0.7	8.05±0.32	1.463

หมายเหตุ * n=3

7. การหาค่าร้อยละการกลับคืน

การหาค่าร้อยละการกลับคืนสามารถหาได้จากการเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธีการเติมสารมาตรฐานกับวิธีกราฟมาตรฐานพบว่าในตัวอย่างซีรัมมีค่าร้อยละการกลับคืนดังตาราง 19

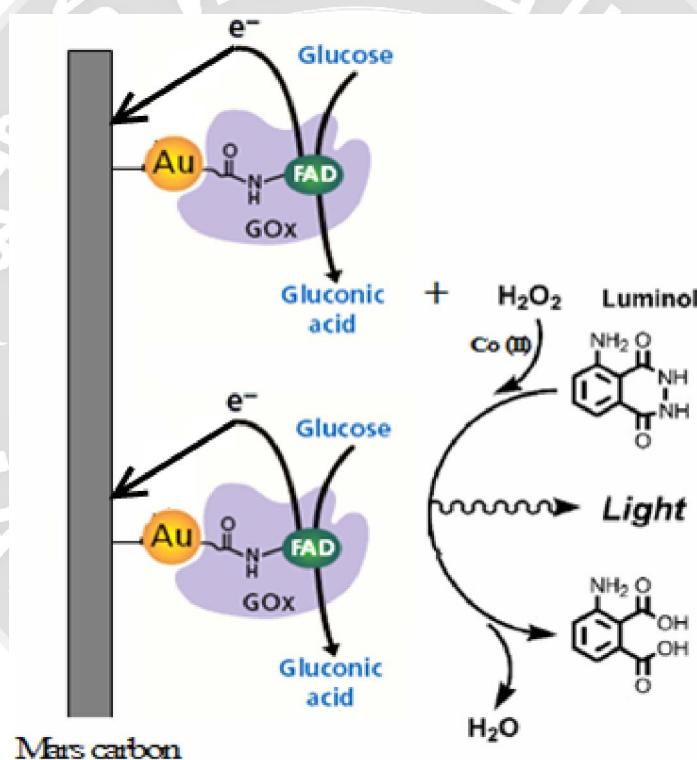
ตาราง 19 ร้อยละการกลับคืนของกลูโคสในตัวอย่างซีรัม

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เติมลงในตัวอย่าง ($\times 10^{-4}$ โมลาร์)	ความเข้มข้นที่อ่านได้	ความเข้มข้นที่กลับคืน	ร้อยละการกลับคืน
0	0.06	-	-
2.0	1.98	1.92	96.0
3.0	3.02	2.96	98.7
4.0	3.90	3.84	96.0
5.0	5.08	5.02	100.4

หมายเหตุ โดยร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยของกลูโคสในซีรัมมีค่าเท่ากับ 97.8

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยนี้ได้ออกแบบและประดิษฐ์ระบบไมโครฟลูอิดิกโพลีเมอร์เจกชันเคมีลูมินเนสเซนซ์ (μ FI-CL) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นได้นำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์กลูโคสในอาหารและของเหลวทางชีวภาพ โดยการปรับปรุงแท่งคาร์บอนด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสร่วมกับอนุภาคนาโนทองคำ (AuNP/GODx) สำหรับเป็นไบโอรีแอคเตอร์ที่มีการตรวจวัดแบบ μ FI-CL ซึ่งเป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะสามารถพัฒนาเทคนิค μ FI-CL ให้มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์เพิ่มสูงขึ้น เพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ กลไกการเกิดแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์เกิดได้ดังปฏิกิริยาดังภาพ 37



ภาพ 37 สรุปกลไกการเกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ด้วยไบโอรีแอคเตอร์กลูโคสออกซิเดส/ทองคำนาโน

การคายแสงจากปฏิกิริยาข้างต้น ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของกลูโคสที่มีอยู่ในตัวอย่าง สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างได้ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ การหาความถูกต้อง ความแม่นยำ และปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัดกลูโคส จึงได้ดำเนินการเพื่อศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบ μ FI-CL ที่มีการควบคุมการแพร่

อัตราการไหลและจลนศาสตร์ ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญในการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยต้องการให้ได้การตรวจวัดเกิดขึ้นในสภาวะที่ควบคุมได้และในการเกิดปฏิกิริยาขึ้นในระหว่างการผสมโดยการแพร่ นั้นจะทำให้ความสูงของพีคสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อปฏิกิริยาได้ดำเนินจนถึงจุด ๆ หนึ่ง จะได้ค่าการตอบสนองที่สูงที่สุดของปฏิกิริยานั้น

ในการทดสอบระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นตัวแปรที่สำคัญที่มีผลต่อการแพร่ของสารตัวอย่างทางกายภาพ เช่น อัตราการไหล ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ในการฉีด เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ในการฉีด ถ้าเพิ่มปริมาตรของสารตัวอย่าง ในการวิเคราะห์โดยวิธี $\mu\text{FI-CL}$ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนตำแหน่งที่พบสัญญาณในการวิเคราะห์แต่เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่างจะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มมากขึ้น หากปริมาตรสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นก็จะพบว่าความกว้างของสัญญาณจะเพิ่มขึ้นด้วย แต่ถ้าในการศึกษานั้น ๆ มีการใช้สารตัวอย่างในปริมาตรที่สูงมากเกินไปจะพบว่าสัญญาณของ $\mu\text{FI-CL}$ จะมีลักษณะเป็นพีคหัวตัด ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มปริมาตรของสารตัวอย่างจึงทำให้ความกว้างของสัญญาณเพิ่มขึ้น

ซึ่งภายหลังจากการทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อพัฒนาและนำมาใช้ประยุกต์สำหรับการศึกษาหาปริมาณกลูโคสในอาหารบางชนิดและของเหลวทางชีวภาพ โดยมี AuNP/GODx ไบโอดีแอคเตอร์ร่วมด้วย พบว่าถ้าเพิ่มปริมาตรของสารตัวอย่างในการวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อชั่วโมงพบว่าปริมาณสารที่ฉีดเข้าไปในระบบแม้ว่าจะฉีดเข้าไปปริมาณมากก็ไม่สามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากความจุของพื้นที่ผิวในการเร่งปฏิกิริยาที่ตรงเอ็นไซม์ไว้นั้นมีจำกัด จึงไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งหมด

ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพระบบ $\mu\text{FI-CL}$ แสดงดังตาราง 9 และภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์สำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอดีแอคเตอร์ ซึ่งแสดงดังตาราง 12 และภายใต้สภาวะดังกล่าว สามารถทำการศึกษาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างอาหารบางชนิดและของเหลวทางชีวภาพได้

การศึกษาคูณลักษณะในการวิเคราะห์ โดยระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอดีแอคเตอร์ที่พัฒนาขึ้น พบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณกลูโคสในตาราง 12 สามารถสร้างกราฟมาตรฐานที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์กลูโคสอยู่ในช่วง $0.5 \times 10^{-4} - 12.0 \times 10^{-4}$ โมลาร์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9941

การศึกษาหาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ซึ่งอนุมานได้จากกราฟระหว่าง signal-to-noise-ratio กับความเข้มข้นของกลูโคสในภาพ 24 พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-6} โมลาร์ เป็นขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ และทำให้สามารถกล่าวได้ว่าระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ ที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์กลูโคสที่มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 1.0×10^{-6} โมลาร์ ได้

การศึกษาความแม่นยำของระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ ที่ใช้ในการวิเคราะห์พบว่าให้ความแม่นยำที่สามารถยอมรับได้ คือมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 3.10 และเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 5.47

การทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้ อีกใน 1 วัน โดยทดสอบว่าฉีดกี่ครั้ง ฟิคจึงลดลง 5% และ 50% โดยทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 3.0×10^{-4} โมลาร์ ทุกๆ 10 นาที พบว่าเมื่อฉีดครั้งที่ 2 ฟิคลดลงไป 21.6% และเมื่อฉีดไปได้ 7 ครั้ง ฟิคลดลงไป 56.8% และคงที่อยู่นั้น นอกจากนั้นการทดสอบความสามารถในการกลับมาใช้ได้ อีกของไบโอรีแอคเตอร์ในระยะเวลา 15 วัน โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 3.0×10^{-4} โมลาร์ เช่นเดียวกัน วันละครั้งเป็นเวลา 15 วัน เปรียบเทียบกับครั้งสุดท้ายของวันแรกที่ฉีด พบว่าฟิคไม่ลดลงมากนัก โดยมีค่าระหว่าง 54.0% - 62.2% เฉลี่ย 52.2% ซึ่งค่อนข้างคงที่ตลอด 15 วัน

การศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนที่สำคัญซึ่งมีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ได้แก่ D-galactose, citric acid, cholesterol, oxalic acid และ caffeine สารเหล่านี้จะมีผลต่อการวิเคราะห์เมื่อมีความเข้มข้นอยู่ในระบบ 1:10 ถึง 1:100 ส่วน L-ascorbic acid, 4-acetamidophenol, uric acid และ salicylic acid พบว่าเกิดการรบกวนอย่างมากแม้ว่ามีในอัตราส่วนเพียง 1:1 จะมีผลต่อการวิเคราะห์แม้จะมีการเจือปนในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ ซึ่งเกิดจากสารเหล่านี้เป็นตัวรบกวนที่พบว่ามีจะเป็นตัวรบกวนที่พบในการใช้กลูโคสออกซิเดสในการวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโทรสโคปี ชนิดเอนไซม์แอสเสย์เช่นกัน ซึ่งหากตัวอย่างจริงมีสารเหล่านี้เจือปนอยู่จะมีผลทำให้การวิเคราะห์มีค่าต่ำปลอม และการศึกษาร้อยละการกลับคืนของกลูโคสในตัวอย่างเลือดด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ ในตัวอย่างซีรัม อยู่ในช่วง 89.0-100.4

จากการทดลองหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือดด้วยระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ ได้แก่ S1, S2, S3, S4, S5 และ S6 พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 14.0 ± 0.4 ถึง 2.4 ± 0.2 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานสเปกโทรสโคปีชนิดเอนไซม์แอสเสย์ พบว่ามีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาหาความแตกต่างของข้อมูลที่ได้ทั้ง 2 วิธีด้วยค่าที (t-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และที่ระดับความเสรีเท่ากับ 4 ซึ่งทำการทดสอบโดยคำนวณค่า t จากผลของการทดลองทั้งสอง คือ ระบบ $\mu\text{FI-CL}$ ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอค

เตอร์ และวิธีมาตรฐานแล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่า t ในตารางแจกแจงแบบที่ โดยค่า t จากตารางแจกแจงแบบที่เท่ากับ 2.776 จากการคำนวณค่า t ของทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่าค่า t ที่คำนวณได้มีค่าไม่มากกว่าค่า t จากตาราง ดังนั้นค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่ตรวจพบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงอาจกล่าวได้ว่าระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการทดลองหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเครื่องดื่มจำนวน 9 ตัวอย่างโดยวิธีการมาตรฐานด้วยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ พบว่ามีค่าระหว่าง 10.12 ± 1.2 ถึง 98.92 ± 0.2 กรัมต่อหน่วยบริโภค ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

ได้ทำการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสโดยระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ พบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไว มีความถูกต้อง และแม่นยำ สามารถวิเคราะห์ได้ง่ายและรวดเร็ว เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาถูก และที่สำคัญคือ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งนำไปสู่การตรวจสอบหาปริมาณกลูโคสได้ตามที่ตั้งจุดมุ่งหมายไว้ก่อนทำการทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์การใช้รีเอเจนต์ที่มีราคาแพงได้อีกด้วย โดยระบบที่พัฒนาขึ้นยังสามารถดัดแปลงใหม่เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์สารที่สนใจตัวอื่น ๆ ได้ตามความเหมาะสมของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้น

ในระบบ μ FI-CL ร่วมกับ AuNP/GODx ไบโอรีแอคเตอร์ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสนั้นเป็นระบบที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว มีสภาพไวสูง และมีคุณลักษณะในการวิเคราะห์พื้นฐานอยู่ในเกณฑ์ที่ดี ซึ่งอาจประยุกต์การตรึงเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น คลอเรสเตอรอลออกซิเดสมาตรึงบนไบโอรีแอคเตอร์ เพื่อสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์คลอเรสเตอรอลในตัวอย่างอาหารหรือของเหลวทางชีวภาพชนิดอื่นๆ ได้ ดังนั้นจึงไม่เป็นที่แปลกใจที่พบว่าบทความวิจัยและความสนใจในการวิเคราะห์แบบ μ FI-CL มีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยการปรับปรุงพื้นผิวของระบบไมโครฟลูอิดิกด้วยวัสดุชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นที่คาดว่ากรวิเคราะห์แบบ μ FI-CL จะมีบทบาทสำคัญต่อการวิเคราะห์สารตัวอย่างประเภทต่างๆ ต่อไปในอนาคตอันใกล้

บรรณานุกรม

- นีโบล เนื่องตัน. 2542. **ชีวเคมี 1**. กรุงเทพฯ: ธรรมสาร. 540 น.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร**. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 442 น.
- แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2534. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ**.
กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์. 886 น.
- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภวดี สุทธิไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์
เหลียวเรืองรัตน์, อุมพร สุขม่วง และวันเพญ ช้อนแก้ว. 2553. **หลักการและเทคนิคการ
วิเคราะห์เชิงเครื่องมือ**. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์. 623 น.
- วารสาร บัณฑิต. 2552. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis.
วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม 16(2): 14.
- หน่วยวิจัยด้านลำไออนและการประยุกต์ ศูนย์วิจัยทางฟิสิกส์ของลำไออนภาคและพลาสมา
ศูนย์ความเป็นเลิศด้านฟิสิกส์. **Microfluidic คืออะไรและมีประโยชน์อย่างไร?.**
[ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://thep-center.org/src/qa_read.php?question_id=1
(6 October 2010).
- Alamo, Lori Shayne T. 2010. **Novel Flow-injection methods for the determination of sulfite
and glucose in food samples**. Chiang Mai : Maejo University. 105 p.
- Bange, Adam Brian H. Halsall and William R. Heineman. 2005. Microfluidic immunosensors
systems—A review. **Biosensors & Bioelectronics** 20: 2488-2503.
- Banker, Sandip B., Mahesh V. Bule, Rekha S. Singhal and Laxmi Ananthanarayan. 2009.
Glucose oxidase—An overview. **Biotechnology Advances** 27: 489-501.
- Chen, Xing, Da F. Cui, Chang C. Liu and Hui Li. 2008. Microfluidic chip for blood cell
separation and collection based on crossflow filtration. **Sensors and Actuator B** 130:
216-221.
- Chen, Yan, Kaleyhia Flowers, Milagros Calizo and Zandra W. Bishnoi. 2010. The role of protein
binding in the poisoning of gold nanoparticle catalysts. **Colloids and Surfaces B:
Biointerfaces**: 78: 241-247.
- Daniel, Daniela and Ivano G. Rolf Gutz. 2003. Quick production of gold electrode sets or arrays
and of microfluidic flow cell based on heat transfer of laser printed toner masks onto
compact discs. **Electrochemistry communications** 5: 782-786.

- De Dios, Alejandro S. and Marta E. Diaz-Garcia. 2010. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. **Analytica Chimica Acta** 666: 1-22.
- Dushkina, Natalia 2008. **Fundamentals of optical element and devices (Part I)**.
[Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Edgar, Jonathan A. and Michael B. Cortie. 2010. **Nanotechnological applications of gold**.
[Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Edwards, Anthony C. Malcolm S. Cresser, Keith A. Smith and Albert Scott. 2004. **Continuous-flow, Flow-injection, and Discrete analysis**.
[Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Enzymes and enzyme technology glucose biosensor**. [Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Garcia-Campana, Ana M. and Willy R. G. Baeyens. 2001. **Chemiluminescence in Analytical Chemistry**. New York. Marcel Dekker. 450 p.
- Karlinsey, James M. and James P. Landers. 2008. **Optical detection systems for microchips**. Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques. Taylor & Francis Group. [Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Kiernan, John A. 2000. **Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do**. [Online]. Available <http://publish.uwo.ca/~jkiernan/formglut.htm> (6 October 2010).
- Kim, Jeong Y., Ju Y. Baek, Hyug Kim, Ky A. Lee and Sang H. Lee. 2006. Integration of enzyme immobilized single-walled carbon nanotube mass into the microfluidic platform and its application for the glucose-detection. **Sensors and Actuator A** 128: 7-13.
- Li, Paul C. H. 2006. **Microfluidic lab-on-a-chip for chemical/biological analysis and Discovery (Detection methods)**. [Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Ma, Li-Na., Liu Dian-Jun and Wang Zhen-Xin. 2010. Sythesis and application of gold nanoparticle probe. **Chinese journal of analytical chemistry** 38(1): 1-7.

- Marle, Leanne and Gillian M. Greenway. 2005. Determination of hydrogen peroxide in rainwater in a miniaturized analytical system. **Analytica Chimica Acta** 548: 20-25.
- Marquette, Chris A. and Loic J. Blum. 1999. Luminol electrochemiluminescence-based fibre optic biosensors for flow injection analysis of glucose and lactate in natural samples. **Analytica Chimica Acta** 381: 1-10.
- Osamu, Nozaki and Hiroko Kawamoto. 2000. Determination of hydrogen peroxide by micro-flow injection-chemiluminescence using a coupled flow cell reactor chemiluminescence. **Luminescence** 15: 137-142.
- Sheldon, Roger A. 2006. **Immobilization of enzyme as cross-linked enzyme aggregate: A simple method for improving performance**. [Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Spohn, U., Preuschoff F., Blankenstein G., Janasek D., Kula M.R. and A. Hacker. 2005. Chemiluminometric enzyme sensors for flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta** 303: 109-120.
- Srinivasan, Vijay, Vamsee K. Pamula and Richard B. Fair. 2004. Droplet-based microfluidic lab-on-a-chip for glucose detection. **Analytica Chimica Acta** 507: 145-150.
- Swaiagood, Harold E. 2003. **Use of immobilized enzymes in the food industry**. North Carolina. Marcel Dekker. [Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Swoboda, B.E.P. and Massey V. 1965. **Glucose oxidase**. [Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Tanguaram, T., C. Ponchio, T. Kangasomboon, P. Katikawong and W. Veerasai. 2007. Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan. **Biosensors and Bioelectronics** 22 (9-10) : 2071-2078
- Van Dyke, Knox and Karen Woodfork. 2002. **Introduction to Luminescence Assay (Section I)**. [Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).
- Whitaker, John R., Alphons G. J. Voragen, and Dominic W. S. Wong. 2003. **Glucose oxidase**. [Online]. Available <http://www.crcnetbase.com> (6 October 2010).

- Zhang, Suxia, Nu Wang, Yaming Niu and Changqing Sun. 2005. Immobilization of glucose oxidase on gold nanoparticles modified Au electrode for the construction of biosensor. **Sensors and Actuator B** 109: 367-374.
- Zhou, Yanxiu, Tsutomu Nagaoka, Feng Li and Guoyi Zhu. 1999. Evaluation of luminol-H₂O₂-KIO₄ chemiluminescence system and its application to hydrogen peroxide, glucose and ascorbic acid assays. **Talanta** 48: 461-467.
- Zhu, Liande, Yingxiu Li and Guoyi Zhu. 2002. A novel flow through optical fiber biosensor for glucose based on luminal electrochemiluminescence. **Sensors and Actuator B** 86: 209-214.

