



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

อนุภาคนาโนแม่เหล็กเคลือบด้วยพอลิเมอร์สำหรับการประยุกต์เป็นอุปกรณ์  
ตรวจวัดทางชีวภาพ

Polymer-coated magnetic nanoparticles for biosensing applications

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ.ดร. ปิยะพร ณ หนองคาย

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ.ดร. ธนิตา ตระกูลสุจริตโชค

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802025

สัญญาเลขที่ 72/2559

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

อนุภาคนาโนแม่เหล็กเคลือบด้วยพอลิเมอร์สำหรับการประยุกต์เป็นอุปกรณ์  
ตรวจวัดทางชีวภาพ

Polymer-coated magnetic nanoparticles for biosensing applications

อ.ดร. ปิยะพร ณ หนองคาย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. ธนิตา ตระกูลสุจริตโชค

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตุลาคม 2559

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 72/2559

## บทคัดย่อ (Abstract)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็กดัดแปรพื้นผิวด้วยการเคลือบด้วยโคพอลิเมอร์แบบสุ่มระหว่างพอลิเมทาคริลิกแอซิด และ พอลิ(2-เมทาคริโกลิลออกซีเอทิลฟอสโฟริลโคลีน) ด้วยปฏิกิริยาแบบ “one pot” โดยอาศัยการตกตะกอนร่วมระหว่าง  $Fe^{2+}$  และ  $Fe^{3+}$  ในสารละลายเบสร่วมกับสภาวะที่มีการเติมสารละลายพอลิเมอร์ อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน (ทีเอ็มบี) ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ เพื่อการนำอนุภาคนาโนที่เตรียมขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์ในการตรวจวัดโปรตีนเป้าหมายจึงจำเป็นต้องทำการตรึงไบโอดีโนโพรบเพื่อใช้เป็นโพรบในการจับกับสเตรปตาวิดิน โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ในโครงสร้างของ PMAMPC โคพอลิเมอร์ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคกับหมู่อะมิโนของไบโอดีโนโพรบบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแม่เหล็กจะแสดงความจำเพาะเจาะจงในการจับกับโปรตีนกับสเตรปตาวิดิน โดยสามารถทำการตรวจวิเคราะห์หาโปรตีนสเตรปตาวิดินในสารละลายได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์โดยการเทียบสีซึ่งสามารถสังเกตเห็นการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนแม่เหล็กชนิดแมกนีไทต์ที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์ชนิด PMAMPC สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการตรวจวัดทางชีวภาพที่สามารถสังเกตเห็นการตรวจวัดได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงสี

In this work, poly [methacrylic acid-co-2-methacryloxyethyl phosphorylcholine] (PMAMPC)-functionalized magnetite nanoparticles thereafter called  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC were successfully synthesized by a simple one-pot reaction. Chemical co-precipitation of ferrous/ferric mixed salt-solution in alkaline medium and direct polymer addition were conducted. The  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC exhibited an excellent peroxidase catalytic activity behavior for the reaction of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in a presence of  $H_2O_2$  to produce blue color products. In order to apply for targeted protein detection,  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC were immobilized with biotin probe for SA detection. The carboxyl groups on  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC were utilized for biotin immobilization via an amide bond formation between the amino group of  $NH_2$ -biotin and the carboxyl group of the MA unit in the PMAMPC. The bioninylated  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC showed the specific binding with streptavidin (SA) molecules. The colorimetric assays can be read out by the naked eye. All results have demonstrated the potential of  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC for colorimetric biosensing application.

# สารบัญ

	หน้า
<b>1. บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
<b>2. วิธีดำเนินการวิจัย</b>	<b>8</b>
2.1 สารเคมี	8
2.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์	8
2.3 การตรึงไปโอตินโพรบ	9
2.4 การศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวัดโปรตีนเป้าหมาย	10
<b>3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง</b>	<b>12</b>
3.1 การตรึงไปโอตินโพรบ	12
3.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวัดโปรตีนเป้าหมาย	15
<b>4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ</b>	<b>20</b>
4.1 สรุปผลการทดลอง	20
1.2 ข้อเสนอแนะ	20
<b>ผลผลิต</b>	<b>21</b>
<b>บรรณานุกรม</b>	<b>22</b>
<b>ประวัตินักวิจัย</b>	<b>23</b>

## สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	Schematic diagram of a biosensor device	3
1.2	เทคนิค immunomagnetic separation	3
1.3	การใช้ออนุภาคนาโนแม่เหล็กในการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสในสารตัวอย่าง	4
1.4	การตรวจวัดโปรตีนจากการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการเปลี่ยนสีขั้วสเตรท	6
3.1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอดีนก่อนและหลังการตรึง; ก่อนการตรึง (เส้นสีน้ำเงิน), ภายหลังการตรึงในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วย 15 mg/mL EDC/NHS (เส้นสีเหลือง), ภายหลังการตรึงในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วย 25 mg/mL EDC/NHS (เส้นสีเทา), และภายหลังการตรึงในสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วย 50 mg/mL EDC/NHS (เส้นสีม่วง)	13
3.2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอดีนก่อนและหลังการตรึง; ก่อนการตรึง (เส้นสีน้ำเงิน), ภายหลังการตรึงในสภาวะที่มีการกระตุ้นที่เวลา 15 นาที (เส้นสีแดง และภายหลังการตรึงในสภาวะที่มีการกระตุ้นที่เวลา 30 นาที (เส้นสีม่วง)	14
3.3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอดีนก่อนและหลังการตรึง; ก่อนการตรึง ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL (เส้นทึบสีแดง), ภายหลังการตรึงที่ความเข้มข้น 5 mg/mL (เส้นประสีแดง), ก่อนการตรึงที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (เส้นทึบสีน้ำเงิน), และภายหลังการตรึงที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (เส้นประสีน้ำเงิน)	15
3.4	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในหลอดตัวอย่างที่ไม่มีโมเลกุลเป้าหมาย (เส้นทึบ) และหลอดตัวอย่างที่มีโมเลกุลเป้าหมาย (เส้นประ)	16
3.5	ภาพถ่ายการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย (a) และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย (b) ในสภาวะการตรวจวิเคราะห์โปรตีนชนิด HAS และ SA	17
3.6	ร้อยละการยับยั้งสมบัติ peroxidase-like activity ของอนุภาค Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs-PMAMPC-biotin (% inhibition) ภายหลังการตรวจวิเคราะห์โปรตีนชนิด HAS และ SA	18
3.7	กราฟเส้นตรงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ SA และค่าการดูดกลืนแสง	19

# 1. บทนำ (Introduction)

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันอุปกรณ์ตรวจวัดหรือเซ็นเซอร์เข้ามามีบทบาทสำคัญกับมนุษย์มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพหรือเซ็นเซอร์ชีวภาพ (biosensor) ซึ่งเกี่ยวข้องกับสุขภาพอนามัยของมนุษย์ เช่น อุปกรณ์สำหรับตรวจวินิจฉัยโรค ตรวจการตั้งครรภ์ และตรวจวัดปริมาณน้ำตาลในเลือด เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีของเซ็นเซอร์ชีวภาพอย่างต่อเนื่อง โดยมีเป้าหมายสำคัญ คือ การพัฒนาเซ็นเซอร์ชีวภาพที่ให้ผลการตรวจวัดที่รวดเร็ว มีความถูกต้อง แม่นยำสูง และราคาถูก

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพโดยอาศัยการตรวจติดตามการเปลี่ยนสีหรือที่เรียกว่า colorimetric detection ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถสังเกตเห็นผลของการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายด้วยตาเปล่า ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือที่มีราคาแพงในห้องปฏิบัติการ รวมถึงทำได้สะดวกและรวดเร็ว นับเป็นหลักการที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน อุปกรณ์ตรวจวัดที่มีการใช้งานกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ อนุภาคนาโนทองคำ (gold nanoparticles; AuNPs) ที่อาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงของสีหรือค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs อันเป็นผลเนื่องมาจากการดูดซับของโมเลกุลที่ต้องการวิเคราะห์ นอกจากนี้ ยังมีอนุภาคอีกชนิดที่ได้รับความนิยมคือ อนุภาคนาโนแม่เหล็ก (magnetic nanoparticles; MNPs) จากสมบัติ peroxidase-like activity หรือสมบัติการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ peroxidase substrate ในสถานะที่มี  $H_2O_2$  ได้เหมือนกับเอนไซม์ peroxidase ที่มีในธรรมชาติ เช่น horseradish peroxidase (HRP) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของ peroxidase substrate ที่สามารถใช้ในการตรวจติดตามการตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ ประกอบกับอนุภาคนาโนแม่เหล็กมีสมบัติทางแม่เหล็กที่เอื้อต่อการแยกอนุภาคออกจากสารละลายได้ง่ายด้วยการให้สนามแม่เหล็ก (magnet) ดังนั้นจึงได้รับความนิยมในการนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการแยกด้วยหลักการทางอิมมูโน (immunomagnetic separation; IMS) ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารที่ต้องการออกจากสารตัวอย่างผสม โดยอาศัยการจดจำทางชีวภาพ (biological recognition mechanism) ระหว่างโมเลกุลของสารที่สนใจ และโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจวัด (โพรบ) ที่ถูกตรึงบนอนุภาคนาโนแม่เหล็ก โดยสารที่ต้องการตรวจวัดหรือแยกจะยึดติดอยู่กับอนุภาคนาโนแม่เหล็กและถูกแยกออกจากสารอื่นได้โดยง่ายและถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆ ต่อไป เช่น การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) และ mass spectrometry

ถึงแม้จะมีรายงานวิจัยที่นำอนุภาคนาโนแม่เหล็กมาใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพอย่างแพร่หลาย แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมายังคงพบปัญหาเกี่ยวกับความไม่จำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดระหว่างโพรบ และโมเลกุลอื่นที่ไม่ใช่โมเลกุลที่ต้องการวิเคราะห์ ก่อให้เกิดสัญญาณรบกวนในการ

วิเคราะห์ ส่งผลให้ค่า signal-to-noise (S/N ratio) รวมถึง selectivity ของอุปกรณ์ตรวจวัดมีค่าต่ำ อีกทั้งไม่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดในสารตัวอย่างที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน เช่น blood plasma หรือ นม ได้ ประกอบกับการวิเคราะห์ยังต้องอาศัยเครื่องมือและเทคนิคต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษา และพัฒนาการดัดแปรพื้นผิวของ MNPs ให้มีความเหมาะสมสำหรับเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพที่สามารถตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจงและสามารถสังเกตเห็นการตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่า โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการดัดแปรพื้นผิวของ  $Fe_3O_4$  NPs ด้วยการเคลือบด้วยโคพอลิเมอร์แบบสุ่มระหว่างพอลิเมทาคริลิกแอซิด และ พอลิ(2-เมทาคริลอิลออกซีเอทิลฟอสโฟริลโคลีน) (poly[(methacrylic acid)-ran-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)]) หรือ พีเอ็มเอเอ็มพีซี (PMAMPC) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่คณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบให้มียึดประกอบของทั้งส่วนที่ทำหน้าที่ในการตรึงโพรบ (หมู่คาร์บอกซิล) และส่วนที่ทำหน้าที่ในการต้านการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (หมู่ฟอสโฟริลโคลีน) โดยคาดว่าจะสามารถนำอนุภาคที่เคลือบด้วยพีเอ็มเอเอ็มพีซีไปใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวินิจฉัยโรค ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ มีความสะดวกและรวดเร็ว และที่สำคัญไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือราคาแพงในการตรวจวิเคราะห์ต่อไปได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กเคลือบด้วยพีเอ็มเอเอ็มพีซีมาใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดโปรตีนที่สามารถสังเกตเห็นการตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่า

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

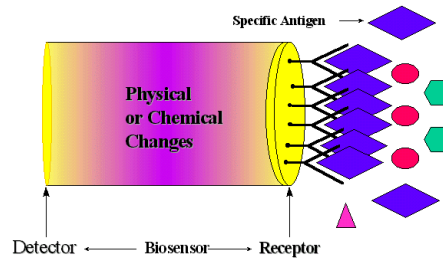
- 1.3.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงโพรบ (ไบโอติน) ด้วยปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของไบโอติน ( $NH_2$ -biotin) และหมู่คาร์บอกซิลของ  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC
- 1.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของการนำ  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC ที่ตรึงด้วยไบโอติน มาใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมาย คือ โปรตีน streptavidin ในสารละลายตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิคทาง Colorimetric assay

## 1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

หลักการพื้นฐานของการตรวจวัดทางชีวภาพ คือ อาศัยการจดจำทางชีวภาพ (biological recognition mechanism) ที่ก่อให้เกิดการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างสารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสำหรับตรวจวัด (โพรบ) และสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (analyte) เช่น ความจำเพาะเจาะจงซึ่งกันและกันระหว่างคู่แอนติเจนและแอนติบอดี หรือดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกัน โดย

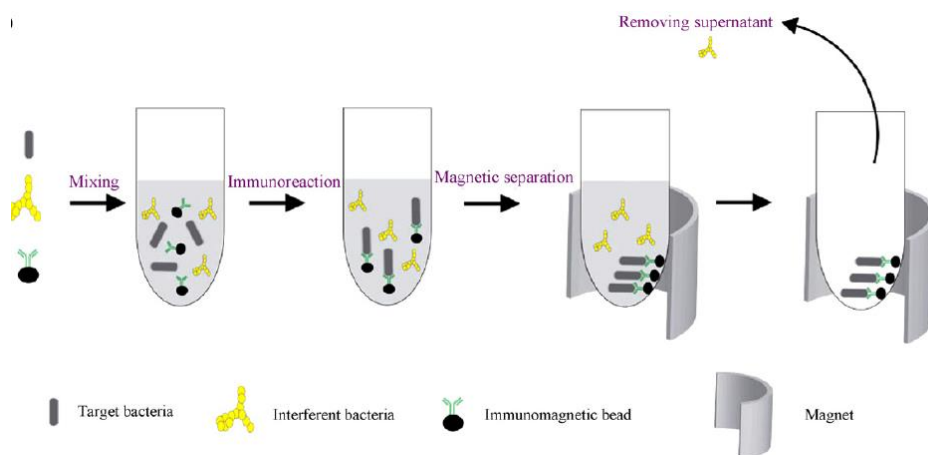


โพรบจะถูกตรึงลงบนอุปกรณ์ตรวจวัด และเมื่ออุปกรณ์ดังกล่าวตรวจพบสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ จะทำให้เกิดสัญญาณที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น ทางเคมีไฟฟ้า ทางมวล หรือทางแสง



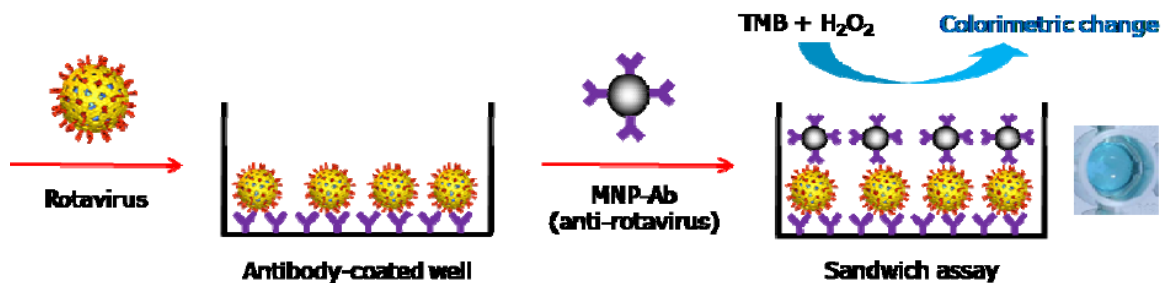
รูปที่ 1.1 Schematic diagram of a biosensor device

Magnetite ( $Fe_3O_4$ ) หรือแร่เหล็ก จัดเป็นสารประกอบออกไซด์ของเหล็กชนิดหนึ่งที่มีสมบัติทางแม่เหล็ก พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีลักษณะเป็นก้อนสีดำ อนุภาคระดับนาโนของ  $Fe_3O_4$  (MNPs) เป็นอนุภาคที่ได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ ตลอดจนในงานด้านการแพทย์ สำหรับการสังเคราะห์ MNPs สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการตกตะกอนร่วมระหว่างเฟอร์รัสไอออน ( $Fe^{2+}$ ) และ เฟอร์ริกไอออน ( $Fe^{3+}$ ) ได้อนุภาคที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค MNPs เป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็ก มีพื้นที่ผิวสูง และยังคงคุณสมบัติทางแม่เหล็ก ดังนั้นจึงได้มีการนำ MNPs มาใช้ในเทคนิคการแยกสารชีวโมเลกุลโดยอาศัยหลักการทางอิมมูโน (immunomagnetic separation; IMS) [1-4] โมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจวัด หรือ โพรบ จะถูกตรึงบนอนุภาคนาโนแม่เหล็กและถูกนำมาใช้แยกสารชีวโมเลกุลที่ต้องการออกจากสารตัวอย่างผสม สารชีวโมเลกุลที่ต้องการตรวจวัดหรือแยกจะยึดติดอยู่กับอนุภาคและถูกแยกออกจากสารอื่นได้โดยการดูดอนุภาคไว้ด้วยแม่เหล็ก (รูปที่ 1.2)



รูปที่ 1.2 เทคนิค immunomagnetic separation [4]

การมีขนาดระดับนาโนของอนุภาคแม่เหล็กทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแร่เหล็กทั่วไป คือ มีสมบัติ peroxidase-like activity ในสภาวะที่มี  $H_2O_2$  ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของซบสเตรท ดังนั้นจึงได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ ที่สามารถตรวจติดตามการตรวจวัดสารได้ง่ายโดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของซบสเตรท ซึ่งในปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยอนุภาคนาโนแม่เหล็กจะอาศัยหลักการเดียวกับเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) โดยมีหลักการดังนี้ คือ แอนติบอดีตัวแรกที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนจะถูกเคลือบบนวัสดุยึดเกาะ เช่น ELISA plate จากนั้นทำการเติมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวแรกที่ติดกับผิววัสดุ ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่เคลือบด้วยแอนติบอดีตัวที่สองที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ถูกจับไว้ ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป แล้วเติมซบสเตรทที่เหมาะสมเพื่อตรวจวัดการทำงานของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก ในกรณีที่สารตัวอย่างมีแอนติเจนจะทำให้อนุภาคนาโนแม่เหล็กถูกจับไว้ที่ ELISA plate และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของ ซบสเตรท ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของแอนติเจนในตัวอย่าง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของซบสเตรทได้ด้วยตัวเองโดยไม่ต้องติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์เหมือนในกรณีของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งถือเป็นข้อได้เปรียบอย่างหนึ่งของการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็ก ตลอดจนอนุภาคนาโนแม่เหล็กมีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดเบสของสารละลายมากกว่าเอนไซม์ ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์ใช้งานได้ในช่วงที่กว้างกว่าการใช้เอนไซม์ [6]

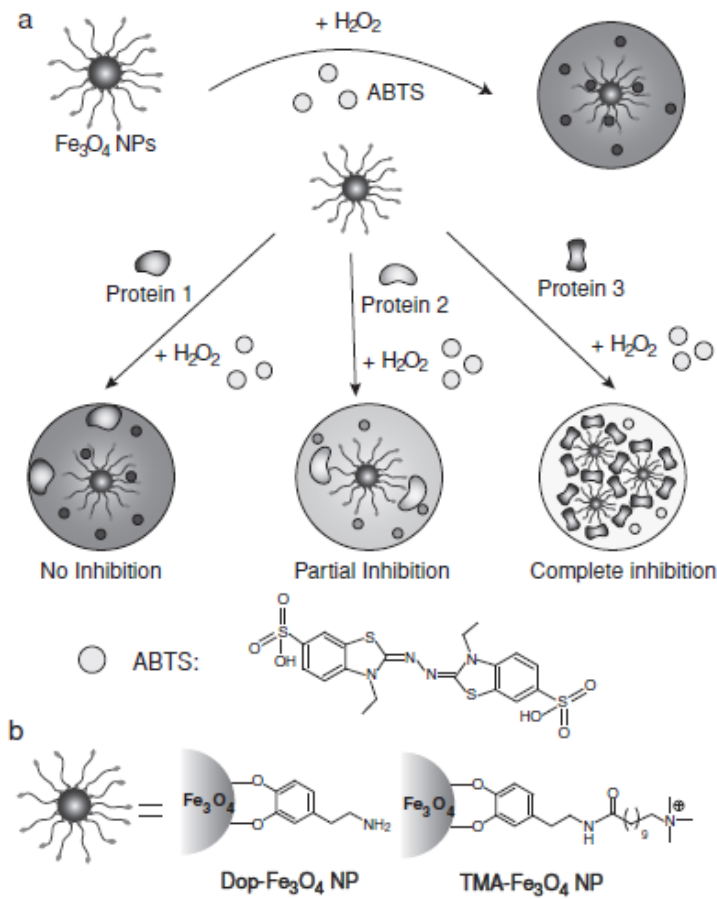


รูปที่ 1.3 การใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กในการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสในสารตัวอย่าง [5]

นอกจากนี้แล้วการพัฒนาอนุภาคนาโนแม่เหล็กให้มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดต่อโมเลกุลเป้าหมาย ยังถือเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพ (efficiency) ความจำเพาะเจาะจง (specificity) และความไว (sensitivity) ของอุปกรณ์ตรวจวัด แนวทางหนึ่งที่ยิมนำมาใช้คือ การนำพอลิเมอร์ฟิล์มบางมาเคลือบบนอนุภาคนาโนแม่เหล็กเพื่อใช้ในการตรึงสารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสำหรับตรวจวัดหรือที่เรียกว่าโพรบ ลงบนอนุภาคนาโนแม่เหล็ก [4, 6-7] ข้อดีของการใช้พอลิเมอร์คือ สามารถออกแบบโครงสร้างของพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันเฉพาะที่สามารถเกิดพันธะทางเคมีที่เสถียรกับสารชีวโมเลกุลได้ โดยส่วนใหญ่พอลิเมอร์ที่นำมาใช้มักจะถูกออกแบบให้มีหมู่คาร์บอก

ซิล หรือไฮโดรซิลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน, แอนติบอดี, เอนไซม์ และดีเอ็นเอ จะมีหมู่แอมิโนเป็นองค์ประกอบ ประกอบกับการที่พอลิเมอร์มีปริมาณและความหนาแน่นของหมู่ฟังก์ชันที่สูงทำให้สามารถตรึงโพรบ หรือให้จำนวนโมลของโพรบต่อพื้นที่ (mole of probes per unit area) ได้ในปริมาณที่สูง ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการตรวจวัดของเซ็นเซอร์ (efficiency) นอกจากนี้พอลิเมอร์ที่ถูกรออกแบบให้มีหมู่ฟังก์ชันเฉพาะที่สามารถช่วยลดการจับยึดกันอย่างไม่จำเพาะเจาะจงระหว่างโพรบและสารอื่นที่ไม่ใช่สารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ยังสามารถช่วยให้อุปกรณ์ตรวจวัดมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวิเคราะห์เพิ่มมากขึ้น (specificity)

จากงานวิจัยที่ผ่านมา แม้ว่าจะมีการนำ MNPs มาประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดโดยอาศัยคุณสมบัติ peroxidase-like activity ของ MNPs แต่ในการตรวจวิเคราะห์ยังคงจำเป็นต้องใช้หลักการของ enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ซึ่งจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเคลือบแอนติบอดีบนวัสดุยึดเกาะ เช่น ELISA plate สำหรับให้ antibody-conjugated MNP เกิดการยึดติดบนวัสดุในการที่มีการตรวจพบสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วค่อยทำการตรวจติดตามด้วยการวิเคราะห์การเปลี่ยนสีของ TMB ต่อไป ซึ่งถือเป็นการเพิ่มขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ ตลอดจนเป็นการเพิ่มต้นทุนในการวิเคราะห์เนื่องจากต้องทำการเคลือบแอนติบอดีซึ่งมีราคาแพงทั้งบน ELISA plate และ MNPs ดังนั้นจึงได้มีผู้สนใจที่จะพัฒนาแนวทางใหม่ในการนำ MNPs มาใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ โดยอาศัยการลดลงหรือการยับยั้งสมบัติ peroxidase-like activity ของ MNPs ภายหลังจากดูดซับของโมเลกุลที่ต้องการวิเคราะห์ เช่นในงานวิจัยของ Li และคณะ (2012) ที่ศึกษาการนำ MNPs มาใช้ในการตรวจวัดโปรตีนชนิดต่างๆ โดยการตรวจติดตามการลดลงหรือการยับยั้งสมบัติ peroxidase-like activity ภายหลังจากดูดซับของโปรตีน ซึ่งทำให้เกิดการลดลงหรือการระงับการเปลี่ยนแปลงสีของซัสเตรท และจากผลการทดลองพบว่า ภายหลังจากดูดซับของโปรตีนจะทำให้ความสามารถในการเปลี่ยนสีซัสเตรทของ MNPs ลดลง โดยสามารถใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความเข้มข้นได้ต่ำถึง 50 nM แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณจะขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน และหมู่ฟังก์ชันทางเคมีบนพื้นผิวของ MNPs และเนื่องจากวิธีการตรวจวิเคราะห์ในการทดลองนี้ไม่ได้อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์โดยจำเป็นต้องมีการใช้ MNPs ที่มีสมบัติทางเคมีหรือมีหมู่ฟังก์ชันที่พื้นผิวที่แตกต่างกันหลายชนิด และทำการวิเคราะห์โดยพิจารณาจากรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของสีที่แตกต่างกัน ซึ่งจะเป็นลักษณะเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด และนอกจากนี้ยังต้องอาศัยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีที่เรียกว่า Linear Discriminant Analysis (LDA) จึงจะสามารถบอกความแตกต่างระหว่างโปรตีนแต่ละชนิดได้ [8]



รูปที่ 1.4 การตรวจวัดโปรตีนจากการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการเปลี่ยนสีซับสเตรท

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการนำ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs ดัดแปรพื้นผิวด้วยโคพอลิเมอร์ชนิด PMAMPC มาใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดโปรตีน streptavidin ในสารละลายที่สามารถสังเกตเห็นการตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยการตรวจติดตามการลดลงหรือการยับยั้งสมบัติ peroxidase-like activity ของอนุภาค  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs-PMAMPC ซึ่งแนวทางที่คณะผู้วิจัยเลือกใช้นี้สามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการเป็นอุปกรณ์ตรวจวินิจฉัยโรค หรือตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสะดวก และรวดเร็ว สามารถพกพาใช้งานในภาคสนามได้ อีกทั้งยังมีราคาถูก

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ได้องค์ความรู้ใหม่ที่สามารถเผยแพร่ความรู้จากงานวิจัยสู่วงวิชาการได้ ผ่านการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor และนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมระดับชาติ

- 1.5.2 ได้อนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสามารถนำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ต้นแบบในการประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำสูง ราคาไม่แพง
- 1.5.3 สามารถนำความรู้จากการวิจัยไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดในงานทางการแพทย์และสาธารณสุขได้ ลดการนำเข้าอุปกรณ์ที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

## 2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)

### 2.1 สารเคมี

1. Iron (II) chloride tetrahydrate ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma - Aldrich)
2. Iron (III) chloride tetrahydrate ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma - Aldrich)
3. 28%w/v Ammonia solution,  $\text{NH}_4\text{OH}$  (QREC)
4. Poly [(methacrylic acid)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] copolymer PMA<sub>21</sub>MPC<sub>79</sub> (50kDa), PMA<sub>21</sub>MPC<sub>79</sub> (20kDa), PMA<sub>21</sub>MPC<sub>79</sub> (9kDa), PMA<sub>37</sub>MPC<sub>63</sub> (50kDa) and PMA<sub>66</sub>MPC<sub>34</sub> (50 kDa) [9]
5. Bio-rad protein assay dye reagent concentrate (BIO - RED)
6. Lysozyme, Lyz (Sigma Aldrich)
7. Bovine serum albumin, BSA (CALBIOCHEM)
8. Phosphate buffer saline, PBS (Sigma Aldrich)
9. 1-(3-(Dimethylamino) propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC (Fluka)
10. N-hydroxysuccinimide, NHS (Fluka)
11. Streptavidin, SA (Sigma Aldrich)
12. O-(2,9-aminoethyl)-O'-[2-biotinylaminoethyl] octaethylene glycol (Thermo Scientific)
13. Acetic acid (QREC)
14. Sodium acetate (Sigma Aldrich)
15. Tetramethylbenzidine, TMB (Sigma Aldrich)
16. Hydrogenperoxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma Aldrich)

### 2.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. เครื่อง Transmission Electron Microscope (TEM) รุ่น TECNAI 20
2. เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) รุ่น LEO 1450 VP
3. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) รุ่น PERKIN ELMER System 2000
4. เครื่อง UV-Visible spectrometer รุ่น HP Hewlett Packard 4853
5. เครื่อง Ultrasonic รุ่น CREST
6. เครื่องชั่ง (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) รุ่น RC 250 S



$C_e$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายโพรบหลังการดูดซับ (ไมโครกรัม/ลิตร)

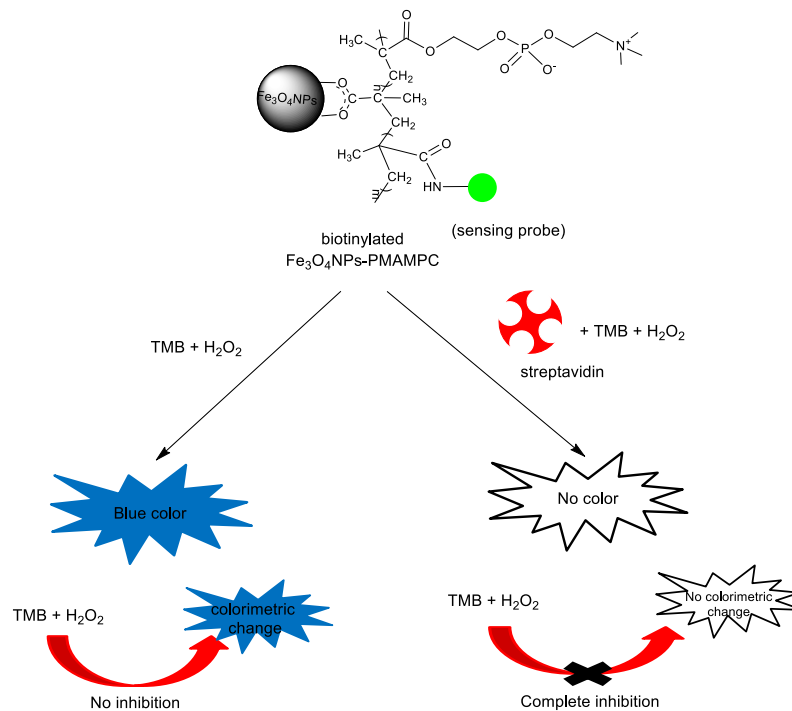
$V$  คือ ปริมาณของสารละลายโพรบ (ลิตร)

$m$  คือ น้ำหนักของอนุภาค (กรัม)

ในการทดลองนี้ ทำการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในตรึงโพรบโดยตัวแปรที่ทำการศึกษา คือ

- ความเข้มข้นของสารละลาย NHS และ EDC
- เวลาที่ใช้ในการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิล
- ความเข้มข้นของโพรบ

## 2.4 ศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวัดโปรตีนเป้าหมาย



ทดสอบการใช้  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC ที่ตรึงด้วยไบโอตินโพรบ ( $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC-biotin) มาเป็นอุปกรณ์ในการตรวจวัดโปรตีนเป้าหมาย คือ streptavidin ในสารละลายตัวอย่างโดยอาศัยการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของ TMB ซึ่งสเตรทในสภาวะที่มี  $H_2O_2$  ทำการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการเปลี่ยนแปลงสีของตัวอย่างที่มีและไม่มีโปรตีนเป้าหมาย ทำการทดลองโดยการเติมอนุภาคแขวนลอยของ  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC-biotin (10 mg/mL, 2.5  $\mu$ L) ลง



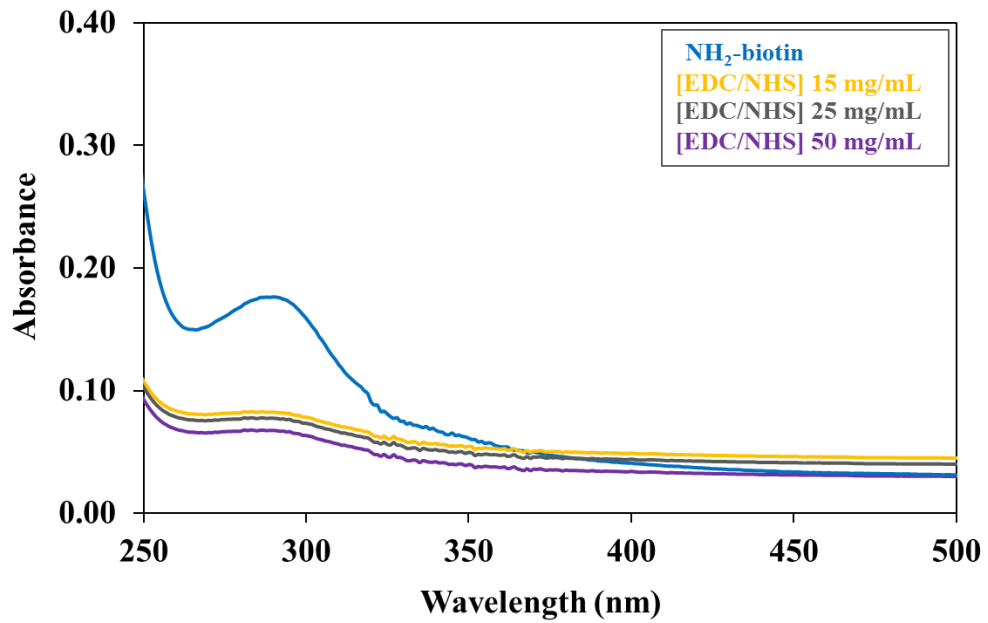
ในสารละลายตัวอย่างที่มีและไม่มี streptavidin ทำการเขย่าสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (NaOAc buffer solution 0.1 M, pH 3.6), TMB (10 mg/mL, 5 $\mu$ L), และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 wt%, 1.9  $\mu$ L) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสี และนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 652 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ศึกษาหาความไว (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอุปกรณ์ตรวจวัด

### 3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 3.1 การตรึงไบโอตินโพรบ (Immobilization of biotin)

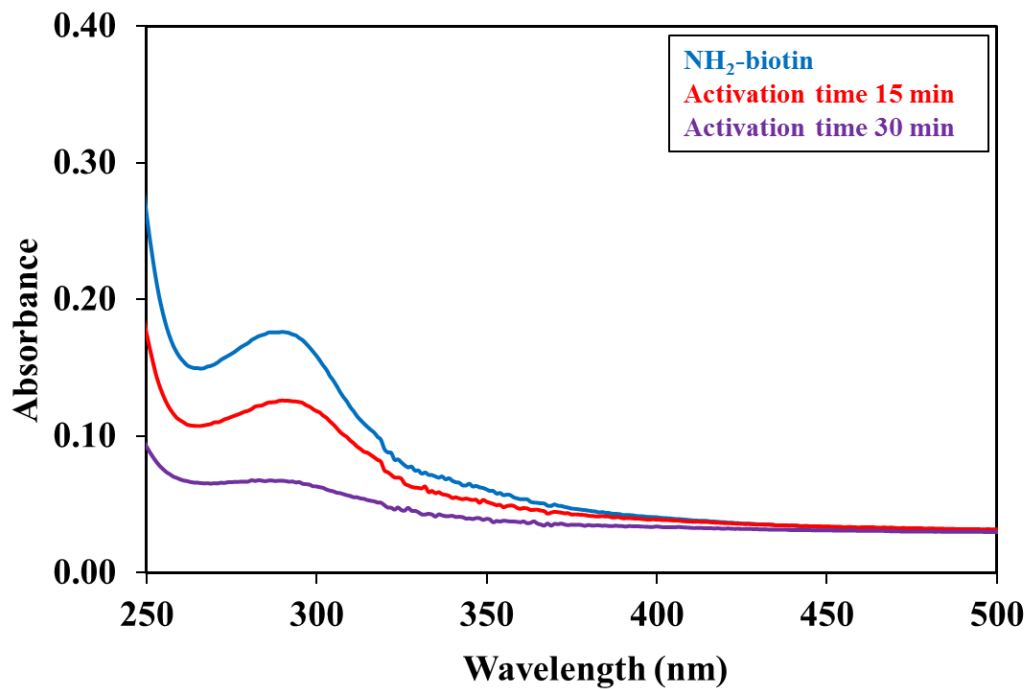
ในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้ไบโอตินมาเป็นโพรบในการตรวจวัดโปรตีนเป้าหมายคือ โปรตีน streptavidin โดยทำการตรึงไบโอตินชนิดที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่อะมิโนซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของพอลิเมอร์ชนิด PMAMPC ที่เคลือบบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้ ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นรีเอเจนต์คู่ควบและเวลาใช้ในการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิล และความเข้มข้นของโพรบที่มีต่อประสิทธิภาพในการตรึงไบโอตินโพรบบนอนุภาค

จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นรีเอเจนต์คู่ควบ คือ EDC/NHS แสดงดังรูปที่ 3.1 พบว่า ภายหลังการตรึงไบโอตินค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอตินมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายไบโอตินเริ่มต้นซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการหายไปของไบโอตินในสารละลายเนื่องจากการตรึงของไบโอตินบนอนุภาคที่ถูกแยกออกไปแล้ว ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าสามารถตรึงไบโอตินโพรบบนอนุภาคนาโนแม่เหล็กได้สำเร็จ และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้น EDC/NHS พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของไบโอตินมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของรีเอเจนต์คู่ควบที่เพิ่มขึ้น และเมื่อคำนวณเป็นปริมาณการตรึงไบโอตินโพรบบนอนุภาค (amounts of immobilized biotin; Q) มีค่าเท่ากับ 422 mg/g, 465.7 mg/g และ 527 mg/g สำหรับการตรึงในสถานะที่มีการกระตุ้นด้วย EDC/NHS ที่ความเข้มข้น 15, 25 and 50 mg/mL ตามลำดับ



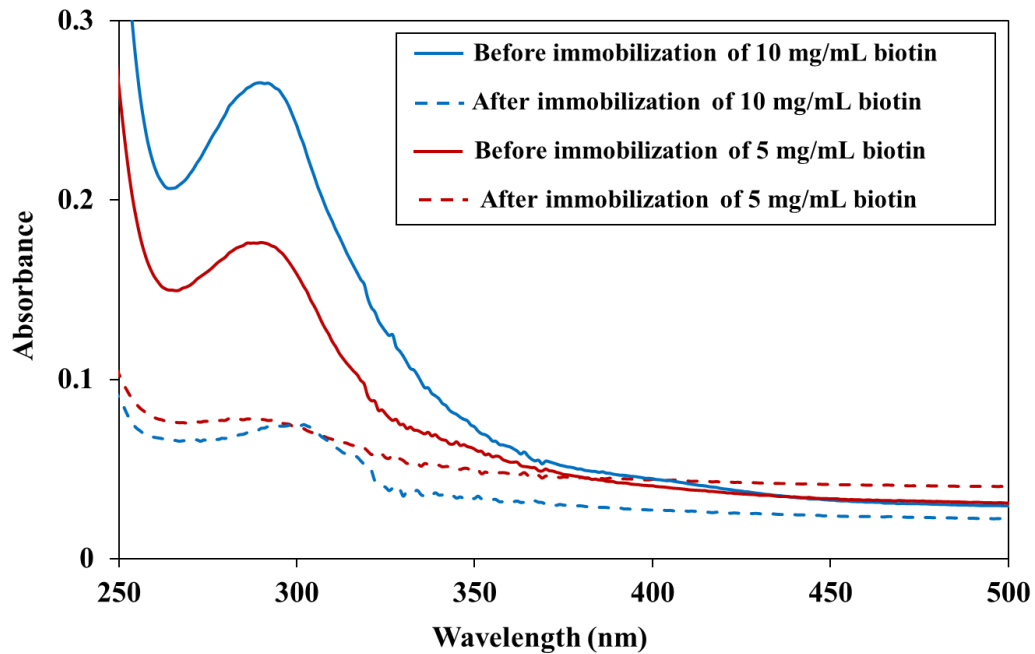
รูปที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอตินก่อนและหลังการตรึง; ก่อนการตรึง (เส้นสีน้ำเงิน), ภายหลังจากการตรึงในสถานะที่มีการกระตุ้นด้วย 15 mg/mL EDC/NHS (เส้นสีเหลือง), ภายหลังจากการตรึงในสถานะที่มีการกระตุ้นด้วย 25 mg/mL EDC/NHS (เส้นสีเทา), และภายหลังจากการตรึงในสถานะที่มีการกระตุ้นด้วย 50 mg/mL EDC/NHS (เส้นสีม่วง)

จากการศึกษาอิทธิพลของเวลาใช้ในการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิล แสดงดังรูปที่ 3.2 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอตินมีค่าลดลงตามเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่า  $Q$  เท่ากับ 243 mg/g และ 527 mg/g สำหรับการตรึงในสถานะที่มีการกระตุ้นที่เวลา 15 และ 30 นาทีตามลำดับ



รูปที่ 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอตินก่อนและหลังการตรึง; ก่อนการตรึง (เส้นสีน้ำเงิน), ภายหลังการตรึงในสภาวะที่มีการกระตุ้นที่เวลา 15 นาที (เส้นสีแดง และภายหลังการตรึงในสภาวะที่มีการกระตุ้นที่เวลา 30 นาที (เส้นสีม่วง)

จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของไบโอตินโพรบ แสดงดังรูปที่ 3.3 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอตินมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของไบโอตินโพรบ ที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่า Q เท่ากับ 527 mg/g และ 970.22 mg/g สำหรับการตรึงในสภาวะที่มีการใช้ไบโอตินโพรบความเข้มข้น 5 และ 10 mg/mL ตามลำดับ



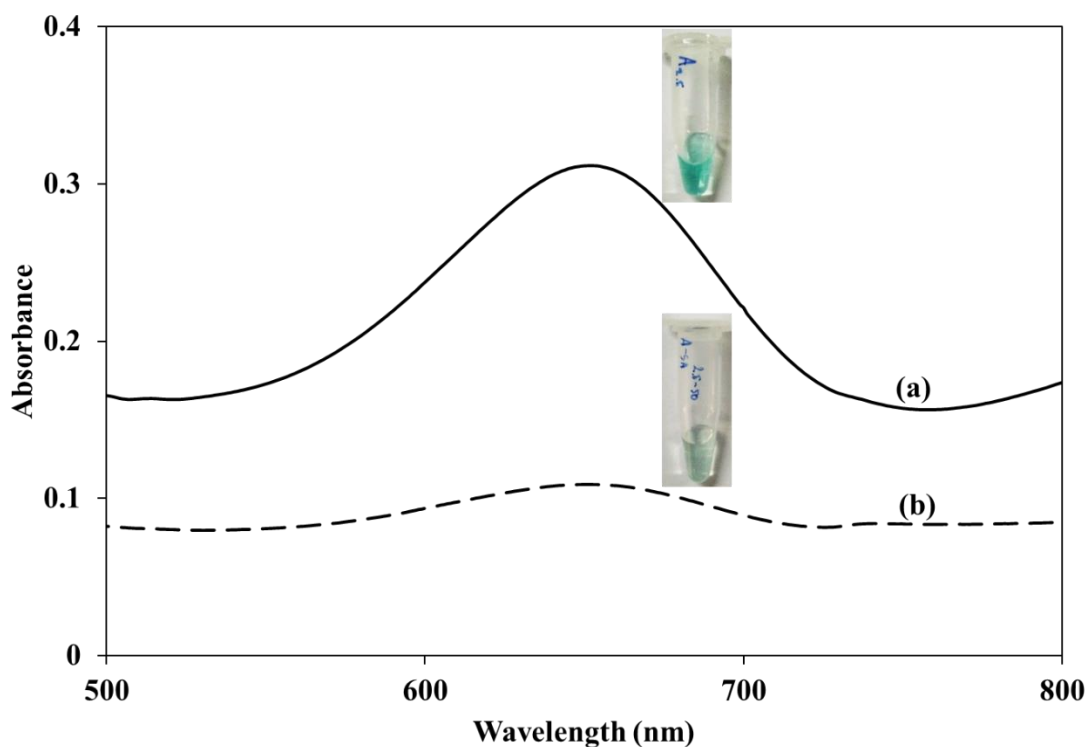
รูปที่ 3.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไบโอตินก่อนและหลังการตรึง; ก่อนการตรึงที่ความเข้มข้น 5 mg/mL (เส้นทึบสีแดง), ภายหลังการตรึงที่ความเข้มข้น 5 mg/mL (เส้นประสีแดง), ก่อนการตรึงที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (เส้นทึบสีน้ำเงิน), และภายหลังการตรึงที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (เส้นประสีน้ำเงิน)

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณในการตรึงไบโอตินโพรบบนอนุภาคสามารถควบคุมได้ด้วยการควบคุมปริมาณการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลซึ่งจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของรีเอเจนต์คู่ควบ และเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิล นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโพรบด้วย

### 3.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวัดโปรตีนเป้าหมาย

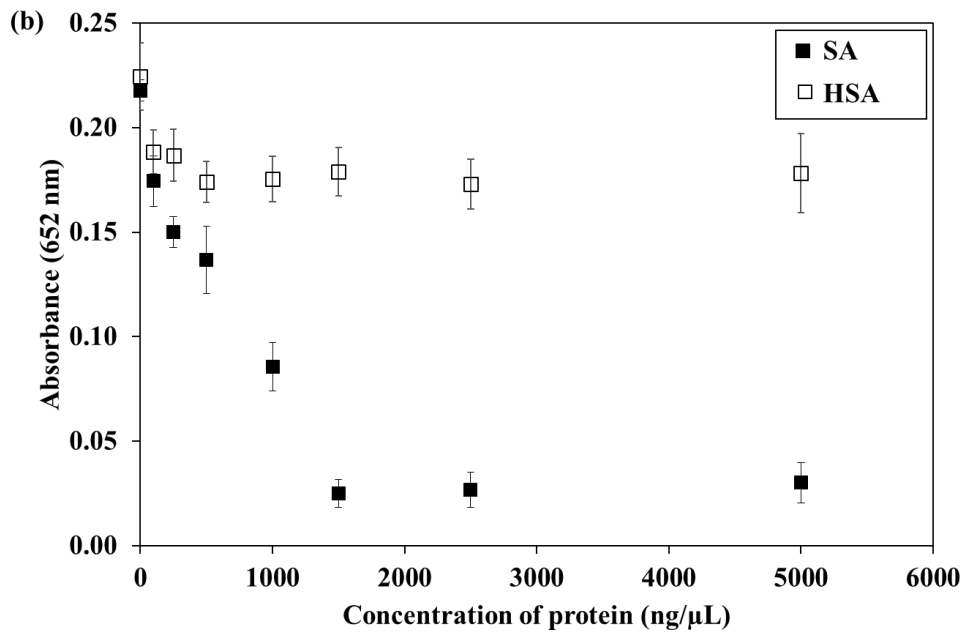
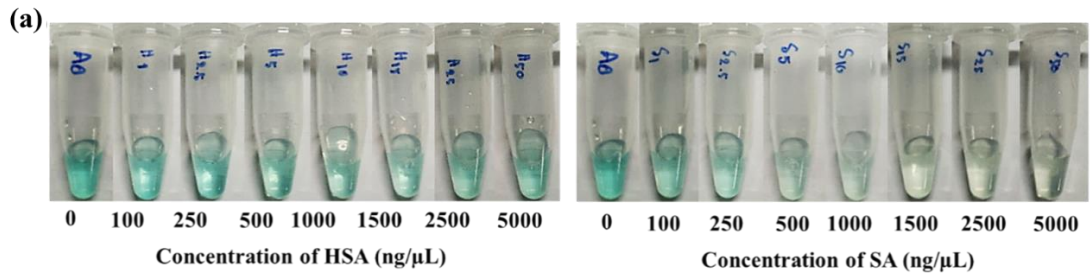
ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ  $Fe_3O_4$  NPs ดัดแปรพื้นผิวด้วยโคพอลิเมอร์ชนิด PMAMPC และตรึงด้วยไบโอตินโพรบ ( $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC-biotin) มาใช้เป็นอุปกรณ์ในการตรวจวัดโปรตีน streptavidin (SA) ที่สามารถสังเกตเห็นการตรวจวัดได้ด้วยการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงสีซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า โดยมีหลักการดังนี้คือ ภายหลังการจับกับโปรตีนเป้าหมายจะทำให้เกิดการลดลงหรือการยับยั้งสมบัติ peroxidase-like activity ของอนุภาค  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC-biotin ที่จะไปเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีของซับสเตรทชนิด TMB ในสถานะที่มี  $H_2O_2$  เนื่องจากการจับกับระหว่างไบโอตินโพรบและ โปรตีน SA จะทำให้เกิดการ bridging กันระหว่างอนุภาคนาโนแม่เหล็กหลายๆ อนุภาค จึงทำให้เกิดการบดบังหรือการลดลงของพื้นที่ผิวของ

อนุภาคที่จะไปทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา peroxidase ของซัปสเตอร์ท ดังนั้นเมื่อทำการเติมซัปสเตอร์ทชนิด TMB และ  $H_2O_2$  ลงในหลอดตัวอย่างที่มีโปรตีนเป้าหมายจะทำให้เห็นการลดลงของสีของสารละลายเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดตัวอย่างที่ไม่มีโปรตีนเป้าหมายแสดงดังรูปที่ 3.4

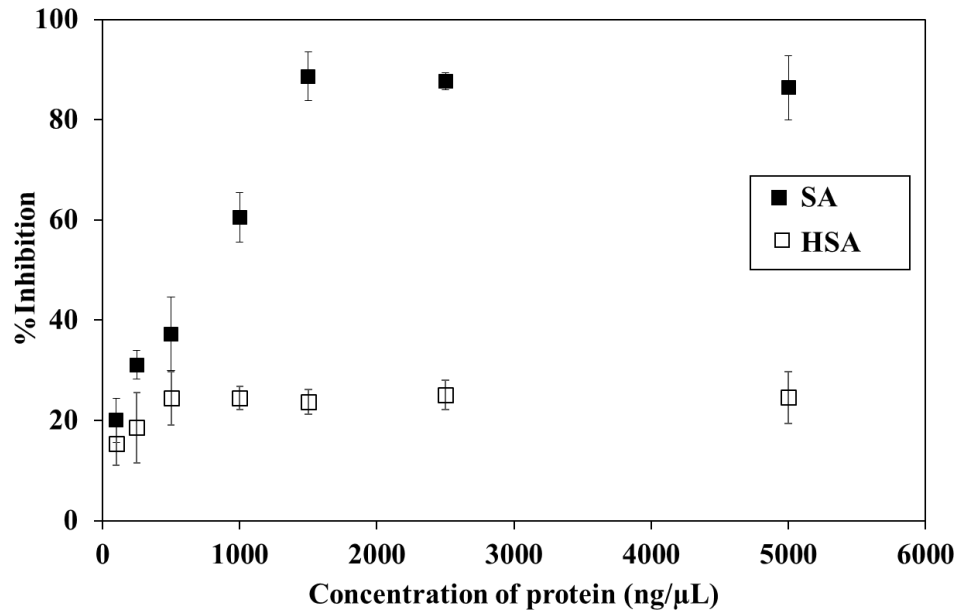


รูปที่ 3.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในหลอดตัวอย่างที่ไม่มีโมเลกุลเป้าหมาย (เส้นทึบ) และหลอดตัวอย่างที่มีโมเลกุลเป้าหมาย (เส้นประ)

การศึกษาหาความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ของอุปกรณ์ตรวจวัด โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการตรวจวิเคราะห์หาโปรตีน SA ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายเทียบกับโปรตีน human serum albumin (HSA) ซึ่งไม่ใช่โปรตีนเป้าหมาย แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 3.5 และ 3.6 พบว่า ในกรณีของ HAS จะพบการลดลงของสีสารละลายเพียงเล็กน้อยทุกช่วงความเข้มข้น โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งสมบัติ peroxidase-like activity ของอนุภาค (% inhibition) สูงสุดเพียง 24.43% ในขณะที่ SA จะพบการลดลงของสีสารละลายอย่างชัดเจนและมีค่าการลดลงของสีเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งสมบัติ peroxidase-like activity ของอนุภาค (% inhibition) สูงสุดถึง 88.67 % จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า  $Fe_3O_4$  NPs-PMAMPC-biotin มีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน SA ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมาย



รูปที่ 3.5 ภาพถ่ายการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย (a) และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย (b) ในสภาวะการตรวจวิเคราะห์โปรตีนชนิด HAS และ SA



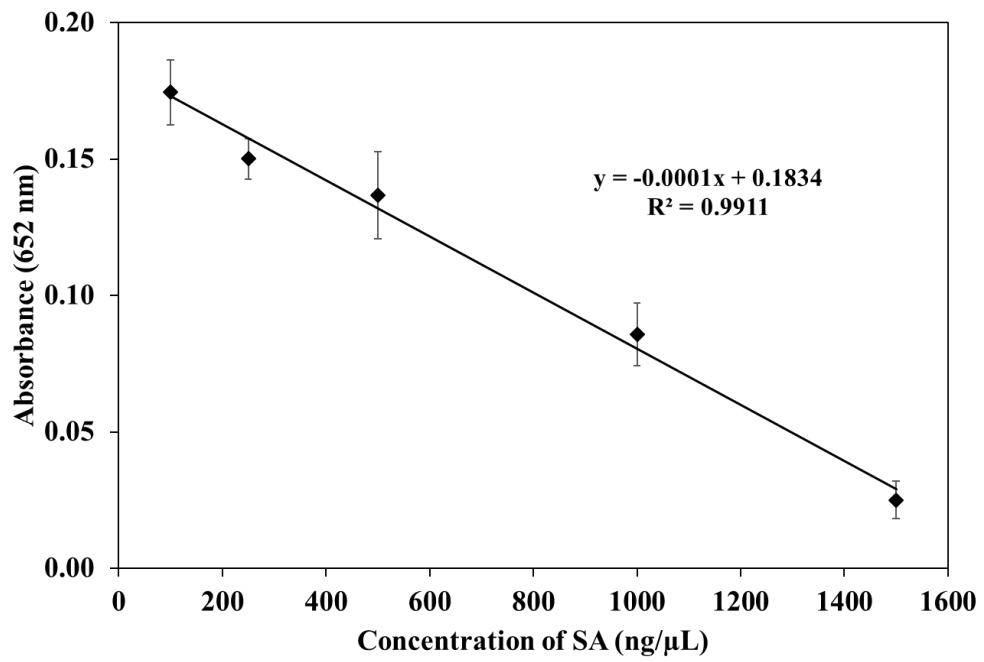
รูปที่ 3.6 ร้อยละการยับยั้งสมบัติ peroxidase-like activity ของอนุภาค Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs-PMAMPC-biotin (% inhibition) ภายหลังการตรวจวิเคราะห์โปรตีนชนิด HAS และ SA

ศึกษาหาความไว (sensitivity) ของอุปกรณ์ตรวจวัดโดยการหาขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย จากรูปที่ 3.5a จะพบว่าขีดความสามารถสูงสุดในการตรวจวิเคราะห์ SA ได้ด้วยตาเปล่าคือที่ความเข้มข้นต่ำสุด 500 ng/μL และจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-visible spectroscopy จะทำให้สามารถวิเคราะห์โปรตีนเชิงปริมาณได้ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ช่วงความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 100-1500 ng/μL ( $y = -0.0001x + 0.1834$ ) โดยมีค่า  $R^2 = 0.9911$  แสดงดังรูปที่ 3.7 และสามารถคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจหาหรือ limit of detection (LOD) หรือ detection limit (DL) ได้จากสมการ

$$LOD = 3SD_{blank} / m$$

โดย  $SD_{blank}$  คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณการตรวจวัดในกรณีที่ไม่มีโปรตีน SA มีค่าเท่ากับ 0.0063 และ  $m$  คือ ความชันของกราฟเส้นตรงความเข้มข้นของ SA มีค่าเท่ากับ 0.0001 ดังนั้นจึงมีค่า LOD หรือความเข้มข้นต่ำสุดของ SA ที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 189 ng/μL





รูปที่ 3.7 กราฟเส้นตรงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ SA และค่าการดูดกลืนแสง

## 4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

### 4.1 สรุปผลการทดลอง

การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยพอลิเมอร์ชนิด PMAMPC ทำให้พื้นผิวของอนุภาคนาโนแม่เหล็กมีหมู่คาร์บอกซิลซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรึงโพรบสำหรับใช้เป็นโมเลกุลในการตรวจวิเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายได้ โดยสามารถควบคุมปริมาณการตรึงของโพรบได้ด้วยการควบคุมปริมาณการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิล นอกจากนี้การมีหมู่ฟอสโฟริลโคลีน (PC) ในโครงสร้างของพอลิเมอร์ชนิดนี้ทำให้ลดการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงของโปรตีนส่งผลทำให้อุปกรณ์ตรวจวัดที่เตรียมขึ้นมานี้มีความจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย และมีขีดจำกัดการตรวจหาหรือ limit of detection (LOD) ที่สูง คือสามารถตรวจวิเคราะห์หาโปรตีนเป้าหมายได้ด้วยความเข้มข้นต่ำสุดถึง 189 ng/ $\mu$ L โดยใช้เวลาทั้งหมดในการตรวจวิเคราะห์ 3 ชั่วโมง และที่สำคัญสามารถสังเกตเห็นการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยตาเปล่าที่ความเข้มข้นต่ำสุด 500 ng/ $\mu$ L

### 4.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแม่เหล็กด้วยพอลิเมอร์ชนิด PMAMPC มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์ในการตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor) โดยสามารถใช้ประโยชน์ของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (COOH) ที่อยู่ในโครงสร้างของพอลิเมอร์ชนิดนี้ในการตรึงโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจวัดหรือโพรบได้โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโนของโพรบ ซึ่งเป็นการเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการจับกับโมเลกุลเป้าหมาย รวมไปถึงการมีหมู่ฟังก์ชันฟอสโฟริลโคลีนที่ทำหน้าที่ในการลดการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงของโมเลกุลอื่นๆที่ไม่ใช่โมเลกุลเป้าหมาย จึงทำให้วัสดุที่เตรียมขึ้นมานี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อโมเลกุลที่ต้องการตรวจวัด สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการตรวจวัดทางชีวภาพที่สามารถสังเกตเห็นการตรวจวัดได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงสีโดยอาศัยสมบัติ peroxidase-like activity ของวัสดุชนิดนี้ ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ไม่จำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่มีราคาแพงในการตรวจวิเคราะห์

## ผลผลิต (Output)

1. Boonjamnian, S., Trakulsujarithchok, T., Hoven V. P. & **Na Nongkhai, P.** A simple one-pot synthesis of anti-biofouling magnetite nanoparticles with high saturation magnetization values. “*in submission*”
2. Boonjamnian, S., Trakulsujarithchok, T., & **Na Nongkhai, P.** Preparation and characterization of PMAMPC-functionalized MNPs by one-pot reaction. International Polymer Conference of Thailand (PCT-6), 2016, 425-429.
3. Boonjamnian, S., Trakulsujarithchok, T., & **Na Nongkhai, P.** Synthesis and characterization of anti-biofouling Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. เสนอผลงานแบบโปสเตอร์: การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016)”

- [1] Lin, P. -C.; Chou, P. -H.; Chen, S. -H.; Liao, H. -K.; Wang, K. -Y.; Chen, Y. -J.; Lin, C. -C., Ethylene glycol-protected magnetic nanoparticles for a multiplexed immunoassay in human plasma. *Small*. 2005, 2, 485-489.
- [2] Chou, P. -H.; Chen, S. -H.; Liao, H. -K.; Lin, P. -C.; Her, G. -R.; Lai, A. C. -Y.; Chen, J. -H.; Lin, C. -C.; Chen, Y. -J., Nanoprobe-based affinity mass spectrometry for selected protein profiling in human plasma. *Anal. Chem.* 2005, 77, 5990-5997.
- [3] Liu, J. -C.; Tsai, P. -J.; Lee, Y. C.; Chen, Y. -C., Affinity capture of uropathogenic *Escherichia coli* using pigeon ovalbumin-bound Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticles. *Anal. Chem.* 2008, 80, 5425-5432.
- [4] Qiu, J.; Zhou, Y.; Chen, H.; Lin, J. -M., Immunomagnetic separation and rapid detection of bacteria using bioluminescence and microfluidics. *Talanta*. 2009, 79, 787-795.
- [5] Woo, M. -A.; Kim, M. I.; Jung, J. H.; Park, K. S.; Seo, T. S.; Park, H. G., A Novel Colorimetric Immunoassay Utilizing the Peroxidase Mimicking Activity of Magnetic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 9999-10014.
- [6] Gao, L. Z.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J. B.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T. H.; Feng, J.; Yang, D. L.; Perrett, S.; Yan, X. Y., Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* 2007, 2, 577-583.
- [7] Zhang, Z.; Wang, Z.; Wang, X.; Yang, Xiurong., Magnetic nanoparticle-linked colorimetric aptasensor for the detection of thrombin. *Sensors and Actuators B*. 2010, 147, 428-433.
- [8] Li, X.; Wen, F.; Creran, B.; Jeong, Y.; Zhang, X.; Rotello, V. M., Colorimetric Protein Sensing Using Catalytically Amplified Sensor Arrays. *Small* 2012, 8, 3589-3592.
- [9] Akkhat, P.; Kiatkamjornwong, S.; Yusa, S.; Hoven, V. P.; Iwasaki, Y., Development of a novel antifouling platform for biosensing probe immobilization from methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-containing copolymer brushes. *Langmuir* 2012, 28, 5872-5881.