

การเตรียมและศึกษาสมบัติของอนุภาคนาโนเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา

นางสาวศศิธร อำนวยตระกูล วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

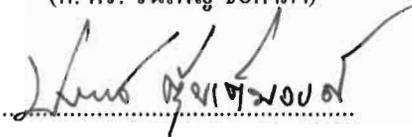
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
พ.ศ. 2551

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



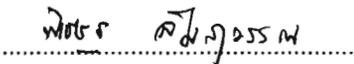
(ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา)

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



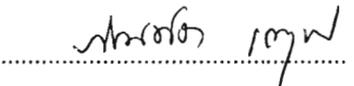
(รศ. ดร. ประเวทย์ ตูย์เต็มวงศ์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



(รศ. ดร. พิเชษฐ ลิ้มสุวรรณ)

กรรมการ



(ผศ. ดร. ภัณฑิรา เกตุแก้ว)

กรรมการ



(ผศ. ดร. วันดี อ่อนเรียบร้อย)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมและศึกษาสมบัติของอนุภาคนาโนเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ เชื้อซัลโมเนลลา
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวศศิธร อำนารุ่งตระกูล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดร. ประเวทย์ คุ้มเต็มวงศ์
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาประยุกต์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
พ.ศ.	2551

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาที่มีสีเรืองแสง (RuBpy) อยู่ภายในและควบคุมขนาดได้ เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา ด้วยกระบวนการโซล-เจลร่วมกับเทคนิคไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน ที่มี tetraethylorthosilicate (TEOS 50-700 μL), ตัวเร่งปฏิกิริยา (NH_4OH 30-120 μL), cyclohexane, *n*-hexanol และ Triton X-100 เป็นองค์ประกอบ เมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าอนุภาคที่มีขนาดเล็ก 35 ± 3 นาโนเมตร สามารถเตรียมได้จากการใช้ TEOS และ NH_4OH ที่ความเข้มข้นต่ำ การวิเคราะห์ปริมาณธาตุในอนุภาคนาโนซิลิกาด้วยเทคนิค Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) ยืนยันว่ามีโมเลกุลของสีเรืองแสงแทรกตัวอยู่ในโครงร่างซิลิกา ทำให้อนุภาคนาโนเรืองแสงได้และมีความคงตัวของสีเรืองแสงสูง เมื่อกระตุ้นด้วย 150W xenon lamp เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่ามีการ Bleaching เพียง 0.16% เท่านั้น เมื่อทำการดัดแปลงพันธะเคมีที่บริเวณผิวของอนุภาคนาโนโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลให้เป็นหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิล แล้วนำอนุภาคไปเชื่อมกับโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อซัลโมเนลลาด้วยพันธะโควาเลนต์ พบว่าอนุภาคนาโนสามารถจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับเชื้อซัลโมเนลลาและเรืองแสงได้ดีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ยืนยันว่ามีอนุภาคนาโนเกาะอยู่บนผิวของเชื้อซัลโมเนลลา ผลจากการวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารต่อไป

คำสำคัญ : ซัลโมเนลลา / อนุภาคนาโน / โซล-เจล / ไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน / การดัดแปลง
พื้นผิวของอนุภาค

Thesis Title	Preparation of bioconjugated fluorescent nanoparticles for the detection of <i>Salmonella</i> spp.
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Sasitorn Amnatrungrakool
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Pravate Tuitemwong
Program	Master of Science
Field of Study	Applied Microbiology
Department	Microbiology
Faculty	Science
B.E.	2551

Abstract

This research work was to prepare bioconjugated fluorescent silica nanoparticles (NPs) with a well controlled size for the detection of *Salmonella* spp. The RuBpy [tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate]-doped silica nanoparticles were prepared *via* a sol-gel process coupled with w/o microemulsion technique containing tetraethyl-orthosilicate (TEOS 50-700 μ L), ammonium hydroxide (NH₄OH 30-120 μ L), cyclohexane, *n*-hexanol and Triton X-100. The NPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM). The results showed that smaller particle size (35 \pm 3 nm in diameter) was obtained at low content of TEOS and NH₄OH. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) study confirmed that the dye molecules were entrapped inside the silica matrix that made NPs bright with good photostability (0.16% Bleaching) after irradiated with 150W xenon lamp for 2 hours. The surface of NPs was then modified by using amine and carboxyl group before covalently immobilized by monoclonal antibody against *Salmonella* onto the NPs surface with high specificity. The scanning electron microscopy (SEM) images of the *Salmonella* cells after incubation with the NPs showed that the antibody-conjugated NPs bound to the bacterial cell wall and they were fluoresced under the fluorescent microscope. The results obtained from this study enabled the further development of sensitive and rapid test kit for detection of *Salmonella* spp. in food samples.

Keywords : *Salmonella* / Nanoparticles / Sol-Gel / Water-in-oil Microemulsion / Surface Modification

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ตามความมุ่งหมายด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจาก รศ. ดร. ประเวทย์ ดุษฎีเต็มวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ศุภลักษณ์ อ่างแก้ว ภาควิชาเคมี ที่กรุณาให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางแก้ปัญหาตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อซัลโมเนลลา และกรุณาสละเวลาเป็นประธานกรรมการในการสอบรวมถึงแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนเอกสารประกอบงานวิจัยให้เป็นรูปเล่มโดยสมบูรณ์ รศ. ดร. พิเชษฐ ลีสมบูรณ์ ผศ. ดร. ภรณ์ทิรา เกตุแก้ว และ ผศ. ดร. วันดี อ่อนเรียบร้อย ที่กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และมีข้อเสนอแนะในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ที่สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ละเอียด เพ็งโสภา ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่เอื้อเฟื้อสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (glutaraldehyde และ NaBH_4) พี่จุ่ม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาสำหรับการวิจัย ขอขอบพระคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับคำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่ให้ทุนเพชรพระจอมสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบพระคุณกำลังใจที่ยิ่งใหญ่จากคุณแม่และครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้โอกาสในการศึกษาและสนับสนุนข้าพเจ้าเป็นอย่างดีมาโดยตลอด รวมทั้งขอบคุณเพื่อนๆ ของข้าพเจ้าที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้ามาตลอด จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวศศิธร อำนางรุ่งตระกูล

ธันวาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
รายการตาราง	ฉ
รายการรูปประกอบ	ญ
ประมวลศัพท์และคำย่อ	ฐ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. ทฤษฎี/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ซัลโมเนลลา (<i>Salmonella</i>)	5
2.1.1 ประวัติความเป็นมา	5
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	6
2.1.3 การเรียกชื่อ	7
2.1.4 การจัดแบ่งประเภท	7
2.1.5 ลักษณะทางชีววิทยา	9
2.1.5.1 โอ แอนติเจน หรือโซมาติก แอนติเจน	9
2.1.5.2 เอช หรือแฟลกเจลลาแอนติเจน	10
2.1.5.3 วีไอ แอนติเจน หรือ capsular antigen	10

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2.1.6 การทำให้เกิดโรค	10
2.1.6.1 Enteric fever	11
2.1.6.2 Septicemia	11
2.1.6.3 Gastroenteritis หรือ Enteritis	11
2.1.7 ระบาดวิทยา	12
2.1.8 ประชากรกลุ่มเสี่ยง	13
2.2 วิธีการแยกและตรวจหาซัลโมเนลลา	13
2.2.1 วิธีดั้งเดิม (Conventional Method)	13
2.2.1.1 Pre-enrichment broth	13
2.2.1.2 Selective enrichment	14
2.2.1.3 Plating on selective media	14
2.2.1.4 Biochemical screening	17
2.2.1.5 Serological confirmation	18
2.2.2 วิธีที่รวดเร็วกว่าการตรวจหาซัลโมเนลลา	20
2.2.2.1 วิธีโดยตรง (direct method)	20
2.2.2.2 วิธีอ้อม (indirect method)	20
2.3 การพัฒนาใช้อนุภาคนาโนตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์	25
2.4 อนุภาคนาโนซิลิกา (Silica nanoparticles)	26
2.4.1 การเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกา	26
2.4.1.1 กระบวนการโซล-เจล (Sol-Gel Technique)	27
2.4.1.2 วิธี Stöber (Stöber method)	30
2.4.1.3 วิธีไมโครอิมัลชัน (Microemulsion method)	31
2.4.2 การดัดแปลงพันธะเคมีและติดฉลากที่ผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา	37
2.4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของอนุภาคนาโน	38
2.4.3.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	39
2.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุด้วยเทคนิค EDS	43
2.4.3.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบฟลูออเรสเซนซ์	45
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	47

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3. ระเบียบวิธีวิจัย	50
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	50
3.2 สารเคมี	50
3.3 เชื้อจุลินทรีย์	51
3.4 แอนติชีรึม	51
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ	51
3.6 ขั้นตอนการวิจัย	52
3.6.1 การเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกา	52
3.6.2 ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา	53
3.6.3 การตัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา	54
3.6.3.1 Carboxyl Group Modification	54
3.6.3.2 Amine Group Modification	54
3.6.4 การตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา	57
3.6.4.1 Carboxyl Group Modification	57
3.6.4.2 Amine Group Modification	57
3.6.5 การใช้ antibody-conjugated nanoparticles ตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา	57
4. ผลการทดลองและอภิปรายผล	58
4.1 การเตรียมและวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนซิลิกา	58
4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา	60
4.2.1 ผลของความเข้มข้น TEOS ต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา	62
4.2.2 ผลของความเข้มข้น NH_4OH ต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา	63
4.3 คุณสมบัติความเข้มแสงและความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนซ์ของอนุภาคนาโนซิลิกา	65
4.4 การตัดแปลงพื้นผิวและการตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา	67
4.4.1 Carboxyl Group Modification	68
4.4.2 Amine Group Modification	70
4.5 การใช้ antibody-conjugated nanoparticles ตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา	71
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	77

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
เอกสารอ้างอิง	79
ภาคผนวก	92
ก. การหาขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกาจากภาพถ่าย TEM	92
ข. ข้อมูลการวิเคราะห์ความเข้มแสงและความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนซ์ในอนุภาคนาโน	113
ค. อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมบัพเฟอร์	115
ง. การวิเคราะห์แอนติบอดี	116
จ. การเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	122
ประวัติผู้วิจัย	123

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ลักษณะทางชีวเคมีที่เป็นแบบฉบับของซัลโมเนลลา	9
2.2 จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ต่อประชากรแสนคน ปี พ.ศ. 2540	12
2.3 มาตรฐาน ISO สำหรับการวิเคราะห์ Enterobacteriaceae	15
2.4 ลักษณะเฉพาะของ <i>Salmonella</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	16
2.5 ปฏิกริยาชีวเคมีและเซรัมวิทยาของซัลโมเนลลา	17
2.6 การทดสอบยืนยันเชื้อซัลโมเนลลา	18
2.7 วิธีที่รวดเร็วสำหรับการตรวจหาซัลโมเนลลาที่ได้รับการรับรองโดย AOAC	21
2.8 ประเภทของไมโครอิมัลชันระหว่างน้ำกับน้ำมัน	32
2.9 ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวประเภทต่างๆ	36
4.1 ปริมาณธาตุองค์ประกอบต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP2)	60
4.2 พารามิเตอร์ที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา	60
4.3 ปริมาณธาตุองค์ประกอบต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP8)	63
4.4 เปรียบเทียบความเข้มแสงของอนุภาคนาโนจากสภาวะการเตรียมต่างๆ กัน	66
ก.1 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP1 จากภาพถ่าย TEM	94
ก.2 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP2 จากภาพถ่าย TEM	97
ก.3 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP3 จากภาพถ่าย TEM	100
ก.4 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP4 จากภาพถ่าย TEM	103
ก.5 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP5 จากภาพถ่าย TEM	106
ก.6 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP6 จากภาพถ่าย TEM	109
ก.7 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP8 จากภาพถ่าย TEM	112
ข.1 ความเข้มแสงและความคงตัวของสีในอนุภาคนาโนซิลิกาเปรียบเทียบกับสี RuBpy dye	113
ข.2 Bleaching (%) ของอนุภาคนาโนเปรียบเทียบกับสี RuBpy dye	114
ง.1 การเกิดปฏิกิริยา agglutination ของแอนติบอดี โดยวิธี Direct agglutination	118

รายการรูปประกอบ

รูป	หน้า
2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp.	6
2.2 ลักษณะและตำแหน่งของแอนติเจนชนิดต่างๆ	10
2.3 Standard cultural method of ISO 2002 สำหรับการตรวจหาซัลโมเนลลา	19
2.4 การพัฒนาใช้อุณหภูมิโนตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์	25
2.5 การเปลี่ยนสถานะจากโซลเป็นเจล	27
2.6 ความหลากหลายของกระบวนการโซล-เจล	29
2.7 ความหลากหลายของขนาดอนุภาคที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธี Stöber	30
2.8 โครงสร้างอย่างง่ายของไมโครอิมัลชัน (ก) แบบ o/w และ (ข) แบบ w/o	32
2.9 ลักษณะของไมโครอิมัลชัน (ก) แบบสองวัฏภาค และ (ข) แบบหลายวัฏภาค	32
2.10 ลักษณะการเรียงตัวของฟิล์มที่หุ้มรอบหยดน้ำมันของอิมัลซิฟายเออร์ชนิดประจุลบ	34
2.11 วิธีที่นิยมใช้ในเทคนิคการสสารชีวโมเลกุลบนผิวของอนุภาคนาโน	38
2.12 เครื่อง Transmission Electron Microscope (TEM)	40
2.13 ส่วนประกอบและการทำงานของเครื่อง TEM	41
2.14 โครงสร้างนาโนที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่อง TEM	41
2.15 เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)	42
2.16 ส่วนประกอบและการทำงานของเครื่อง SEM	43
2.17 โครงสร้างนาโนที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่อง SEM	43
2.18 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุ	44
2.19 การเกิดรังสีเอกซ์เฉพาะตัว	45
2.20 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Spectrofluorometer)	46
3.1 การเตรียม RuBpy-Doped Silica Nanoparticles โดยวิธีไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน	52
3.2 การดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาแบบ Carboxyl Group Modification	55
3.3 การตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคนาโนที่ดัดแปลงผิวแบบ Carboxyl Group Modification	55
3.4 การดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาแบบ Amine Group Modification	56
3.5 การตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคนาโนที่ดัดแปลงผิวแบบ Amine Group Modification	56
4.1 อนุภาคนาโนซิลิกา (NP1-NP8) ที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน	58
4.2 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนซิลิกา NP2 (0.1 mL TEOS:60 μ L NH_4OH)	59
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP2) ด้วยเทคนิค EDS	59

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูป	หน้า
4.4 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP1-NP8 จากสภาวะการเตรียมต่างๆ กัน	61
4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP8) ด้วยเทคนิค EDS	62
4.6 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP3 ที่ (ก) กำลังขยาย 80,000 เท่า และ (ข) 100,000 เท่า	64
4.7 สี RuBpy dye และอนุภาคนาโนที่ถูกทำให้กระจายตัวด้วยเครื่อง ultrasonicator	65
4.8 แสดง Photostability เฉลี่ย (n=3) ของอนุภาคนาโนซิลิกา เมื่อถูกกระตุ้นด้วยXenon lamp	66
4.9 APTS ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุภาคนาโนเกิดเป็นหมู่เอมีน	68
4.10 Succinic anhydride ทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนที่มีหมู่เอมีนเกิดเป็นหมู่คาร์บอกซิล	68
4.11 การกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลบนผิวของอนุภาคนาโนด้วยEDC และ NHS	68
4.12 อนุภาคนาโนที่ดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวให้เป็นหมู่คาร์บอกซิล (CNP's)	69
4.13 การเคลือบผิวของอนุภาคนาโนด้วยBSA ก่อนตรึงแอนติบอดีลงบนผิวอนุภาค	70
4.14 อนุภาคนาโนซิลิกาที่ดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวให้เป็นหมู่เอมีน (NNPs)	70
4.15 Stability ของ CNPs ที่อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ (ก) และ NNPs ที่ 3 เดือน (ข)	71
4.16 การจับกันของอนุภาคนาโนซิลิกากับเชื้อจุลินทรีย์	72
4.17 การเรืองแสงของ NNPs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	73
4.18 การจับกันของอนุภาคนาโน (CNP's) กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ	74
4.19 การจับกันของอนุภาคนาโน (NNPs) กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ	75
4.20 ภาพถ่าย SEM ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Salmonella</i> Enteritidis SH 272/07 (SE)	76
4.21 การจับกันของอนุภาคนาโน CNPs และ NNPs กับเชื้อ SE ภายใต้กล้อง SEM	76
ก.1.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP1 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า	92
ก.1.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP1 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า	93
ก.2.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP2 ที่กำลังขยาย 30,000 เท่า	95
ก.2.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP2 ที่กำลังขยาย 200,000 เท่า	96
ก.3.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP3 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า	98
ก.3.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP3 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า	99
ก.4.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP4 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า	101
ก.4.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP4 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า	102
ก.5.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP5 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า	104
ก.5.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP5 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า	105

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูป	หน้า
ก.6.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP6 ที่กำลังขยาย 40,000 เท่า	107
ก.6.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP6 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า	108
ก.7.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP8 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า	110
ก.7.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP8 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า	111
ข.1 แสดง % Bleaching ของอนุภาคนาโนเปรียบเทียบกับสี RuBpy dye	114
ง.1 การเตรียมเชื้อซัลโมเนลลาเป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบปฏิกิริยา agglutination	117
ง.2 แสดงการเกิดปฏิกิริยา agglutination ของแอนติบอดี โดยวิธี Direct agglutination	118
ง.3 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณ โปรตีน bovine serum albumin โดยวิธี Lowry (1951)	121

ประมวลศัพท์และคำย่อ

APTS	=	(3-Aminopropyl) triethoxysilane
BS	=	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	=	Bovine serum albumin
CNPs	=	Carboxyl-modified nanoparticles
EC	=	<i>Escherichia coli</i>
EDC	=	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
EDS	=	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
g/cm ³	=	Gram (s) per cubic centimeter
MES	=	Z-morpholinoethanesulfonic acid
mg/mL	=	Milligram (s) per millitre
min	=	Minute (s)
mL	=	Millilitre (s)
NHS	=	N-hydroxy-succinimide
nm	=	Nanometer (s)
NNPs	=	Amine-modified nanoparticles
NPs	=	Nanoparticles
RuBpy dye	=	Tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate
SA	=	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	=	Standard deviation
SE	=	<i>Salmonella Enteritidis</i> SH 272/07
SEM	=	Scanning Electron Microscopy
ST	=	<i>Salmonella</i> Typhimurium
TEM	=	Transmission Electron Microscopy
TEOS	=	Tetraethyl orthosilicate
Triton X-100	=	Polyoxyethylene- <i>tert</i> -octylphenyl ether
% wt	=	Percentage of weight
μm	=	Micrometer (s)
μL	=	Microlitre (s)

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae มีลักษณะรูปท่อน ดิคสี่แกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า Salmonellosis ที่มีความสำคัญทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ Typhoidal และ Non-typhoidal *Salmonella* โดยเชื้อในกลุ่ม Non-typhoidal *Salmonella* มักติดต่อสู่คนโดยการบริโภคอาหารที่มาจากสัตว์ [1] ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้บางชนิดมีความรุนแรงสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตได้ เช่น *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium เป็นต้น

ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งในไข่ไก่ [2] และอาหารจากเนื้อไก่และเนื้อสุกร [3] ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด นอกจากนี้ยังพบได้ในอาหารประเภทเนื้อ ไข่กรอก แยม เบคอน แชนดวีช และมักเป็นอาหารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง รวมไปถึงนม ผลิตภัณฑ์ปลา และอาหารทะเลที่ไม่ได้ผ่านความร้อนอย่างเพียงพอ อาหารสุกๆ ดิบๆ ไม่ว่าจะเป็นแฮม ลาบ ขำ ปูเค็ม ปูดอง ผักสด เนื่องจากซัลโมเนลลาเป็นเชื้อโรคที่ร้ายแรงต่อผู้บริโภคจึงไม่อนุญาตให้พบในอาหาร (Zero tolerant)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารโดยวิธีมาตรฐานจะประกอบไปด้วย 5 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ Pre-enrichment เป็นขั้นตอนเริ่มต้น ซึ่งตัวอย่างอาหารจะถูก Enrich ใน non-selective medium เพื่อส่งเสริมเซลล์ซัลโมเนลลาที่ได้รับบาดเจ็บให้กลับมาสมบูรณ์ดังเดิมอีกครั้ง อีกทั้งยังเสถียรต่อสภาวะทางกายภาพและยอมให้มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ขั้นตอนที่ 2 Selective-enrichment ส่วนประกอบของอาหารจะมีสารยับยั้งการเจริญของ competing bacteria ที่มีการเจริญดีกว่าซัลโมเนลลา ขั้นตอนที่ 3 การ Plating บน selective agar เป็นการกำจัดกาเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ และมีการเจริญเกิดเป็นโคโลนีของจุลินทรีย์ที่น่าจะเป็นซัลโมเนลลา ขั้นตอนที่ 4 ทดสอบทางชีวเคมีซึ่งเป็นการพิสูจน์โคโลนีที่สงสัยว่าเป็นซัลโมเนลลาหรือไม่ใช่ซัลโมเนลลา และขั้นตอนสุดท้าย ได้แก่ Serotyping เป็นการพิสูจน์ O/H แอนติเจนของซัลโมเนลลาที่แยกได้ [4] โดยขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดจะใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน โดยการตรวจในช่วง Presumptive identification ใช้เวลา 4-5 วัน

มีการพัฒนาวิธีรวดเร็วสำหรับการตรวจหาซัลโมเนลลาในอาหารและการเพิ่มความไวของการวิเคราะห์หลายวิธี เช่น Fluorescent antibody technique, DNA hybridization technique, Enzyme immunoassay technique เป็นต้น สำหรับการตรวจและวิเคราะห์ให้ทราบผลอย่างถูกต้องและรวดเร็ว ในปัจจุบันนิยมใช้วิธีเพิ่มดีเอ็นเอของเชื้อซัลโมเนลลาจากอาหารให้มีจำนวนมากๆ โดยวิธีปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ในอาหารตัวอย่าง แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน อาจต้องรอถึง 48 ชั่วโมง จึงจะทราบผล และมีราคาสูง [5]

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์กำลังให้ความสนใจศึกษา อนุภาคนาโน ซึ่งก็คืออนุภาคที่มีโครงสร้างที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร หรือหมายถึงการรวมตัวกันของอะตอมเป็นกลุ่มก้อนที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร การที่อนุภาคมีขนาดเล็กลง ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มมากขึ้น จึงมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้า สมบัติทางแสง และสมบัติทางแม่เหล็กดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ อนุภาคนาโนซิลิกาที่ถูกโด๊ปด้วยสีเรืองแสง (Dye-doped Silica Nanoparticles) สามารถนำมาใช้เป็นโพรบในการวิเคราะห์ต่างๆ และใช้ติดฉลาก (Labeling) สำหรับตรวจสอบโมเลกุลทางชีวภาพ ซึ่งอนุภาคนาโนซิลิกามีข้อดีคือ สามารถเตรียมและดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคได้ง่าย มีความชอบน้ำ (Hydrophilic) สูง และเป็น biocompatible ที่ดี ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในสารละลาย และไม่เกิดการรั่วไหลของสีที่อยู่ภายใน กล่าวคือ มีความคงตัวของสีภายในอนุภาคสูง เนื่องจากโครงสร้างซิลิกาจะทำหน้าที่ป้องกันสีที่อยู่ภายในจากผลกระทบของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ออกซิเจน ตัวทำละลาย และสารละลายต่างๆ ในบัฟเฟอร์ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางชีวภาพที่ต้องการความไวและความเสถียรสูง [6]

Weihony Tan และคณะ [7] จากมหาวิทยาลัยฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รายงานถึงการ ใช้ Dye-doped Silica Nanoparticles ตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างอาหาร ซึ่งให้ผลรวดเร็วและถูกต้องกว่าวิธี PCR โดยทราบผลการวิเคราะห์ภายในเวลาเพียง 20 นาทีเท่านั้น ว่ามีแบคทีเรียในตัวอย่างอาหารหรือไม่ และจำนวนมากน้อยเท่าไร โดยการใช้อนุภาคนาโนซิลิกามีขนาดประมาณ 70 นาโนเมตร ที่มีสีเรืองแสง (Fluorescent) จำนวนหลายพันโมเลกุลอยู่ในอนุภาค ส่วนผิวภายนอกของอนุภาคจะมีแอนติบอดีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวิเคราะห์เคลือบเอาไว้ ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนบนผิวของแบคทีเรียได้ ซึ่งไม่เพียงแต่จะช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาเท่านั้น แต่ยังช่วยให้สามารถตรวจพบแบคทีเรียแม้จะมีปริมาณน้อยๆ ได้

การตรวจสอบที่รวดเร็วขึ้น ไม่เพียงแต่จะมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรค แต่ยังสำคัญต่อการต่อสู้กับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคด้วย เมื่อต้องทำการตัดสินใจในสถานการณ์ที่มีเพียงความเป็นกับความตาย นาโนเทคโนโลยีจะช่วยให้ตัดสินใจได้อย่างรวดเร็ว การตรวจหาสิ่งมีชีวิตที่รุกรานร่างกายด้วยวิธีดั้งเดิมนั้นจะต้องใช้เวลาหลายวัน และต้องทำการปิดบริเวณนั้นๆ ระหว่างทำการวิเคราะห์ด้วย

วิธีดังกล่าวจึงถือได้ว่าเป็นการพัฒนารูปแบบใหม่ในการตรวจสอบอาหารได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง โดยใช้หลักการพื้นฐานการทำงานของแอนติเจน-แอนติบอดี ในเชิงภูมิคุ้มกันวิทยาประยุกต์ใช้กับนาโนเทคโนโลยีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาจากกระบวนการโซล-เจลร่วมกับเทคนิคไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lian และคณะ [8] ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก โดยใช้ TEOS (Tetraethyl orthosilicate) เป็นสารตั้งต้น ผสมเข้าด้วยกันกับน้ำ Cyclohexane Triton X-100 และ *n*-hexanol ภายใต้การเร่งปฏิกิริยาคด้วย NH_4OH แล้วตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy; SEM) จากนั้นนำอนุภาคนาโนซิลิกาไปดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวของอนุภาค โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลให้เป็นหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิลก่อนนำไปเชื่อมกับโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อซัลโมเนลลา แล้วจึงนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา เพื่อพัฒนาเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาจากกระบวนการโซล-เจลร่วมกับเทคนิคไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน
- 1.2.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา (ความเข้มข้นของ TEOS และ NH_4OH) เพื่อใช้เตรียมอนุภาคให้มีขนาดตามความต้องการได้
- 1.2.3 วิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา ด้วยเครื่องมือเฉพาะทางนาโนเทคโนโลยี เช่น กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) การวิเคราะห์ปริมาณธาตุด้วยเทคนิค Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)
- 1.2.4 ศึกษาวิธีในการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา รวมถึงวิธีในการตรึงโมเลกุลของแอนติบอดีลงบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา (Surface Modification of Dye-doped Silica Nanoparticles and Immobilize Antibody onto Surface of the particles)
- 1.2.5 ศึกษาประสิทธิภาพและความจำเพาะ (Specificity) ในการจับกันของอนุภาคนาโนซิลิกา กับเชื้อซัลโมเนลลา เพื่อพัฒนาเป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาต่อไป

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ การเตรียมและวิเคราะห์คุณสมบัติของ Dye-doped Silica Nanoparticles และการนำ Dye-doped Silica Nanoparticles ไปใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา

1.3.1 การเตรียมและวิเคราะห์คุณสมบัติของ Dye-doped Silica Nanoparticles

เตรียม Dye-doped Silica Nanoparticles จากกระบวนการโซล-เจลร่วมกับเทคนิคไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน ที่มี TEOS เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา แล้วนำอนุภาคที่ได้ไปวิเคราะห์คุณสมบัติ โดยวัดขนาดของอนุภาค และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาค โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและส่องกราด (TEM & SEM) จากนั้นจะนำอนุภาคนาโนที่ได้มาทำการดัดแปลงพื้นผิวรอบๆ อนุภาคให้มีหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิลด้วยปฏิกิริยาทางเคมี เพื่อให้สามารถจับกับ โมเลกุลของแอนติบอดีได้

1.3.2 การนำ Dye-doped Silica Nanoparticles ไปใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา

นำอนุภาคนาโนที่จับกับแอนติบอดีของเชื้อซัลโมเนลลา มาทำการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างและศึกษาความจำเพาะ (Specificity) ของแอนติบอดีที่ใช้ โดยตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และตรวจสอบลักษณะการจับกันของอนุภาคนาโนซิลิกา กับเชื้อซัลโมเนลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการเตรียม Dye-doped Silica Nanoparticles เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซัลโมเนลลา ผลการศึกษาที่ได้จะช่วยพัฒนาวิธีในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างอาหาร ลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ มีความจำเพาะ (Specificity) และความไว (Sensitivity) สูงกว่าหรือเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน นอกจากนั้นยังสามารถดัดแปลงนำอนุภาคที่เตรียมได้ไปใช้งานทางด้านชีววิทยาของเซลล์ต่อไป

บทที่ 2 ทฤษฎี/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ซัลโมเนลลา (*Salmonella*)

ซัลโมเนลลา เดิมเรียกว่า พาราไทฟอยด์แบคทีเรีย (*paratyphoid bacteria*) เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ พบได้ทั่วไป ในแต่ละปีถือว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่เกิดขึ้นกับประชากรประเทศต่างๆ ทั่วโลก แม้ว่ามีผู้วิจัยหลายท่านได้กล่าวถึง นิเวศวิทยา สรีรวิทยา ระบาดวิทยา และวิธีการตรวจวิเคราะห์สำหรับการแยกและการตรวจพิสูจน์ซัลโมเนลลาที่ได้มีการตีพิมพ์ไปแล้วจำนวนมากมาย แต่วิวัฒนาการของซัลโมเนลลาทำให้จำเป็นที่จะต้องมีการปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ให้ทันสมัยอยู่เสมอ เพื่อนำมาซึ่งความรู้ใหม่ๆ เกี่ยวกับซัลโมเนลลา และผลเสียหายของโรคที่เกิดจากเชื้อซัลโมเนลลาที่มีความสัมพันธ์กับอาหาร

2.1.1 ประวัติความเป็นมา

ในยุคต้นของศตวรรษที่ 19 นักพยาธิวิทยาคลินิกในฝรั่งเศส ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของการเป็นแผลในลำไส้ของมนุษย์กับการเป็นโรคติดต่อเป็นครั้งแรก ซึ่งโรคที่ถูกตรวจพบได้แก่ ไข้ไทฟอยด์ (*typhoid fever*) ต่อมาได้มีการแยกและอธิบายลักษณะของ *typhoid bacillus* โดยชาวยุโรปพบว่าเชื้อนี้เป็นต้นเหตุของไข้ไทฟอยด์ และต่อมาได้พิสูจน์ว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพาราไทฟอยด์ (*paratyphoid organisms*) [9, 10]

ค.ศ. 1885 D. E. Salmon นักแบคทีเรียชาวอเมริกันร่วมกับ Theobald Smith ได้แยก *Bacillus cholerae-suis* ในปัจจุบันได้แก่ *Salmonella enterica* ซีโรวาร์ *Cholerae-suis* จากสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์ [10]

ค.ศ. 1888 Gartner แยกเชื้อ *S. Enteritidis* จากม้ามของผู้ป่วยที่ตายด้วยโรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศเยอรมัน

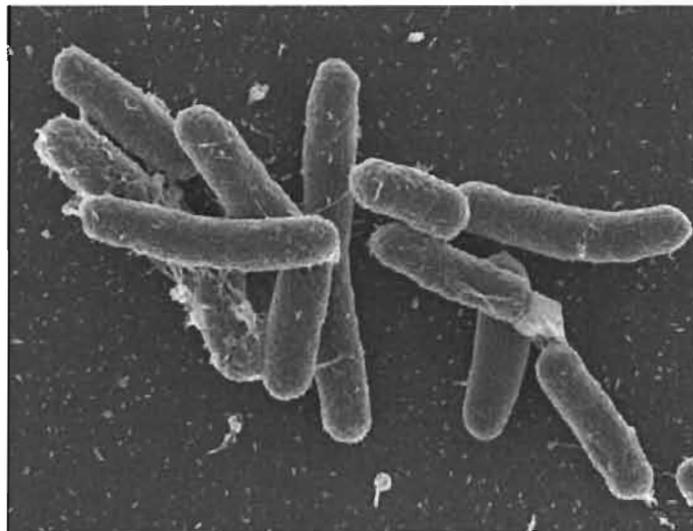
ค.ศ. 1892 Löffler แยกเชื้อ *S. Typhimurium* ได้จากโรคที่คล้ายไทฟอยด์ในหนูขาว ต่อมาการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับเชื่อนี้มีมากจนกระทั่ง Schottmüller สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *S. Paratyphi A* และ *S. Paratyphi B* ได้ในปี ค.ศ. 1900 [11]

การค้นพบซัลโมเนลลาสายพันธุ์ใหม่ๆ มีมากขึ้น ทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ๆ เหล่านี้ White [12] เป็นคนแรกที่เสนอ antigenic scheme สำหรับการแบ่งประเภทของซัลโมเนลลา และต่อมา Kauffmann, Edwards และ Ewing ได้ร่วมมือกับอนุกรรมการจัดทำหนังสือ Kauffmann-White Schema ขึ้นในปี ค.ศ. 1955 เพื่อใช้แยกลักษณะทางแอนติเจนของซัลโมเนลลา ซึ่งมีการ

รวบรวมซัลโมเนลลาไว้มากกว่า 2,400 ซีโรวาร [13] การตั้งชื่อซัลโมเนลลาได้กำหนดเป็นมาตรฐานตามข้อตกลงระหว่างชาติ โดยเห็นพ้องต้องกันใช้ชื่อนี้ และเริ่มใช้ชื่อนี้ทั่วไปตั้งแต่ปี ค.ศ. 1955 เป็นต้นมา [11]

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ติดสีแกรมลบ (gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ยาวและมีอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) และบางสายพันธุ์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่น *S. Gallinarum* สภาวะการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 8-45 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่สุดที่ 42 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างที่พีเอช 6.5-7.5 ปริมาณน้ำใช้ได้ (water activity) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ ประมาณ 0.93-0.99 ภายใต้อุณหภูมิและอาหารที่เหมาะสม [14, 15]



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Salmonella* spp. [16]

ซัลโมเนลลาไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที การใช้ความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำไม่สามารถทำลายซัลโมเนลลาได้ เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น

ซัลโมเนลลาพบอยู่โดยทั่วไปในธรรมชาติ ในคน สัตว์เลื้อยคุ่น สัตว์ปีก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเชื้อจะเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่และปะปนอยู่ในอุจจาระ ถ้าถูกขับออกจากร่างกายแล้วสามารถปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อไก่ ไข่ หรือ

เชื้ออาจปนเปื้อนมากับแมลง หนู สัตว์รบกวน (pests) สัตว์เลี้ยง (pets) ปศุสัตว์ และสัตว์อื่นๆ นอกจากนี้อาจปนเปื้อนในระหว่างการขนส่ง การเก็บ น้ำที่ใช้ล้าง เครื่องมือเครื่องใช้

2.1.3 การเรียกชื่อ

การเขียนหรือพิมพ์ชื่อซีโรวารเปลี่ยนจากการใช้ตัวอักษรเล็กและตัวพิมพ์เอียงเป็นตัวอักษรใหญ่ เช่น *Salmonella typhimurium* เปลี่ยนเป็น *Salmonella Typhimurium* นอกจากนี้ในบางซีโรวารมีฟาจ (Phage) เข้าไปแทนที่ทำให้แอนติเจนเปลี่ยนไป ซึ่งระบบเดิมจะเปลี่ยนชื่อเป็นซีโรวารใหม่ แต่ระบบใหม่จะไม่มีการเปลี่ยนชื่อซีโรวาร เช่น *Salmonella* ซึ่งมี O antigen 3,10 เมื่อมี phage E15 และ phage E34 เข้าแทรกจะทำให้ factor O:15 หรือ O:15,34 เข้าแทนที่ factor O:10 ซึ่งเดิม *Salmonella* O:3,15 จะจัดอยู่ใน group E₂ และ *Salmonella* O:3,15,34 จะจัดอยู่ใน group E₃ แต่ในปัจจุบันจะจัดรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกับ O:3,10 (group E₁) เท่านั้น แต่ให้เขียน factor O:15 และ O:15,34 อยู่ในวงเล็บ [12] เช่น

ระบบเดิม	S. Anatum 3,10:e,h:1,6 (มี O Antigen group E ₁) S. Newington 3,15:e,h:1,6 (มี O Antigen group E ₂) S. Minneapolis 3,15,34:e,h:1,6 (มี O Antigen group E ₃)
ระบบใหม่	จัด <i>Salmonella</i> O group E ₂ และ E ₃ รวมกับ group O:3,10 (E ₁) โดยให้เขียน factor O:15 และ O:15,34 อยู่ในวงเล็บ ดังนั้น S. Anatum, S. Newington และ S. Minneapolis จึงมีชื่อเดียวกัน คือ S. Anatum 3,10(15)(15,34):e,h:1,6

2.1.4 การจัดแบ่งประเภท

จีโนมส์ลโมเนลลาจัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae ภายในจีโนมส์เดียวกันตามรายงานของ World Health Organization (WHO) Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella* (Institute Pasteur, Paris) [17] ประเทศฝรั่งเศส รายงานเรื่อง Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars 1987 ได้จัดคอนูกรมวิธานของจีโนมส์ *Salmonella* และสรุปว่า *Salmonella* มีเพียง 1 species และแบ่งออกเป็น 7 subspecies คือ I, II, IIIa, IIIb, IV, V และ VI มีรายละเอียดดังนี้

Subspecies I	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i>
Subspecies II	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>salamae</i>
Subspecies III a	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>arizonae</i>
Subspecies III b	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i>
Subspecies IV	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>houtenae</i>
Subspecies V	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>bongori</i>
Subspecies VI	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>indica</i>

จำนวนซีโรวาร์ของซัลโมเนลลาแต่ละ subspecies (1987) มีดังนี้

Subspecies I	จำนวน	1,299	ซีโรวาร์
Subspecies II	จำนวน	445	ซีโรวาร์
Subspecies III a	จำนวน	91	ซีโรวาร์
Subspecies III b	จำนวน	296	ซีโรวาร์
Subspecies IV	จำนวน	59	ซีโรวาร์
Subspecies V	จำนวน	14	ซีโรวาร์
Subspecies VI	จำนวน	9	ซีโรวาร์
รวม	จำนวน	2,213	ซีโรวาร์

Subspecies I เป็นซัลโมเนลลาที่พบในคนและสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งพบมากที่สุดจำนวน 1,299 ซีโรวาร์ สำหรับ Subspecies II – VI เป็นซัลโมเนลลาที่มาจากสัตว์เลือดเย็นและสิ่งแวดล้อม ประมาณ 914 ซีโรวาร์

ต่อมา World Health Organization (WHO) Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella* (Institute Pasteur ประเทศฝรั่งเศส) ได้จัด Taxonomy of genus *Salmonella* ใหม่

สรุปว่าซัลโมเนลลามี 2 สปีชีส์

สปีชีส์ที่ 1 ได้แก่ *S. enterica* แบ่งออกเป็น 6 subspecies 2,480 ซีโรวาร์

สปีชีส์ที่ 2 ได้แก่ *S. bongori* มี 21 ซีโรวาร์

มีรายละเอียดดังนี้ [18]

<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	จำนวน	1,478	ซีโรวาร์
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	จำนวน	498	ซีโรวาร์
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	จำนวน	94	ซีโรวาร์
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	จำนวน	327	ซีโรวาร์
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	จำนวน	71	ซีโรวาร์
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (V)	จำนวน	12	ซีโรวาร์
<i>S. bongori</i>	จำนวน	21	ซีโรวาร์
รวม	จำนวน	2,501	ซีโรวาร์

2.1.5 ลักษณะทางซีรัมวิทยา

แม้ว่าวิธีการทางชีวเคมี [19] จะใช้เป็นพื้นฐานในการระบุ (identification) ซัลโมเนลลาได้ (ตารางที่ 2.1) อย่างไรก็ตามปัจจุบันมักจะระบุซีโรวาร์ที่เฉพาะเจาะจงโดยอาศัยเทคนิคทางซีรัมวิทยา (serology) ที่อาศัยหลักการตกตะกอนของโปรตีนจากแอนติเจนบนเซลล์ของแบคทีเรียด้วยแอนติบอดีที่มีความสัมพันธ์กัน

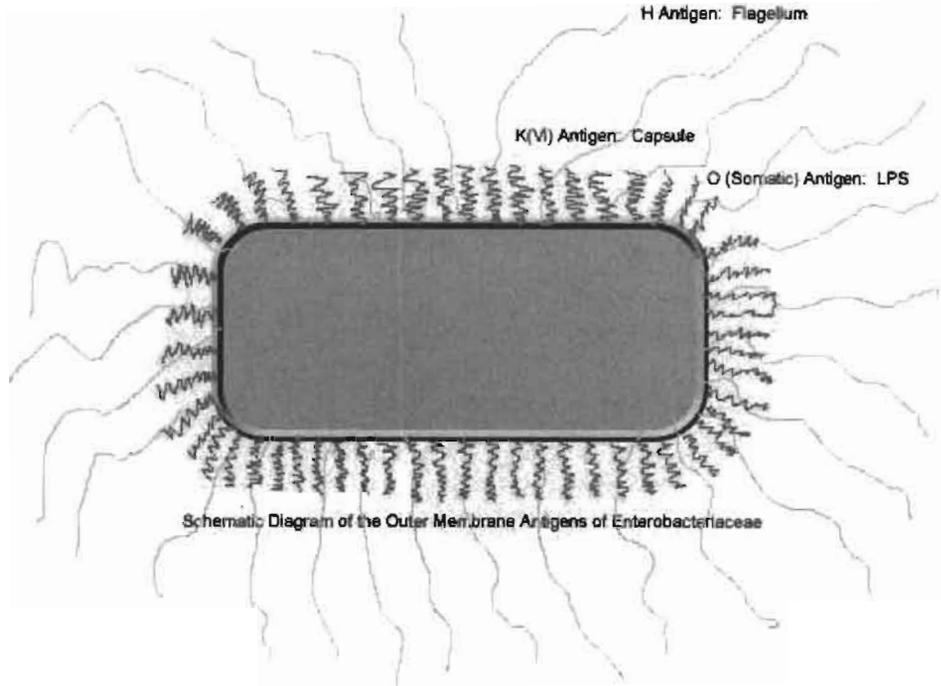
ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางชีวเคมีที่เป็นแบบฉบับของซัลโมเนลลา [20]

การทดสอบทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Lactose and Sucrose	Negative
Oxidase	Negative
Catalase	Negative
Citrate as sole carbon source	Grow
Hydrogen sulfide generation	Positive
Decarboxylate lysine and ornithine	Positive

ลักษณะของแอนติเจนที่สำคัญของซัลโมเนลลา ใช้เป็นคุณสมบัติในการทดสอบทางซีรัมวิทยา มี 3 ชนิด ดังนี้

2.1.5.1. โอ แอนติเจน หรือโซมาติก แอนติเจน (O or Somatic antigen) เป็นแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ประกอบไปด้วยสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และฟอสโฟลิปิด (lipopolysaccharide; LPS) มีคุณสมบัติ คือ สามารถทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที (heat stable) ทนต่อเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ทนต่อกรดเจือจาง ปฏิกริยาของ

โอแอนติเจนกับแอนติซีรัมจำเพาะจะมีลักษณะเป็น granular โอแอนติเจนของซัลโมเนลลาถูกจัดแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ตามแบบของ Kauffman White Schema



รูปที่ 2.2 ลักษณะและตำแหน่งของแอนติเจนชนิดต่างๆ [21]

2.1.5.2. เอช หรือแฟลกเจลลา แอนติเจน (H or flagella antigen) เป็นส่วนประกอบของสารประเภทโปรตีน มีคุณสมบัติถูกทำลายได้ด้วยความร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (heat labile) แอลกอฮอล์และกรด ปฏิกริยาของเอช แอนติเจน กับแอนติซีรัมที่จำเพาะจะมีลักษณะเป็น floccular เชื้อซัลโมเนลลาส่วนมากจะมีเอช แอนติเจน 2 เฟส ได้แก่ เฟส 1 เรียกว่า เฟสจำเพาะ (specific phase) และเฟส 2 เรียกว่า เฟสไม่จำเพาะ (non-specific phase) เพราะอาจตรวจไม่พบได้

2.1.5.3. วีไอ แอนติเจน (Vi antigen) หรือ capsular antigen เป็นแอนติเจนที่คลุมอยู่รอบนอกโอแอนติเจน คุณสมบัติของวีไอ แอนติเจน คือ ถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อน กรด หรือฟีนอล โดยปกติเชื้อซัลโมเนลลาที่มีวีไอ แอนติเจน จะทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่าเชื้อที่ไม่มีวีไอ แอนติเจน เชื้อซัลโมเนลลาที่มีวีไอ แอนติเจน ได้แก่ *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* และ *S. Dublin*

2.1.6 การทำให้เกิดโรค

โรคที่มีสาเหตุมาจากซัลโมเนลลา เรียกว่า Salmonellosis ซึ่งเป็นโรคของระบบทางเดินอาหารที่พบบ่อยและมีความสำคัญมากที่สุดของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทยด้วย ซัลโมเนลลาสามารถก่อให้เกิดโรคได้ดีในผู้ที่มีความต้านทานต่ำหรือได้รับเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่เข้าสู่ร่างกายเป็นจำนวน

มาก สาเหตุทั่วไปของการติดเชื้อเกิดจากการรับประทานอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปะปนเข้าไป ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการหรือไม่มีอาการของโรคปรากฏ อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อซัลโมเนลลา จำแนกออกเป็น 3 แบบ คือ

2.1.6.1 Enteric fever

ได้แก่ โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ เชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์ ได้แก่ *S. Typhi* เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคไข้พาราไทฟอยด์ (ไข้รากสาดน้อย) ได้แก่ *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, *S. Paratyphi C* ไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์จะเกิดขึ้นเฉพาะในคนเท่านั้น สาเหตุที่สำคัญในการติดเชื้อ คือ ได้รับเชื้อปนเปื้อนเข้าไปในอาหารและน้ำดื่ม เชื้อจะเข้าสู่กระเพาะอาหาร ถ้าไส้เล็ก ไปตามทางเดินอาหาร ต่อมลำไส้ และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต ผู้ป่วยที่มีอาการเฉียบพลัน สามารถตรวจพบเชื้อได้ในกระแสโลหิต เชื้อสามารถเข้าไปยังอวัยวะต่างๆ ได้ รวมทั้งไต ไชกระดูก ถ้าไส้ อุ้งน้ำดี และจะถูกขับออกมาด้วยอุจจาระ และอาจพบได้ในปัสสาวะ เชื้อทำให้มีอาการอักเสบของ lymphoid tissue ต่างๆ บางครั้งทำให้เชื้อหุ้มกระดูก ปอด มีการอักเสบได้ ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 10-14 วัน ปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคประมาณ 10^6 CFU [22] ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว เชื่องซึม เบื่ออาหาร มีอาการท้องอืดหรือท้องผูก ม้ามโต ต่อมาอาจมีอาการอุจจาระร่วงและมีเลือดปนกับอุจจาระด้วย ถ้ามีการทำลายของเยื่อลำไส้เป็นจำนวนมากอาจทำให้เกิดลำไส้ทะลุได้ ระยะของไข้ Enteric fever นานประมาณ 3-4 สัปดาห์ โรคพาราไทฟอยด์มีอาการของโรคคล้ายไทฟอยด์แต่จะรุนแรงน้อยกว่า และก่อให้เกิดอาการอุจจาระร่วงภายหลังรับประทานอาหารประมาณ 12-24 ชั่วโมง

2.1.6.2 Septicemia

เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตโดยตรง สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตโดยไม่มีอาการของโรคอุจจาระร่วง ผู้ป่วยมีอาการเป็นไข้สูงเป็นระยะๆ ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เชื่องซึม อาจทำให้เกิดอาการปอดบวม เชื้อหุ้มสมองอักเสบ เชื้ออุลันหัวใจอักเสบ เชื้อที่เป็นสาเหตุ ได้แก่ *S. Cholerae-suis*

2.1.6.3 Gastroenteritis หรือ Enteritis

เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) ส่วนมากจะทำให้เกิดอาการแบบนี้ โดยเชื้อปนเปื้อนเข้าไปกับอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไข่ นมและผลิตภัณฑ์นม หรือสิ่งอื่นๆ [23, 24, 25] ผู้ป่วยเมื่อรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป เชื้อจะแทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อลำไส้ใหญ่ และลำไส้เล็กส่วนกลาง ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 6-48 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อที่ก่อโรคประมาณ 10^8 CFU [22] ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง มีไข้เล็กน้อย

2.1.7 ระบาดวิทยา

ซัลโมเนลลาสามารถพบได้ทั่วโลก (worldwide) โดยซัลโมเนลลาที่พบบ่อยที่สุด คือ *Salmonella* Enteritidis ตามมาด้วย *Salmonella* Typhimurium การเปลี่ยนแปลงความถี่ของแต่ละซีโรวาร์สามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เช่น ภายในไม่เกิน 1-2 ปี ส่วนมากแล้วในภูมิภาคหนึ่งจะมีจำนวนซีโรวาร์ไม่มากนักที่แพร่ระบาด เช่น ในเขตภูมิภาคเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของ *Salmonella* Weltevreden เป็นอันดับต้นๆ [14, 26, 27, 28] อุตบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ตามที่มีรายงานไว้เมื่อปี พ.ศ. 2540 พบว่า *Salmonella* spp. ยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว (ตารางที่ 2.2) [29]

ตารางที่ 2.2 จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. ต่อประชากรแสนคนในบางประเทศ ปี พ.ศ. 2540 [30]

ประเทศ	จำนวนผู้ป่วย
เยอรมัน	120
ญี่ปุ่น	73
ออสเตรเลีย	38
เนเธอร์แลนด์	16
สหรัฐอเมริกา	14

สำหรับในประเทศสหรัฐอเมริกามีรายงานจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับ *Salmonella* spp. ระหว่างปี 2536-2540 จำนวน 32,610 ราย หรือ คิดเป็นร้อยละ 37.9 ของจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับแบคทีเรียที่ติดต่อทางอาหาร ในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิต 13 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 44.8 ของจำนวนผู้เสียชีวิตจากการได้รับแบคทีเรียที่ติดต่อทางอาหาร นับว่า *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียสาเหตุอันดับหนึ่งที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยและตายจากการบริโภคอาหาร [31]

ในประเทศไทย พบว่า *Salmonella* spp. เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ การควบคุมอุบัติการณ์ของ *Salmonella* spp. ในคน วิธีหนึ่งก็คือการลดการแพร่กระจายของเชื้อซัลโมเนลลาในอาหารที่ได้จากสัตว์ (food from animal origins) มีรายงานพบ *Salmonella* spp. ในเด็กที่มีอาการท้องเสียสูงถึงร้อยละ 13 [32] เกือบเท่ากับผู้ใหญ่ที่มีอุบัติการณ์ประมาณร้อยละ 15 [33] เนื่องจาก *Salmonella* spp. ที่ก่อให้เกิดอาการอักเสบของทางเดินอาหาร (gastroenteritis) หรืออาการท้องเสีย (diarrhea) นั้นสามารถพบได้ในสัตว์หรือสิ่งแวดล้อมที่เลี้ยงสัตว์ มีรายงานพบ *Salmonella* spp. สูงถึงร้อยละ 10 จากไก่ที่ออกจากฟาร์มเพื่อส่งไปที่โรงเชือด [28] โดยซีโรวาร์ที่พบบ่อยที่สุด คือ *Salmonella* Enteritidis [26] นอกจากนี้เนื้อไก่แล้ว ไช้ไก่ก็ยังเป็นแหล่งของ *Salmonella* spp. ด้วย

2.1.8 ประชากรกลุ่มเสี่ยง

ข้อมูลที่มีอยู่ในประเทศไทยและรายงานอย่างเป็นทางการเป็นส่วนมากได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งรายงานโดยศูนย์ซัลโมเนลลาและชิเจลลา หรือ National *Salmonella* and *Shigella* Center (NSSC) เป็นประจำทุกปี จากรายงานเมื่อปี พ.ศ. 2549 พบว่ามีอยู่ 2 กลุ่มอายุที่พบอุบัติการณ์ของเชื้อซัลโมเนลลาเป็นส่วนมาก คือ กลุ่มเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี โดยพบในตัวอย่าง rectal swab และตัวอย่างอุจจาระ กลุ่มผู้ใหญ่อายุประมาณ 35 ปี พบในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ

นอกจากนี้ชิโรวาร์ของซัลโมเนลลาที่พบมากในคนไทยจากตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น คือ *Salmonella* Enteritidis ร้อยละ 18.46 ตามมาด้วย *Salmonella* Weltevreden ร้อยละ 6.89 และ *Salmonella* Typhimurium ร้อยละ 3.17 จะเห็นได้ว่าโดยมากแล้วคนไทยจะป่วยจากซัลโมเนลลาในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารอีกเสบ ส่วนซัลโมเนลลาชิโรวาร์อื่นที่พบในความถี่สูงเช่นกัน ได้แก่ *Salmonella* Anatum และ *Salmonella* Stanley เป็นต้น [26, 27]

2.2 วิธีการแยกและตรวจหาซัลโมเนลลา

เนื่องจากซัลโมเนลลาเป็นเชื้อโรคที่ร้ายแรงต่อผู้บริโภค จึงไม่อนุญาตให้พบในอาหาร (zero tolerant) ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์หาซัลโมเนลลาในอาหารจึงจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการ Pre-enrichment เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อน

2.2.1 วิธีดั้งเดิม (Conventional Method)

วิธีดั้งเดิม (Conventional method) สำหรับการแยกแยะและการตรวจหาซัลโมเนลลาจากตัวอย่างอาหาร ประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

2.2.1.1 Pre-enrichment broth

Pre-enrichment broth เป็นขั้นตอนเริ่มต้น ซึ่งตัวอย่างอาหารจะถูก enrichment ใน non – selective medium ในการส่งเสริมเซลล์ซัลโมเนลลาที่ได้รับบาดเจ็บให้กลับมาสมบูรณ์ดั้งเดิม อีกทั้งยังเสถียรต่อสภาวะทางกายภาพและขอมให้มีจำนวนของซัลโมเนลลาและจุลินทรีย์อื่นๆ

Pre-enrichment broth มีหลายชนิด ได้แก่ Buffered peptone water (BPW), Tryptic Soy Broth (TSB), lactose broth (LB) และ nutrient broth (NB) ซึ่งพบว่า Buffered peptone water ถูกใช้เป็น Pre-enrichment broth สำหรับตัวอย่างอาหารเกือบทั้งหมด ถึงแม้ว่าจะมีตัวอย่างอาหารบางชนิดที่ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะมากกว่า [34] แต่ดูเหมือนว่าเวลาและอุณหภูมิมีความสำคัญมากกว่า การเลือกชนิดของ Pre-enrichment broth ระยะเวลาในการบ่มของ Pre-enrichment broth ทั่วๆ ไป คือ

16-20 ชั่วโมง [35] Pre-enrichment broth ควรที่จะทำให้ซัลโมเนลลาเจริญได้เป็นอย่างน้อย 10^5 CFU/mL เพื่อให้ทนต่อความเป็นพิษของ selective enrichment media ได้ [36]

2.2.1.2 Selective enrichment

จุดมุ่งหมายของ Selective enrichment เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของซัลโมเนลลาและในเวลาเดียวกันเป็นการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลา ใน ISO standard 6579 (ตารางที่ 2.3) ทั้ง Rappaport-Vassiliadis (RV broth) และ Selenite cystine (SC) broth จะถูกใช้เป็น enrichment ของซัลโมเนลลา การเพิ่มปริมาณของ Selenite cystine (SC) broth ไม่มีผลให้เกิดการพบซัลโมเนลลาเพิ่มขึ้น [37] และในทางปฏิบัติเมื่อมีการใช้ enrichment medium เพียงตัวเดียวมักจะมีการเลือกใช้ RV broth หรือการดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้อยู่เป็นประจำ เหตุที่ไม่นิยมเลือกใช้ Selenite cystine (SC) broth เพราะว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงมาก จึงมีการพัฒนา Selective enrichment broth ขึ้นมาใหม่ชนิดหนึ่ง ชื่อว่า KIMAN พบว่ามีความเป็นพิษน้อยกว่าและให้ผลดีกว่า SC broth สำหรับการแยกเชื้อซัลโมเนลลาจากผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก [38] RV medium มีคุณสมบัติเหนือกว่า Selective enrichment media อื่นๆ [39, 40, 41] นอกจากนั้น Fries and Steinhof [42] พบว่า *S. Enteritidis* จำนวนน้อยมาก ซึ่งมีปนอยู่กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีจำนวนมากกว่านั้น สามารถตรวจพบได้โดยการ enriched ด้วย RV medium อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสำหรับการตรวจหาซัลโมเนลลาในเนื้อสัตว์ปีกนั้น tetrathionate brilliant green bile broth ให้ผลดีกว่า RV broth [43]

Walman และคณะ [44] แสดงถึงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่ม enrichment cultures คือ 24 ชั่วโมง

D' Aoust และคณะ [45] พบว่าการหยุดการวิเคราะห์ซัลโมเนลลาโดยการแช่เย็นของ Pre-enrichment และ enrichment cultures ในช่วงวันหยุด ไม่มีผลต่อการลดลงของการพบซัลโมเนลลาแต่อย่างใด มีการศึกษาขึ้นค้นพบว่า molality enrichment บน Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium มีผลมากต่อการแยกซัลโมเนลลาจากตัวอย่างอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น [37, 46, 47, 48, 49, 50] การตรวจพบซัลโมเนลลาโดยใช้ MSRV medium ทำได้ง่าย มีราคาถูก ทราบผลบวกและผลลบภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งง่ายกว่า standard ISO method จากการศึกษาของ Pless และ Reissbrodt [51] พบว่า Ferrioxamine E ที่ใช้เป็น supplement ของ buffered peptone water มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของซัลโมเนลลาเพิ่มขึ้นและส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของเส้นผ่านศูนย์กลางบน semi-solid enrichment media (ทำให้โคโลนีใหญ่ขึ้น) ปรากฏการณ์นี้เป็นผลในการทำให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้นลง

2.2.1.3 Plating on selective media

การ Plating บน selective media เป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นและยอมให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะเป็นซัลโมเนลลา ซึ่ง selective media มีหลายชนิด ได้แก่ bismuth sulfite

(Bis), brilliant green (BGA), xylose lysine desoxycholate (XLD) และ Hektoen enteric agars (Hek) นอกจากนี้การประเมินค่าของ plating media และการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่สำหรับแยกเชื้อซัลโมเนลลาที่มีการพัฒนามาตลอด พบว่ายังไม่ม้ออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไหนที่เหมาะสมที่สุด ตารางที่ 2.4 แสดงถึงลักษณะเฉพาะหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ต่อการแยกโคโลนีของซัลโมเนลลาออกจากโคโลนีของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ได้แก่ *Proteus*, *Citrobacter* และ *E. coli*

ตารางที่ 2.3 มาตรฐาน ISO สำหรับการวิเคราะห์ Enterobacteriaceae [43]

ISO standard	Product group	Title
4831:1991	Horizontal	Enumeration of coliforms – MPN technique
4832:1991	Horizontal	Enumeration of coliforms – colony count technique
5541-1:1986	Milk (products)	Enumeration of coliforms – colony count technique
5541-2:1986	Milk (products)	Enumeration of coliforms – MPN technique
6391:1997	Meat (products)	Enumeration of <i>Escherichia coli</i> – colony count technique at 44° C using membranes
7251:1993	Horizontal	Enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i> – most probable number technique
11866-1:1997	Milk (products)	Enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i> – Part 1 : most probable number technique
11866-2:1997	Milk (products)	Enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i> – Part 2 : most probable number technique using 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG)
11866-3:1997	Milk (products)	Enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i> – Part 3 : colony count technique at 44° C using membranes
5552:1997	Meat (products)	Detection and enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation – MPN technique and colony count technique
7402:1993	Horizontal	Enumeration Enterobacteriaceae without resuscitation – MPN technique and colony count technique
8523:1991	Horizontal	Detection of Enterobacteriaceae with pre-enrichment
6579:1993	Horizontal	Method for the detection of <i>Salmonella</i>
6785:1985	Milk (products)	Detection of <i>Salmonella</i>
10273:1994	Horizontal	Detection of presumptive pathogenic <i>Yersinia enterocolitica</i>

ตารางที่ 2.4 ลักษณะเฉพาะของ *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter* และ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยก *Salmonella* ชนิดต่างๆ [43]

Medium ^a	Selective/diagnostic characteristics	Typical reactions (+/-) for most strains of			
		<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>E. coli</i>
Rambach	Acid from propylene glycol	+	-	-	-
	β -Galactosidase with chromogenic BCIG	-	-	+	+
XLT4	Tergitol 4 (growth)	+	-	+	+
	H ₂ S production	+	+	+	-
	Lactose fermentation	-	-	+	+
SM-ID	Glucuronate	+	-	-	+
	β -Galactosidase with chromogenic substrate	-	-	+	+
NBGL	Novobiocin (growth)	+	-	+	-
	H ₂ S production	+	+	+	-
	Glycerol fermentation	-	-	+	-
	Lactose fermentaion	-	-	+	+

^a Rambach : Rambach agar (Merck); XLT4: Xylose lysine Tergitol 4 agar; SM-ID: *Salmonella* medium SM-ID (bioM'erieux); NBGL: novobiocin brilliant green glycerol lactose agar.

2.2.1.4 Biochemical screening

การทดสอบทางชีวเคมีสามารถจำแนกซัลโมเนลลาได้พอสังเขป และถึงแม้ว่าจะแยกได้ซัลโมเนลลาที่มีลักษณะชีวเคมีใดก็ตาม ก็มีความจำเป็นต้องทำการทดสอบ agglutination กับ antisera ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 2.5 ปฏิกริยาชีวเคมีและเซรัมวิทยาของซัลโมเนลลา [52]

Test or substrate	Result		<i>Salmonella</i> species reaction ^a
	Positive	Negative	
1. Glucose (TSI)	Yellow butt	Red butt	+
2. Lysine decarboxylase (LIA)	Purple butt	Yellow butt	+
3. H ₂ S (TSI and LIA)	blackening	No blackening	+
4. Urease	Purple-red color	No color change	-
5. Lysine decarboxylase broth	Purple color	Yellow color	+
6. Phenol red dulcitol broth	Yellow color / gas	No gas; no color change	+ ^b
7. KCN broth	Growth	No growth	-
8. Malonate broth	Blue color	No color change	- ^c
9. Indole test	Violet color at surface	Yellow color at surface	-
10. Polyvalent flagellar test	Agglutination	No agglutination	+
11. Polyvalent somatic test	Agglutination	No agglutination	+
12. Phenol red lactose broth	Yellow color / gas	No gas; no color change	- ^c
13. Phenol red sucrose broth	Yellow color / gas	No gas; no color change	-
14. Voges-Proskauer test	Pink to red color	No color change	-
15. Methyl red test	Diffuse red color	Diffuse yellow color	+
16. Simmons citrate	Growth; blue color	No growth; no color	v

^a+, 90% or more positive in 1 or 2 days; -, 90% or more negative in 1 or 2 days; v, variable.

^bMajority of *S. Arizonae* cultures are negative.

^cMajority of *S. Arizonae* cultures are positive.

2.2.1.5 Serological confirmation

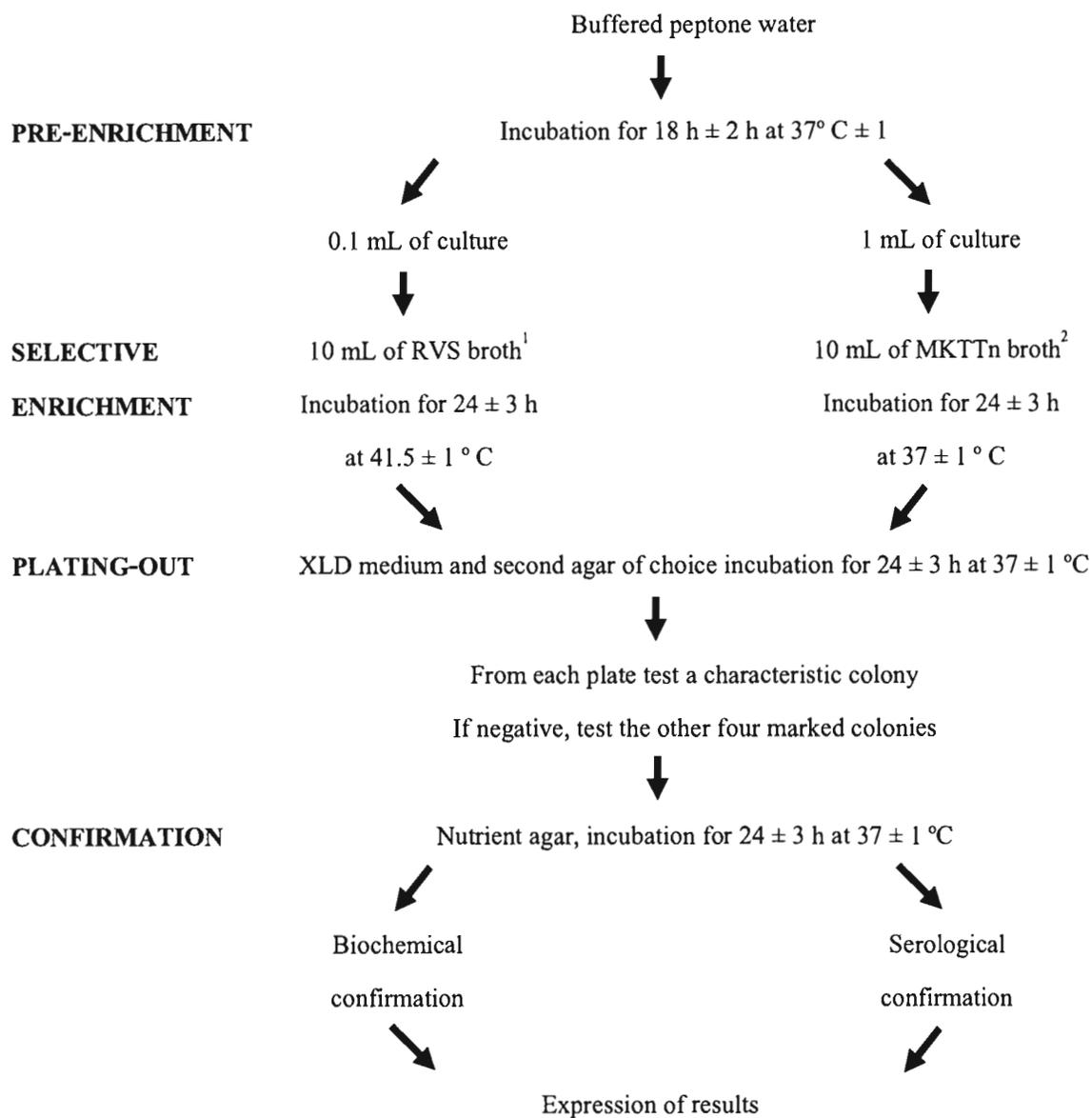
แบคทีเรียซึ่งผ่านการทดสอบทางชีวเคมีมาแล้วว่าเป็นซัลโมเนลลา มีความจำเป็นต้องทำการทดสอบโดยอาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยา (serology) เพื่อพิสูจน์ลักษณะทางแอนติเจนของเชื้อดังกล่าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อซัลโมเนลลาได้เป็นอย่างดี การทดสอบในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกทั่วไป นิยมใช้ Slide agglutination โดยทำการทดสอบระหว่างเชื้อกับแอนติซีรัมที่จำเพาะ

ตารางที่ 2.6 การทดสอบยืนยันเชื้อซัลโมเนลลา [53]

Biochemical reactions	Auto-agglutination ¹	Serological reaction	Interpretation
Typical	No	O-, Vi-, H- Antigen positive	Strains considered to be <i>Salmonella</i>
Typical	No	All reactions negative	
Typical	Yes	Not tested ²	May be <i>Salmonella</i>
No typical reactions	No / Yes	O-, Vi-, H- Antigen positive	
No typical reactions	No / Yes	All reactions negative	Not considered to be <i>Salmonella</i>

¹the agglutination of bacteria after tested with saline solution only

²the strain considered as auto-agglutination shall not be submitted to the following tests as the detection of the antigen is impossible.



¹RVS broth (Rappaport-Vassiliadis medium with soya)

²MKTTn broth (Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth)

รูปที่ 2.3 Standard cultural method of ISO/FDIS 6579:2002(E) สำหรับการตรวจหาซัลโมเนลลาในอาหารและอาหารสัตว์ [53]

2.2.2 วิธีที่รวดเร็วกในการตรวจหาซัลโมเนลลา

การตรวจวิเคราะห์ทั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารถือว่าเป็นมาตรฐานการปฏิบัติเพื่อให้แน่ใจในคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร อย่างไรก็ตามในการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional method) ใช้ระยะเวลาหลายวันกว่าจะทราบผล ดังนั้นวิธีที่รวดเร็วก (rapid method) จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการตรวจหาทั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร ทั้งในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหาร [54]

มีวิธีที่รวดเร็วกหลายวิธีสามารถใช้ในการตรวจหาซัลโมเนลลาจากอาหารที่ได้ถูกนำมาใช้เป็น official methods โดย AOAC International และได้รับการรับรองโดย FDA อย่างไรก็ตามเมื่อมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะต้องทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี conventional ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธีรวดเร็วกนี้สามารถรายงานผลได้เลย วิธีที่รวดเร็วกที่ได้รับการรับรองโดย AOAC International แสดงดังตารางที่ 2.7 [52]

วิธีการที่รวดเร็วกนี้อาจจะเป็นการตรวจเซลล์จุลินทรีย์โดยตรง หรือตรวจเมตาโบไลต์ของจุลินทรีย์ จึงแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

2.2.2.1 วิธีโดยตรง (direct methods)

ใช้วิธีการตรวจเซลล์โดยตรงซึ่งอาจจะมีกำบ่ม (incubate) หรือไม่ก็ได้ ตัวอย่างของวิธีนี้ได้แก่ Direct epifluorescent filter technique (DEFT) [55] และ flow cytometry [56]

2.2.2.2 วิธีอ้อม (indirect methods)

ใช้วิธีวัดเมตาโบไลต์ หรือการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์ ตัวอย่างของวิธีนี้ได้แก่ ATP bioluminescence [57] Impedimetry [58] และ Turbidometry [59] เป็นต้น

ตารางที่ 2.7 วิธีที่รวดเร็วสำหรับการตรวจหาซัลโมเนลลาที่ได้รับการรับรองโดย AOAC [60]

Kit name	Rapid screening method		AOAC Official
	Manufacture	Primary matrices	Methods of Analysis selection number
1-2 TEST	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	989.13
Assurance Gold <i>Salmonella</i> EIA	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	999.08
Assurance <i>Salmonella</i> EIA	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	992.11
VIP for <i>Salmonella</i>	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	999.09
VIDAS Immuno Concentration <i>Salmonella</i>	bioMerieux	All foods	2001.07; 2001.08; 2001.09
VIDAS Immuno (SLM)	bioMerieux	Food and Ingredients	996.08
GENE TRAK <i>Salmonella</i> assay	Neogen Corporation	Food	987.10
<i>Salmonella</i> Tek	Organon Teknika	Food	986.35; 987.11; 993.08
TECRA <i>Salmonella</i> Unique	TECRA Diagnostics	Food and food related samples, environmental samples	2007.07
TECRA <i>Salmonella</i> VIA	TECRA Diagnostics	Food and food related samples, environmental samples	989.14

Direct epifluorescence filter technique (DEFT)

วิธีนี้อาหารจะถูกกรองผ่านเมมเบรน ซึ่งบางครั้งเพื่อให้กรองได้ง่ายขึ้นจะมีการใส่ enzyme - surfactant ลงไป ชิ้นส่วนใหญ่จะถูกกรองออกไปก่อน (pre-filtration) หลังจากนั้นตัวอย่างที่กรองได้นำมาข้อมสี โดยทั่วไปใช้ Acridine Orange (AO) เซลล์ของจุลินทรีย์จะติดสีเรืองแสง (orange fluorescing) วิธีนี้สามารถต่อเข้ากับกล้องจุลทรรศน์เพื่อให้เกิดระบบภาพอัตโนมัติ เช่น Bio - Foss Automated System (Foss Electric, Denmark) หรือ COBRA system (Biocom, France) ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยได้ 150 ตัวอย่าง ภายในเวลา 1 ชั่วโมง วิธี DEFT นี้ถูกนำมาใช้ในอาหารหลายๆ อย่าง เช่น นม และผลิตภัณฑ์นม รวมถึงพวกเครื่องดื่มต่าง ๆ (beverages) [55]

ข้อดีของ DEFT คือมีความไวค่อนข้างสูง (sensitivity) ในทางทฤษฎี 1 เซลล์ของจุลินทรีย์ก็สามารถตรวจพบได้ แต่ในทางปฏิบัติค่าที่สามารถตรวจพบได้ (detection limit) จะอยู่ที่ 10^3 CFU/mL ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือราคาของเครื่องมือค่อนข้างสูง

Flow cytometry

เทคนิคของวิธีนี้อาศัยทั้งกล้องจุลทรรศน์ และการตรวจทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ในของเหลว เซลล์จะวิ่งในของเหลว (fluid stream) ผ่านแสงเลเซอร์ซีนอน (xenon) หรือ mercury arc ถ้าแสงจะกระจายเมื่อผ่านเซลล์และความเข้มของแสงที่เปลี่ยนไปจะสามารถวัดได้ เซลล์อาจติดฉลากด้วย fluorochromes, DNA ที่ข้อมสีหรือ fluorescent antibodies สามารถใช้ติดฉลากเซลล์เป้าหมาย (target cells) การแยกเซลล์เป้าหมายออกจาก background material ทำได้โดยใช้วิธีการ immunomagnetic separation วิธีการนี้ค่อนข้างรวดเร็วมาก ใช้เวลาเพียง 30 นาที ข้อได้เปรียบที่สำคัญสำหรับ flow cytometry คือสามารถทำได้หลายๆ ตัวอย่างภายในเวลาไม่กี่นาที flow cytometry เหมือนกับวิธี DEFT คือส่วนมากจะใช้กับ นมดิบ เนื้อสัตว์ และอาหารทั่วไป ส่วนค่าที่สามารถตรวจพบได้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร เช่น นมดิบมีค่าอยู่ระหว่าง 10^4 CFU/mL เนื้อสัตว์ 10^5 CFU/mL โยเกิร์ต 10^2 CFU/mL และเครื่องดื่มมีค่าอยู่ระหว่าง $5.0 \times 10^1 - 1.4 \times 10^4$ CFU/mL [56]

Impedimetry

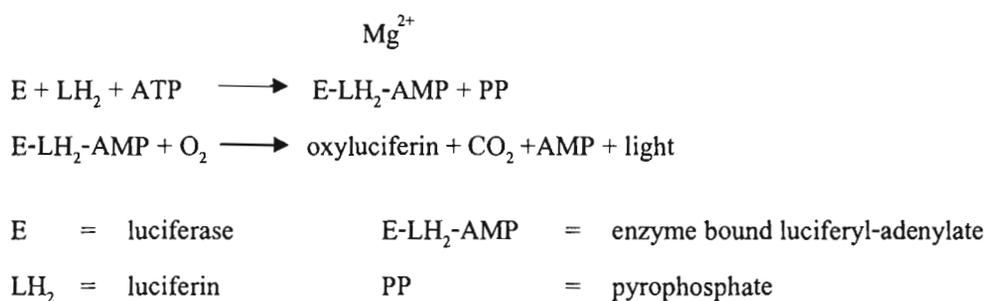
Impedance microbiology ใช้หลักการที่ว่าในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะทำให้ประจุไฟฟ้าเปลี่ยนไป Impedance มีพารามิเตอร์ 2 ส่วนคือ conductance (G) และ capacitance (C) การเปลี่ยนแปลงของ conductivity วัดได้ทั้งโดยตรงและโดยอ้อม ในการวัดโดยตรง โมเลกุลของอาหารจะถูกย่อยเป็นประจุไฟฟ้าเล็กๆ ซึ่งเป็นผลจากเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถวัด conductivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป แต่อย่างไรก็ตามจำนวนของจุลินทรีย์จะต้องถึงระดับขั้น $10^5 - 10^6$ CFU/mL จึงจะสามารถวัดได้ จุดที่การเปลี่ยนแปลงจะเห็นได้เรียก detection time กรณิของ conductance curve จะแตกต่างจาก growth curve เล็กน้อย เนื่องจากจะเริ่มต้นจากเซลล์จุลินทรีย์ 10^6 CFU/mL [58]

ส่วนวิธีโดยอ้อม ขึ้นอยู่กับการผลิต CO₂ โดยเชื้อจุลินทรีย์ CO₂ จะถูกดูดโดยสารละลายต่าง และวัดการลดลงของ conductivity ในสารละลาย ข้อแตกต่างจากวิธีวัดโดยตรง คือ การวัด CO₂ จะวัดได้เร็วกว่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้า ทำให้ลดระยะเวลาและมีความไวสูง และไม่ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเหมือนวิธีโดยตรง

วิธี Impedance ได้รับการยอมรับในทางจุลชีววิทยาทางอาหารมากมายเช่น "The Malthus Salmonella" ได้รับการยอมรับในขั้นแรก โดย AOAC นอกจากนี้ยังใช้กับเชื้ออื่นๆ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* และ *Campylobacter* เป็นต้น ส่วนวิธีโดยอ้อมนำมาใช้กับอาหารชนิดที่มีการปนเปื้อนน้อย เช่น น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม โดย Deak and Beuchat [61] พบว่า lower detection limit ต่ำถึง 1 cells/10 mL ก็เป็นไปได้ ถ้าตัวอย่างมีการ pre-incubated ก่อน

ATP bioluminescence

เป็นวิธีการวัด ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งสกัดได้จากเซลล์ ปริมาณของ ATP วัดโดยอาศัยปฏิกิริยา luciferin-luciferase system โดยมี Mg²⁺ และ light energy เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) วิธีการนี้รวดเร็วมาก ใช้เวลาเพียงไม่กี่วินาทีสำหรับการนำไปใช้ในด้านสุขลักษณะ และน้อยกว่า 1 ชั่วโมงสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง แต่มีข้อจำกัดคือ ATP จะมีอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตทุกชนิด ดังนั้น ATP ในตัวอย่างจะปนกับ ATP ของเซลล์ ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดโดยใช้เอ็นไซม์ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ [57]



ปริมาณแสงที่ปล่อยออกมาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ATP การวินิจฉัย ATP จะบอกแค่จำนวนคร่าวๆ ของจุลินทรีย์ แต่ไม่สามารถแยกจุลินทรีย์ได้ ในทางทฤษฎีจำนวนของ ATP ต่ำสุดประมาณ 100 fg (10-13 g) สามารถวัดได้ ซึ่งจะเท่ากับจุลินทรีย์จำนวน 100 เซลล์ ในทางปฏิบัติความไวจะอยู่ระหว่าง 1,000 fg (10-12g) ซึ่งจะเท่ากับ 1,000 เซลล์/แบคทีเรีย เซลล์ซึ่งเจริญหรืออยู่ในช่วง stationary growth phase จะมี ATP น้อยซึ่งจะมีผลต่อการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามปริมาณ ATP ในตัวอย่างสามารถประมาณค่าเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลัง active ได้ ซึ่งจะมีความสำคัญมากเมื่อศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ [62]

Immunological methods

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการของปฏิกิริยาจำเพาะของในการจับตัวกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน แบ่งออกได้เป็นหลายประเภทเช่น

1. Latex agglutination วิธีการนี้จะใช้แอนติบอดีเคลือบ latex particles ถ้ามีแอนติเจนจะทำปฏิกิริยา agglutinate กับ latex particles ภายในเวลาไม่กี่นาที [63]

2. Enzyme immunoassay เป็นวิธีการที่ตรวจหาแอนติเจน โดยอาศัยปฏิกิริยาเอนไซม์ ใช้เอนไซม์เป็น marker เพื่อให้เห็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดี ชัดเจนยิ่งขึ้น

ข้อเสียของวิธีนี้คือ ทุกๆ ขั้นตอนของการวิเคราะห์จะต้องมีการล้าง (washing) ซึ่งจะทำให้งานหนักเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิคทาง immunological ก่อนข้างได้รับการเชื่อถือ เนื่องจากความไว ความจำเพาะ และความรวดเร็ว

Gene technology

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคทาง molecular biology มาใช้ในจุลชีววิทยาทางอาหารเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตัวอย่างเช่น เทคนิคของ DNA hybridization โดยใช้ DNA probe ที่สร้างขึ้นตรวจหา DNA target ที่จำเพาะกัน ที่ผลิตออกมาเป็นการค้าเช่น ชุดตรวจหาซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.), *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Listeria* และ *C. jejuni* เป็นต้น อย่างไรก็ตาม detection level ของวิธีนี้จะมีค่าประมาณ 10^5 - 10^6 CFU/mL และขั้นตอนในการ enrichment ก็ยังจำเป็นอยู่

อีกวิธีที่น่าสนใจคือ การเพิ่มจำนวน DNA หรือ RNA ทำให้สามารถตรวจจับ target DNA หรือ RNA ได้ วิธีนี้เรียกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) วิธีการขึ้นอยู่กับการซ้ำรอบ (cycle) ของการแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว (denaturation) การให้ primer เข้าเกาะ DNA สายเดี่ยว (primer annealing) และขั้นสุดท้ายคือการสร้างสาย DNA โดยอาศัยเอนไซม์ oligonucleotide primers, *Taq* Polymerase และ DNA template (primer extension) ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ RNA probe จะมีข้อดีมากกว่าเนื่องจาก RNA-DNA hybrids จะมีความเสถียร (stable) มากกว่า DNA-DNA

ข้อดีของ PCR คือ ก่อนข้างไวและจำเพาะ และด้วยการใช้ระบบอัตโนมัติ สามารถทำ PCR เสร็จภายใน 1 วัน แต่จากการที่ก่อนข้างไว ทำให้มีข้อเสียคือ เกิด cross- contamination โดย external DNA และอีกข้อคือไม่สามารถแยก genetic material ของเซลล์ที่ตายแล้วจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ ทำให้เทคนิค PCR ยังไม่นิยมนำมาใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการของโรงงาน เนื่องจากปัญหาการปนเปื้อน วิธีการที่ยุ่งยาก และอุปกรณ์ที่มีราคาสูง [64]

2.3 การพัฒนาอนุภาคนาโนตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียถือว่าเป็นเชื้ออันตรายที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารในผู้ป่วย เด็ก และคนแก่ โดยสาเหตุในการปนเปื้อนส่วนใหญ่มาจากอาหาร เช่นน้ำ และอาหารสดต่างๆ การตรวจและวิเคราะห์ให้ทราบผลอย่างถูกต้องและรวดเร็ว นั้น ในปัจจุบันใช้วิธีเพิ่มดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารให้มีจำนวนมาก ๆ โดยเทคนิค PCR แต่วิธีดังกล่าวยังมีข้อเสีย คือ ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน อาจต้องรอถึง 48 ชั่วโมง จึงจะทราบผล [5, 64]

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียแบบใหม่ ซึ่งให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วและถูกต้องกว่าวิธี PCR โดยใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์เพียง 20 นาทีเท่านั้น ก็ทำให้ทราบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างอาหารหรือไม่ และมากน้อยเพียงใด [7]

วิธีดังกล่าวเป็นการใช้อนุภาคนาโนซิลิกา (silica nanoparticles) ขนาด 70 นาโนเมตร ที่บรรจุสีเรืองแสง (Fluorescent) จำนวนหลายพันโมเลกุลไว้ภายในอนุภาค ส่วนผิวภายนอกของอนุภาคจะมีแอนติบอดีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวิเคราะห์เคลือบเอาไว้ ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนบนผิวของแบคทีเรียได้ ซึ่งถือว่าการพัฒนารูปแบบใหม่ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างอาหารได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง โดยใช้หลักการพื้นฐานการทำงานของแอนติเจน-แอนติบอดีในปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยามาประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 2.4 การพัฒนาอนุภาคนาโนตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ [7]

2.4 อนุภาคนาโนซิลิกา (Silica nanoparticles)

ความเจริญทางวิทยาศาสตร์ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วมาก ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์กำลังให้ความสนใจศึกษาพัฒนาวิธีการเตรียมอนุภาคให้มีขนาดในระดับนาโนเมตรหรือเรียกว่า อนุภาคนาโน ซึ่งก็คืออนุภาคที่มีโครงสร้างที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร หรือหมายถึงการรวมตัวกันของอะตอมเป็นกลุ่มก้อนที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร การที่อนุภาคมีขนาดเล็กลง ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มมากขึ้น จึงมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้า สมบัติทางแสง และสมบัติทางแม่เหล็ก ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ [65]

ปัจจุบันอนุภาคนาโนที่นิยมทำให้อยู่ในระดับนาโนเมตรเพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ คืออนุภาคนาโนซิลิกา ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้หลายด้าน เช่น ประยุกต์ใช้ในระบบการตรวจสอบทางชีวภาพ (biodetection) ใช้ในปฏิกิริยา catalysis อุตสาหกรรมการผลิตเม็ดสี (pigment) อุตสาหกรรมยา (pharmacy) อุตสาหกรรมทางด้านอิเล็กทรอนิกส์ (electronics) และ thin film substrates, thermal insulator และ humidity sensors [66] โดยคุณภาพของผลิตภัณฑ์จะขึ้นอยู่กับขนาดและการกระจายขนาด (size distribution) ของอนุภาค การจัดการองค์ประกอบ และการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาค

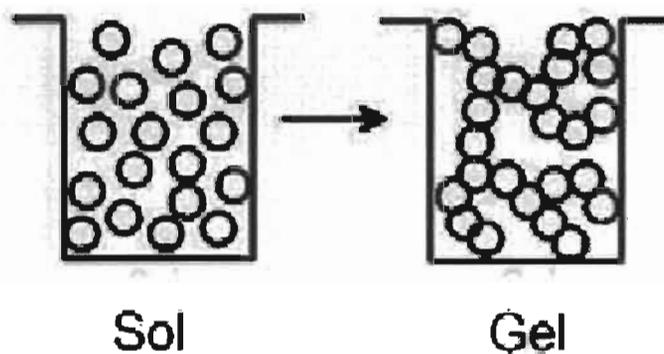
อนุภาคนาโนซิลิกาที่มีสีเรืองแสงอยู่ภายใน (dye-doped silica nanoparticles) จะถูกใช้เป็นโพรบในการวิเคราะห์ต่างๆ และใช้ติดฉลาก (labelling) สำหรับตรวจสอบโมเลกุลทางชีวภาพ [61] ซึ่งอนุภาคนาโนซิลิกามีข้อดี คือ สามารถเตรียมและดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคได้ง่าย มีความชอบน้ำ (Hydrophilic) สูง และเป็น biocompatible ที่ดี ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในสารละลาย และไม่เกิดการรั่วไหลของสีที่อยู่ภายใน มีความคงตัวของสีสูง เนื่องจากซิลิกาแมทริกซ์จะทำหน้าที่ป้องกันสีที่อยู่ภายในจากผลกระทบของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ออกซิเจน ตัวทำละลาย และสารละลายต่างๆ ในบัฟเฟอร์ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางชีวภาพที่ต้องการความไวสูง [6, 68, 69, 70]

2.4.1 การเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกา

อนุภาคนาโนซิลิกาสามารถเตรียมได้จากวิธีทางเคมีและฟิสิกส์ แต่วิธีทางเคมีนั้น ให้ผลที่ดีและเตรียมได้ง่ายกว่า โดยเตรียมผ่านกระบวนการ โซล-เจล ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีในระดับโมเลกุล โดยใช้ออกไซด์หรือไฮดรอกไซด์ชนิดต่างๆ เป็นสารตั้งต้นผ่านกระบวนการ ไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน ทำให้สามารถควบคุมขั้นตอนการเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ

2.4.1.1 กระบวนการโซล-เจล (Sol-Gel Technique)

กระบวนการผลิตโดยวิธีโซล-เจล เป็นกระบวนการเตรียมทางเคมีแบบเปียก (Wet process) ชนิดหนึ่ง ที่ได้รับความนิยมอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง โดยทั่วไปกระบวนการโซล-เจลเป็นกระบวนการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวที่เรียกว่า "โซล" ซึ่งส่วนมากอยู่ในรูปของสารแขวนลอยที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 0.1-1 ไมโครเมตร เป็นของแข็งที่เรียกว่า "เจล" [71]



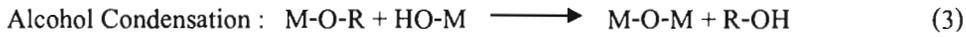
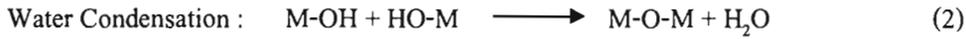
รูปที่ 2.5 การเปลี่ยนสถานะจากโซลเป็นเจล [72]

ความสนใจในเทคนิคโซล-เจล เริ่มศึกษาตั้งแต่กลางคริสต์ศตวรรษที่ 19 เมื่อมีการเตรียมซิลิกาเจล (silica gel) จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ภายใต้สภาวะกรดของสารเตตระเอทิลออร์โธซิลิเกต [tetraethyl orthosilicate; TEOS, $[\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4]$] วิธีการนี้ได้รับความสนใจจากนักเคมีเป็นอย่างมาก แม้ว่านักเคมียังไม่ค่อยเข้าใจปรากฏการณ์ดังกล่าวมากนัก

คำว่า “โซล-เจล” เป็นพจน์ที่มีลักษณะเฉพาะตัวและเกี่ยวข้องกับเทคนิคต่างๆ มากมายที่สามารถนำมาใช้เตรียมสารที่มีความบริสุทธิ์สูง และมีความสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกันในระดับโมเลกุล

“โซล” คือ สารแขวนลอยในสถานะของเหลวคล้ายสารละลาย ส่วน “เจล” เป็นสารละลายแขวนลอยชนิดหนึ่งซึ่งจับตัวแข็งเป็นวุ้นมีความหนืดสูงจนสารละลายมีความยืดหยุ่นอย่างของแข็ง ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากโครงข่าย (Net work) ของเฟสที่กระจาย (dispersed phase) หรือ คอลลอยด์ (Colloid) และสารตัวกลางทำกระจาย (Dispersion medium) วนเวียนอยู่ทั่วโครงข่ายนั้น

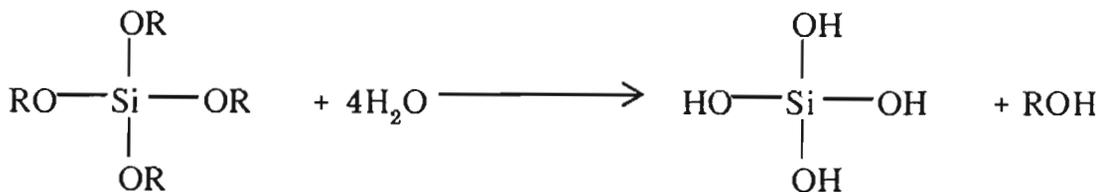
ปฏิกิริยาที่สำคัญในกระบวนการโซล-เจล มี 3 ปฏิกิริยา คือ ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis), Water condensation และ Alcohol condensation ดังสมการ



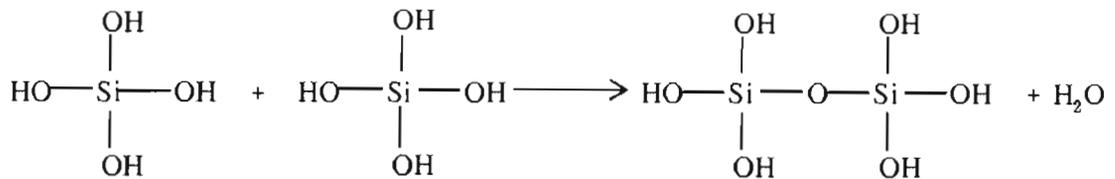
เมื่อ M แทน โลหะ ได้แก่ Si, Zr, Ti, Al, Sn, Ce และ OR แทน Alkoxy group

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) อัตราส่วนโมลของน้ำและโลหะ และอุณหภูมิ ดังนั้นการควบคุมปัจจัยเหล่านี้ในสถานะที่แตกต่างกัน จะทำให้โซลและเจลที่ได้มีสมบัติและโครงสร้างต่างกัน

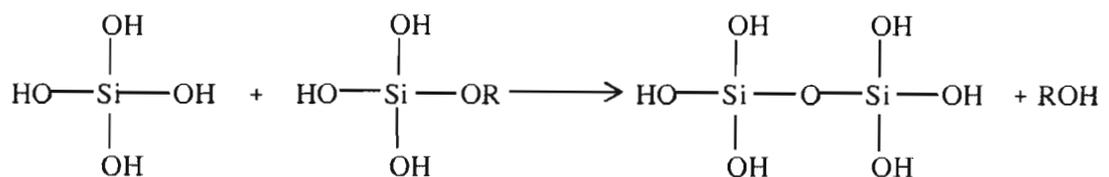
ขั้นตอนแรกของการทำโซล-เจล คือ การผสมสารตั้งต้น (Precursor) กับน้ำ สารตั้งต้นที่นิยมใช้ในกระบวนการโซล-เจล เป็นสารประกอบโลหะและกึ่งโลหะที่ล้อมรอบด้วยลิแกนด์ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เช่น Metal alkoxide เป็นสารตั้งต้นที่ได้รับความนิยมสูง เนื่องจากทำปฏิกิริยากับน้ำได้ดี เช่น Tetramethoxysilane (TMOS) และ Tetraethoxysilane (TEOS) ส่วนอัลคอกไซด์ชนิดอื่น เช่น Aluminate, Titanate และ Borate มีใช้กันแพร่หลาย โดยมักใช้ร่วมกับ TEOS เช่น $\text{Si}(\text{OR})_4$ ซึ่ง R คือ CH_3 (TMOS), C_2H_5 (TEOS) หรือ C_3H_7 จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำ ดังสมการ



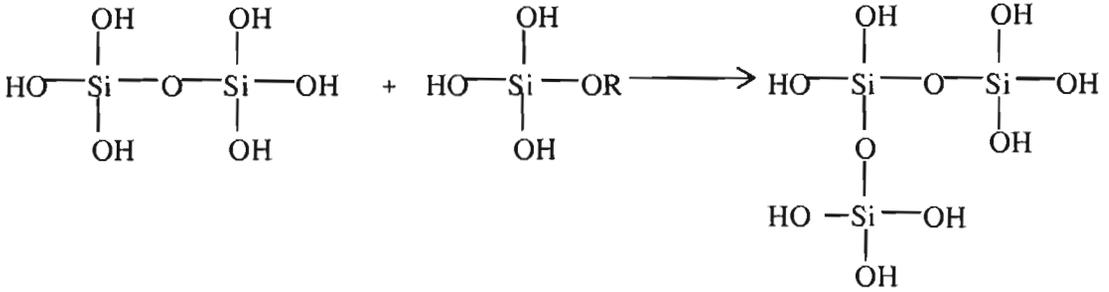
และในขณะเดียวกันก็จะเกิดปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน : Water Condensation Reaction



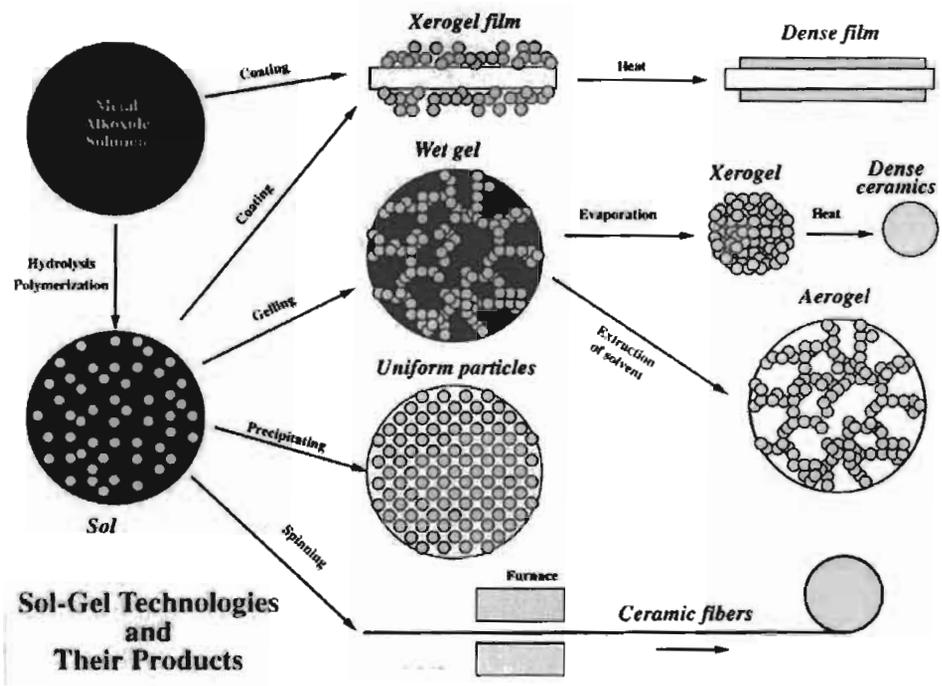
หรือ Alcohol Condensation Reaction



สารประกอบที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยาคอนเดนเซชันต่อไปจนกลายเป็น Silica Network อยู่ในสถานะที่เรียกว่าเจล จึงเรียกปฏิกิริยาดังกล่าวว่า ปฏิกิริยาโพลีคอนเดนเซชัน



ในกระบวนการผลิตทั้งจากสถานะที่เป็น โซลและเจล เมื่อเข้าสู่กระบวนการทำให้แห้งจะได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น ไฟเบอร์ (fiber), aerogel, xerogel, powder และ coating film เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 2.6 ความหลากหลายของกระบวนการ โซล-เจล [73]

ข้อดีของเทคนิค โซล-เจล คือ การรวมตัวกันของทุกโมเลกุลเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้สารประกอบที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง อนุภาคมีขนาดเล็กและละเอียดมาก อยู่ระหว่าง 20-50 นาโนเมตร ส่งผลให้มีพื้นที่ผิวมาก และสามารถกำหนดสมบัติต่างๆ ที่ต้องการ ได้ง่าย วิธีการนี้จึงถือเป็นวิธีที่มีประโยชน์และมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมเคมี เทคโนโลยีพลังงาน อุตสาหกรรมรถยนต์ และอุตสาหกรรมเซรามิก เป็นต้น [74]

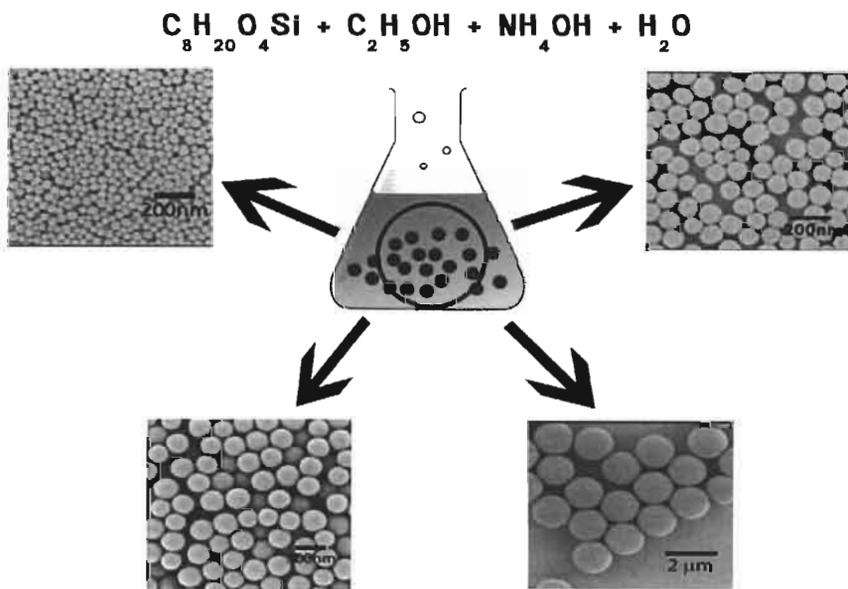
ปัจจุบันการเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาโดยอาศัยกระบวนการโซล-เจล มี 2 วิธี คือ

- (1) Stöber method
- (2) Microemulsion method

2.4.1.2 วิธี Stöber (Stöber method)

ในปี 1968 Stöber และคณะ [75] ได้พัฒนาใช้กระบวนการ โซล-เจลเพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาแบบ monodisperse ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 50 นาโนเมตร ถึง 2 ไมโครเมตร โดยใช้ silica alkoxide เป็นสารตั้งต้น (เช่น tetraethyl orthosilicate; TEOS) นำมาไฮโดรไลซ์ในส่วนผสมของแอลกอฮอล์และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ การไฮโดรไลซิสของ TEOS จะทำให้เกิด silicic acid และเกิดการรวมตัวเป็น amorphous silica particles โดยพบว่าขนาดของอนุภาคขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ซิลิกา รวมทั้งชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาด้วย กล่าวคือ อนุภาคที่เตรียมจากเมทานอลจะมีขนาดเล็กกว่าการใช้แอลกอฮอล์ที่เป็นสายโซ่ยาว

วิธีนี้สามารถเตรียม dye-doped silica nanoparticles โดยการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างโมเลกุลของสีกับซิลิกาแมทริกซ์ ทำให้โมเลกุลของสีถูกยึดกับ amine-containing silane agent (เช่น 3-aminopropyltriethoxysilane, APTS) จากนั้น APTS และ TEOS จะเกิดการไฮโดรไลซ์และรวมตัวกันในส่วนผสมของน้ำ แอมโมเนีย และเอทานอล เกิดเป็น dye-doped silica nanoparticles



รูปที่ 2.7 ความหลากหลายของขนาดอนุภาคที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธี Stöber [76]

นอกจากวิธี Stöber แล้ว dye-doped silica nanoparticles ยังสามารถเตรียมได้จากการไฮโดรไลซ์ TEOS ในรีเวอร์สไมเซลล์ หรือ water-in-oil (w/o) microemulsion system โดยส่วนผสมของน้ำ น้ำมันและโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) จะรวมตัวกันเป็นเนื้อเดียว (homogeneous mixture) ในระบบของไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน หยคน้ำจะเสถียรเนื่องจากโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวและยังคงกระจายอยู่ในส่วนของน้ำมัน การเกิด nucleation จะถูกควบคุมจากขนาดของหยคน้ำในระบบไมโครอิมัลชัน และโมเลกุลของสีจะถูก encapsulate เข้าไปใน silica network ทำให้เกิดการสร้าง monodisperse dye-doped silica nanoparticles

โมเลกุลของสีที่มีประจุบวกจะถูกใช้ในระบบไมโครอิมัลชันเพื่อเพิ่มแรงไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลของสีและซิลิกาที่มีประจุลบ ดังนั้นโมเลกุลของสีจะติดอยู่ภายในซิลิกาแมทริกซ์ สีที่ละลายน้ำได้ เช่น ruthenium complexes สามารถที่จะ encapsulated ไปในอนุภาคนาโนได้โดยง่าย การรั่วไหลของสีจากอนุภาคนาโนซิลิกาจะเกิดได้เล็กน้อย เนื่องจากแรงไฟฟ้าสถิตที่แข็งแรงระหว่างประจุบวกของสีกับประจุลบของซิลิกา ข้อได้เปรียบของระบบไมโครอิมัลชัน คือ สามารถสร้างอนุภาคนาโนที่มีรูปร่างแบบ spherical และ monodisperse ได้หลายขนาด

2.4.1.3 วิธีไมโครอิมัลชัน (Microemulsion method)

ไมโครอิมัลชันเป็นหยดของเหลวเล็กๆ ชนิดหนึ่ง ที่มีขนาดตั้งแต่ 10-200 นาโนเมตร กระจายอยู่ในตัวกลางของเหลวที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (immiscible liquid) เนื่องจากความแตกต่างของแรงตึงผิวของของเหลวทั้งสองซึ่งมีค่าต่างกันมาก หยดเล็กๆ ที่กระจายตัวอยู่นั้นเรียกว่าวัฏภาคภายใน (internal phase) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าวัฏภาคตัวกระจาย (dispersed phase) ส่วนของเหลวที่เป็นตัวกลางนั้นเรียกว่าวัฏภาคภายนอก (external phase) หรือวัฏภาคตัวกลาง (medium phase) [77, 78]

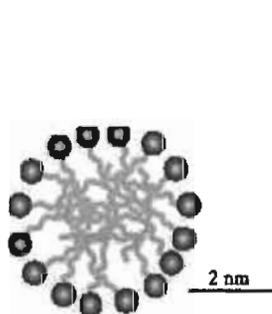
ไมโครอิมัลชันมีลักษณะโปร่งใส เนื่องจากอนุภาคของวัฏภาคภายในมีขนาดเล็กมากประมาณหนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ จึงไม่หักเหหรือกระจายแสงเมื่อแสงทะลุผ่านทำให้มองเห็นใส และสามารถคงตัวอยู่ได้ในตัวกลางโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิว การที่ไมโครอิมัลชันเกิดขึ้นได้ในระบบเนื่องมาจากสารลดแรงตึงผิวที่เติมลงไป จะไปลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวทั้งสองชนิดทำให้ระบบมีแรงตึงระหว่างผิว (interfacial tension) เกิดขึ้นระหว่างของเหลวตัวกลางและหยดของเหลว

การแบ่งชนิดของไมโครอิมัลชัน

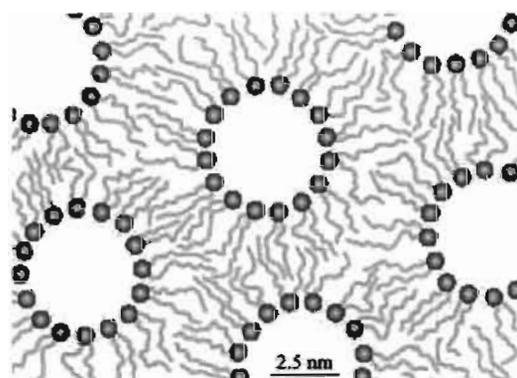
โดยทั่วไปไมโครอิมัลชันระหว่างน้ำกับน้ำมันสามารถจำแนกประเภทได้ดังตารางที่ 2.8 และมีลักษณะโครงสร้างอย่างง่ายของไมโครอิมัลชันแบบต่างๆ แสดงในรูปที่ 2.8 และ 2.9

ตารางที่ 2.8 ประเภทของไมโครอิมัลชันระหว่างน้ำกับน้ำมัน

ประเภท	วิฤภาคตัวกระจาย	ตัวกลาง
o/w	หยดน้ำมัน	น้ำ
w/o	หยดน้ำ	น้ำมัน
w/o/w	หยดน้ำมันที่กระจายอยู่ในน้ำและในหยดน้ำมันก็มีหยดน้ำเล็กๆ กระจายอยู่อีกต่อหนึ่ง	

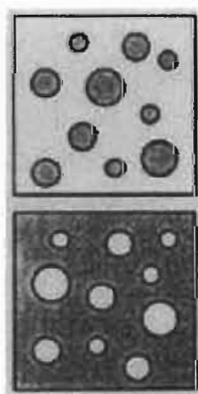


(ก) o/w microemulsion

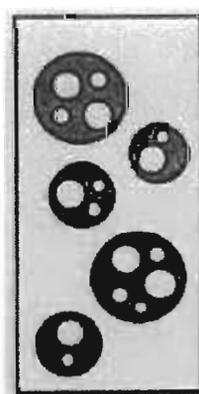


(ข) w/o microemulsion

รูปที่ 2.8 โครงสร้างอย่างง่ายของไมโครอิมัลชัน (ก) แบบ o/w และ (ข) แบบ w/o



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.9 ลักษณะของไมโครอิมัลชัน (ก) แบบสองวิฤภาค และ (ข) แบบหลายวิฤภาค

กลไกการเกิดไมโครอิมัลชัน

โดยทั่วไปของเหลวทุกชนิดจะมีแรงตึงผิวบริเวณผิว เมื่อนำของเหลวสองชนิดที่ไม่สามารถละลายซึ่งกันและกันมาเข้าจะเกิดการรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ของเหลวที่ได้เรียกว่า อิมัลชัน จากหลักการทางอุณหพลศาสตร์อธิบายว่าการเข้าเป็นการเพิ่มพลังงานอิสระที่พื้นผิว ของเหลวจึงรวมตัวกันได้

ขณะหนึ่ง แต่สภาวะที่เกิดขึ้นนั้นไม่คงสภาพ เมื่อหยุดเขย่าระบบจะพยายามลดพื้นที่ผิวให้มีค่าน้อยที่สุด โดยเกิดการรวมตัวให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดการแยกชั้น ของเหลวชนิดใดที่มีความถ่วงจำเพาะหรือความหนาแน่นต่ำก็จะลอยอยู่ส่วนบน และของเหลวที่มีความถ่วงจำเพาะสูงก็จะแยกตัวอยู่ส่วนล่าง

ถ้าเติมของเหลวชนิดหนึ่งปริมาณน้อยๆ ลงไปยังของเหลวตัวกลางอีกชนิดหนึ่ง โดยของเหลวทั้งสองชนิดนี้ไม่ละลายซึ่งกันและกัน และภายในของเหลวตัวกลางมีสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นต่ำ เมื่อทำการเขย่าให้ผสมกัน ของเหลวที่มีปริมาณน้อยเท่านั้นจะแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ กระจายตัวอยู่ในของเหลวตัวกลางและจะคงอยู่ในตัวกลางได้นาน เนื่องจาก โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเข้าไปเกาะเป็นฟิล์มล้อมรอบอนุภาคของเหลว เป็นผลให้อนุภาคของเหลวสามารถแทรกตัวอยู่ในตัวกลางได้นาน ทำให้ระบบประกอบด้วยสองวัฏภาค คือ วัฏภาคของหยดของเหลวขนาดเล็กๆ ที่กระจายตัวและวัฏภาคของเหลวตัวกลางรวมเรียกว่า ไมโครอิมัลชัน

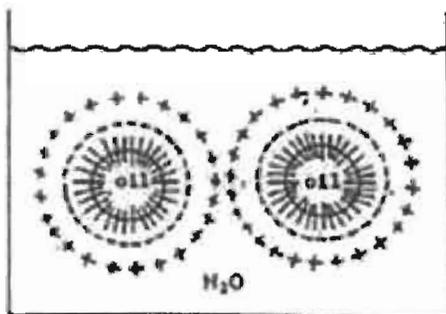
กลไกการเกิดไมโครอิมัลชัน อาจแบ่งได้เป็นสองขั้นตอนดังนี้ [78]

ขั้นตอนแรก เป็นการทำให้ของเหลวชนิดหนึ่งที่มีปริมาณน้อยๆ แตกตัวเป็นหยดเล็กๆ ที่เรียกว่า วัฏภาคภายในกระจายตัวในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่จัดเป็นวัฏภาคภายนอก โดยอาศัยการให้พลังงานซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของความร้อน การคนหรือการเขย่าแรงๆ การสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง เป็นต้น

ขั้นตอนที่สอง เป็นการทำให้หยดเล็กๆ ที่กระจายตัวอยู่ในของเหลววัฏภาคภายนอกนั้นคงตัวอยู่ได้นาน ซึ่งทำได้โดยอาศัยสารลดแรงตึงผิวทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวของของเหลวทั้งสอง เพื่อลดพลังงานอิสระของพื้นผิวทำให้โอกาสที่หยดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในซึ่งกระจายตัวอยู่นั้นรวมตัวกันได้น้อยลง เป็นการเพิ่มความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ นอกจากนั้นการทำให้เกิดฟิล์มที่แข็งแรงและยืดหยุ่นได้รอบๆ หยดของของเหลวก็เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่ช่วยให้หยดของของเหลวคงตัวอยู่ได้ โดยที่ลักษณะของการเรียงตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวจะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการเตรียมไมโครอิมัลชัน

การเกิดฟิล์มรอบหยดไมโครอิมัลชันแบบ o/w อาจเนื่องมาจากการเรียงตัวเป็นฟิล์มโมเลกุลเดี่ยว (monomolecular films) โดยมักจะเกิดจากการใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นอิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) หรือแบบฟิล์มหลายโมเลกุล (multimolecular film) ซึ่งเกิดจากการใช้สารลดแรงตึงผิวที่ชอบน้ำ (hydrophilic surfactant) เป็นอิมัลซิฟายเออร์ หรือมีแบบฟิล์มอนุภาคของแข็ง (solid particle film) ซึ่งเกิดจากการดูดซับของแข็งเล็กละเอียดบางชนิดที่ผิวของวัฏภาคทั้งสอง

นอกจากนั้นการเกิดฟิล์มรอบหยดน้ำมัน ยังอาจเกิดจากชั้นซ้อนของประจุ (electrical double layer) ของกลุ่มที่มีประจุ (electrically charged groups) ที่อยู่รอบๆ ผิวของหยดตัวภาคภายในที่เกิดจากการแตกตัวเมื่อละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งสามารถอธิบายกลไกของไมโครอิมัลชันชนิด o/w ได้ดี ดังตัวอย่างแสดงในรูปที่ 2.10 ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดจากไอออนเหล่านี้จะดึงดูดและผลักรัน ทำให้หยดน้ำมันไม่มีโอกาสเข้าใกล้กันและไม่สามารถเกิดการรวมตัวกันได้



รูปที่ 2.10 ลักษณะการเรียงตัวของฟิล์มที่หุ้มรอบหยดน้ำมันของอิมัลชันฟายเออร์ชนิดประจุลบ

อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวต่อความคงตัวของไมโครอิมัลชัน

สารลดแรงตึงผิวเป็นสารที่เติมลงไปในระบบอิมัลชันเพื่อช่วยให้อิมัลชันมีสภาพคงตัวมากขึ้น โดยเป็นสารที่มีโครงสร้างของโมเลกุลแบบแอมฟิพาติก (amphipathic structure) ซึ่งในแต่ละโมเลกุลจะประกอบด้วยสองส่วน [79]

ส่วนแรกจะเป็นหมู่ที่มีแรงดึงดูดน้อยกับตัวทำละลายหรือเป็นหมู่ที่ไม่ชอบตัวทำละลาย (lyophobic group) ในกรณีที่ระบบมีตัวทำละลายเป็นน้ำจะเรียกชื่อหมู่เหล่านี้ว่าหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) โดยหมู่ที่ไม่ชอบน้ำนี้ส่วนใหญ่จะเป็นหมู่ของพวกไฮโดรคาร์บอนสายยาว ซึ่งอาจเป็นแบบสายโซ่ตรงหรือเป็นแบบกิ่งก็ได้

สำหรับส่วนที่สองของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวจะเป็นหมู่ที่เกิดแรงดึงดูดกับตัวทำละลายได้ดีหรือเรียกว่าเป็นหมู่ที่ชอบตัวทำละลาย (lyophilic group) สำหรับระบบที่ตัวทำละลายเป็นน้ำ จะเรียกชื่อหมู่เหล่านี้ว่าหมู่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นหมู่ไอออน (ionic group) หรือหมู่ที่มีสภาพขั้วสูง (highly polar group) โดยไอออนเหล่านี้จะมีค่าแอฟฟินิตี (affinity) สูงมากกับน้ำทำให้เกิดแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตยกับโมเลกุลของน้ำเป็นแบบไอออน-ไดโพล (ion-dipole) ทำให้มีส่วนที่เป็นสายไฮโดรคาร์บอนเข้ามาอยู่ในสารละลายได้

สารลดแรงตึงผิวมีหลายชนิด โดยจะมีโครงสร้างทางเคมีของส่วนที่ไม่ชอบตัวทำละลายและส่วนที่ชอบตัวทำละลายในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวนั้นแตกต่างกัน ดังนั้นในการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้จึงขึ้นอยู่กับธรรมชาติตัวทำละลายและสภาวะที่ใช้

การแบ่งประเภทของสารลดแรงตึงผิวโดยทั่วไปจะแบ่งตามสภาพการเป็นสารลดแรงตึงผิวเมื่อเกิดการละลายในน้ำได้เป็นดังนี้ [80]

1. สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ (anionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้เมื่อแตกตัวในน้ำ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของสารจะแสดงประจุลบและมักจะละลายน้ำได้

2. สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก (cationic surfactant) สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้เมื่อแตกตัวในน้ำให้ประจุบวก โดยมีส่วนที่มีประจุบวกของโมเลกุลของสารแสดงอำนาจเป็นสารลดแรงตึงผิว

3. สารลดแรงตึงผิวชนิดแอมโฟเทอริก (amphoteric surfactant) สารลดแรงตึงผิวประเภทนี้ในสูตรโครงสร้างมีทั้งหมู่ฟังก์ชันกรดและหมู่ฟังก์ชันเบส เมื่อละลายในน้ำจะแตกตัวให้ประจุบวกหรือประจุลบขึ้นกับสภาวะของความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย กล่าวคือ ถ้า pH สูงจะเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบประจุลบ แต่ที่ pH ต่ำจะเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบประจุบวก ดังนั้นโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้จึงขึ้นกับสภาวะความเป็นกรด-ด่างของระบบด้วย

4. สารลดแรงตึงผิวชนิดนอนไอออนิก (non-ionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวประเภทนี้ไม่มีประจุเมื่อละลายน้ำจะไม่แสดงประจุ โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้จะประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำในอัตราส่วนต่างๆ กัน ทำให้มีอำนาจในการละลายน้ำต่างกันและจะถูกกำหนดด้วยค่า HLB (hydrophilic lipophilic balance) ซึ่งจะใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการละลายน้ำของสาร ถ้ามีค่า HLB ต่ำจะละลายน้ำได้น้อยแต่ละลายได้ดีในน้ำมัน ในทางตรงกันข้ามหากมีค่า HLB สูงแสดงว่าสามารถละลายได้ดีในน้ำในขณะที่ละลายได้น้อยในน้ำมัน ซึ่งตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ แสดงไว้ในตารางที่ 2.9

สมบัติประการสำคัญของสารลดแรงตึงผิวประการหนึ่งคือการเกิดเป็นไมเซลล์ (micelle formation หรือ micellization) ที่เกิดขึ้นได้เนื่องจากการที่สารลดแรงตึงผิวจัดตัวเอง โดยหันเอาส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกจากน้ำ และละลายกันและกันเกิดเป็นโครงสร้างใหม่เรียกว่าไมเซลล์ (micelle) ที่มีรูปร่างแตกต่างกันไป สารลดแรงตึงผิวที่ละลายอยู่ในน้ำจะมีพฤติกรรมต่างๆ ขึ้นอยู่กับช่วงความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวนั้น สารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นต่ำๆ การเกิดเป็นไมเซลล์ยังไม่เกิดขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมีจำนวนน้อย จนกระทั่งความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจำนวนโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วยและโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวก็จะเคลื่อนที่เข้าใกล้กันได้มากขึ้น

ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวประเภทต่างๆ [80]

ประเภท	ชื่อ	สูตรโมเลกุล	
ไอออนลบ	Soap	RCOO^-Na^+	$\text{R}=\text{C}_{11-23}$
	Alkyl sulfates	$\text{RSO}_4^-\text{Na}^+$	$\text{R}=\text{C}_{12-18}$
	Alkylbenzene sulfonate	$\text{RC}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$	$\text{R}=\text{C}_{10-13}$
	Lactylates	$\text{RCO}(\text{OCHCH}_3\text{CO})_x\text{O}^-\text{Na}^+$	$\text{R}=\text{C}_{10-13}$
	Ethoxylated alkyl sulfates	$\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$	$\text{R}=\text{C}_{12-18}$
ไอออนบวก	Quaternary ammonium chloride	$\text{RN}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	$\text{R}=\text{C}_{10-13}$
	Amidoamines	$\text{RCONH}(\text{CH}_2)_n\text{NR}_1\text{R}_2$	$\text{R}_1\text{R}_2=\text{C}_{1-2}$
	Ethoxylated amines	$\text{RN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_y\text{H}$	$\text{R}=\text{C}_{12-18}$
	Alkylamine hydrochloride	RN^+HCl^-	$\text{R}=\text{C}_{12-18}$
แอมโฟเทอริก	Alkylamino acid	$\text{RN}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	
	Sulfobetaine	$\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	
นอนไอออนิก	Polyoxyethylenated alkylphenol	$\text{RC}_6\text{H}_4(\text{OC}_2\text{H}_4)_6\text{OH}$	$\text{R}=\text{C}_{8-20}$
	Alkylphenolpolyethylene glycol ether	$\text{RC}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8\text{H}$	$\text{R}=\text{C}_{12-18}$

เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้นเพียงพอสำหรับเกิดเป็นไมเซลล์ ส่วนที่มีหัวของสารลดแรงตึงผิวแต่ละโมเลกุลจะเกิดการผลักกัน ในขณะที่ส่วนที่ไม่มีหัวในแต่ละโมเลกุลจะเกิดการดึงดูดมาใกล้กันด้วยแรงไดโพลและเกิดการละลายซึ่งกันและกันได้ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์ขึ้น ความเข้มข้นนี้เรียกว่า ความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ (critical micelle concentration)

ในการเตรียมไมโครอิมัลชันจะต้องเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวให้เหมาะสม โดยคำนึงถึงสมบัติและปริมาณที่ใช้ให้เหมาะสม เพื่อให้ไมโครอิมัลชันนั้นคงสภาพอยู่ได้นาน สำหรับไมโครอิมัลชันชนิด o/w ฟิล์มที่อยู่รอบๆ หยคน้ำมันที่เกิดจากไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวจะมีประจุไฟฟ้า ดังนั้นปริมาณของกลุ่มที่มีประจุจะต้องมากพอเพื่อให้เกิดการผลักกันของหยคน้ำมันที่ถูกห่อหุ้มไว้และส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวก็ต้องจับกันด้วยแรงที่มากพอเพื่อทำให้ฟิล์มเกิดความแข็งแรง ซึ่งหากส่วนที่ไม่ชอบน้ำเป็นแบบสายโซ่ตรงอิ่มตัว (saturated straight chain) จะทำให้ฟิล์มที่ได้แข็งแรงและไมโครอิมัลชันจะคงตัวได้ดี

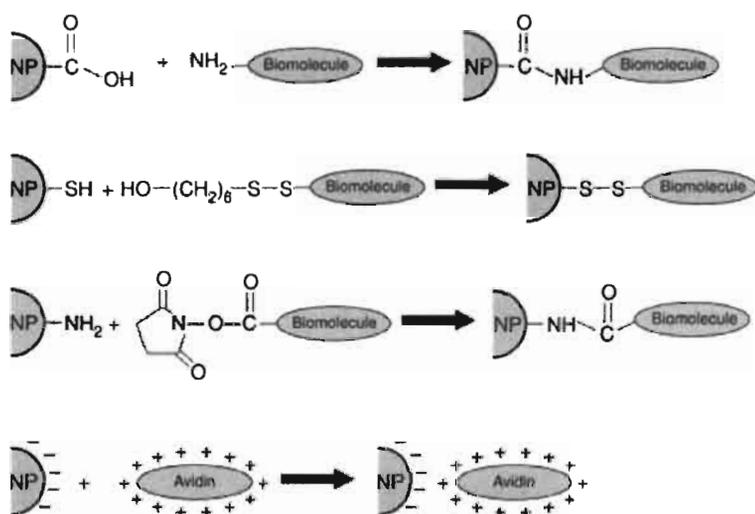
นอกจากนี้การละลายของสารลดแรงตึงผิวก็มีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน โดยสารลดแรงตึงผิวที่ดีควรจะละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมันอย่างสมดุลกัน ซึ่งหากละลายในน้ำได้มากเกินไปจะทำให้เกิดไมเซลล์ในน้ำได้ดี ดังนั้นจะไม่มีฟิล์มห่อหุ้มรอบหยดน้ำมัน ทำให้หยดน้ำมันรวมตัวกันและเกิดการแยกชั้นขึ้น นอกจากนี้ถ้าสารลดแรงตึงผิวละลายได้ในน้ำมันและน้ำเท่าๆ กันก็จะเกิดไมเซลล์ในแต่ละวัฏภาคได้จึงไม่มีฟิล์มมาหุ้มวัฏภาคภายในทำให้ไมโครอิมัลชันไม่มีความคงตัว

กรณีของไมโครอิมัลชันชนิด w/o ฟิล์มที่เกิดรอบหยดน้ำไม่จำเป็นต้องมีประจุไฟฟ้า แต่สารลดแรงตึงผิวจะต้องมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างผิวของน้ำและน้ำมันได้มาก อีกทั้งต้องละลายได้ดีในน้ำมันจึงจะทำให้ไมโครอิมัลชันคงสภาพอยู่ได้ดี ของผสมระหว่างของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายซึ่งกันและกันโดยมีสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ด้วย จะทำให้ค่าแรงตึงผิวของของเหลวทั้งสองชนิดนั้นลดลงและมีค่าอยู่ระหว่างแรงตึงผิวของของเหลวทั้งสอง

2.4.2 การดัดแปลงพื้นระเคมีและติดฉลากที่ผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา (Surface modification and bioconjugation)

dye-doped silica nanoparticles มักจะเชื่อมต่อกับ biorecognition elements เช่น แอนติบอดี และ ดีเอ็นเอ โดยการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่าง biorecognition elements กับผิวของอนุภาค จึงจำเป็นต้องมีการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคให้เกิดหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ต่างๆ ที่สนใจ โดยทั่วไปจะใช้การเติม alkoxysilane reagent เช่น carboxyethylsilanetriol เพื่อทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล หรือ 3-aminopropyltriethoxysilane สำหรับหมู่เอมีน หรือ 3-mercaptopropyltrimethoxysilane สำหรับหมู่ไธออล [81, 82]

นอกจากนั้นการทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่ผิวอนุภาคโดยการ post-coating ด้วยสารประกอบ organosilane ที่มีหมู่เอมีนจะทำให้ประจุลบบนผิวของอนุภาคนาโนเป็นกลาง เป็นการลดประจุสุทธิบนผิวของอนุภาคนาโน ทำให้ความคงตัวของคอลลอยด์ลดลงและเกิดการรวมตัวเกาะกลุ่มกันของอนุภาคอย่างรุนแรงในของเหลว เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้จะใช้สารประกอบ organosilane ที่มีประจุลบเฉื่อย เช่น phosphonate เป็น stabilization reagents ช่วยส่งเสริมการกระจายตัวของอนุภาคระหว่างการทำ post-coating [83]



รูปที่ 2.11 วิธีที่นิยมใช้ในติดฉลากสารชีวโมเลกุลบนผิวของอนุภาคนาโน [68]

หลังจากอนุภาคนาโนถูกดัดแปลงด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ แล้ว พวกมันจะทำหน้าที่เป็น โครง (scaffold) สำหรับการติดฉลากด้วยสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน เอนไซม์ สารกัมมันตรังสี สารเรืองแสง แอนติบอดี และดีเอ็นเอ เป็นต้น (รูปที่ 2.11) โดยอาศัยการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันบนผิวของอนุภาคกับสารชีวโมเลกุลที่สนใจ ตัวอย่างเช่น อนุภาคนาโนที่ถูกดัดแปลงด้วยหมู่คาร์บอกซิลจะมีกรดคาร์บอกซิลิกติดอยู่ที่ผิวรอบนอก ทำให้เหมาะสมสำหรับการสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนและโมเลกุลชีวภาพที่มีหมู่เอมีน หรือ การดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคแบบไดซัลไฟด์ทำให้สามารถตรึงโปรตีนบนผิวอนุภาคนาโนที่มีหมู่ไซออลได้ โดยการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ [68, 82]

2.4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของอนุภาคนาโน (Nanoparticle characterization)

การวิเคราะห์คุณสมบัติของอนุภาคนาโนเป็นสิ่งที่สำคัญ สามารถใช้อธิบายกลไกของการเกิดอนุภาคนาโนและใช้เป็นข้อมูลในการสังเคราะห์ครั้งต่อไปได้ การวัดค่าของอนุภาคนาโนจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติ photostability, surface properties ขนาด และลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) โดยทั่วไปการวิเคราะห์อนุภาคจะรวมถึงขนาด ประจุผิว หมู่ฟังก์ชันที่ผิว และคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของอนุภาค

ในการวิเคราะห์สมบัติของอนุภาคนาโนนั้น จะต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ทางด้านนาโนเทคโนโลยี โดยเฉพาะ จึงจะสามารถวิเคราะห์รายละเอียดของอนุภาคนาโนได้ ซึ่งอุปกรณ์เหล่านั้นก็จะมีเทคนิคที่แตกต่างกันออกไปตามความสามารถในการวิเคราะห์ของแต่ละเครื่อง โดยเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์วัสดุนาโน ได้แก่

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron Microscope: EM)
- การวิเคราะห์ปริมาณธาตุด้วยเทคนิค EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Spectrofluorometer)

2.4.3.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron Microscope: EM)

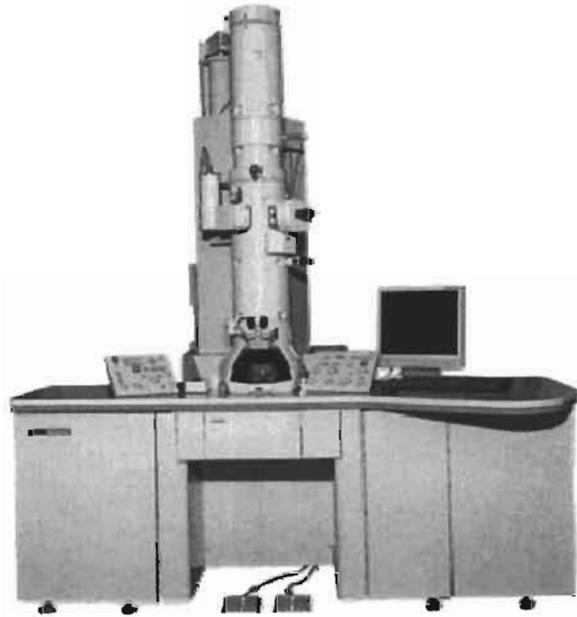
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนพลังงานสูงในการตรวจสอบวัตถุแทนแสงธรรมดา เนื่องจากความยาวคลื่นของลำอนุภาคอิเล็กตรอนนั้นสั้นกว่าความยาวคลื่นแสงถึง 100,000 เท่า ทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถให้ประสิทธิภาพของกำลังขยายและการแจกแจงรายละเอียดได้เหนือกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยสามารถแยกรายละเอียดของวัตถุที่เล็กขนาด 10 อังสตรอม หรือ 0.1 นาโนเมตร (กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจะแจกแจงรายละเอียดได้ประมาณ 0.2 ไมโครเมตร) จึงทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีกำลังขยายสูงมากถึง 500,000 เท่า [84] โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมี 2 ชนิด คือ

- (1) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM)
- (2) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM)

TEM เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบาง ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ การสร้างภาพจากกล้องประเภทนี้จะทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่าง [85]

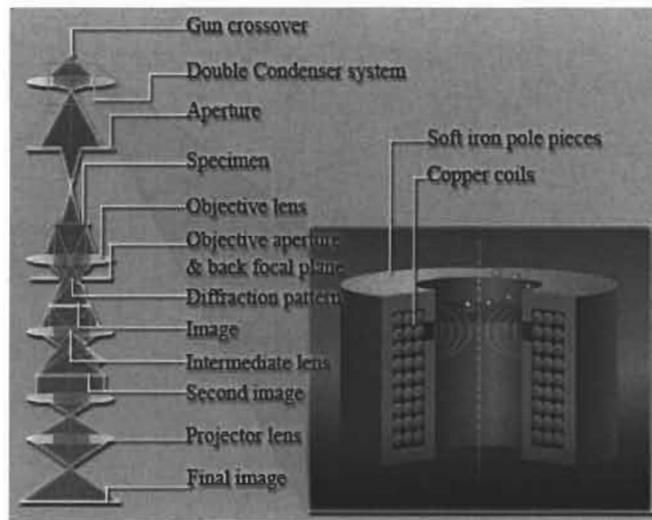
เครื่อง TEM เหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีกำลังขยายและประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมาก (0.1 นาโนเมตร)



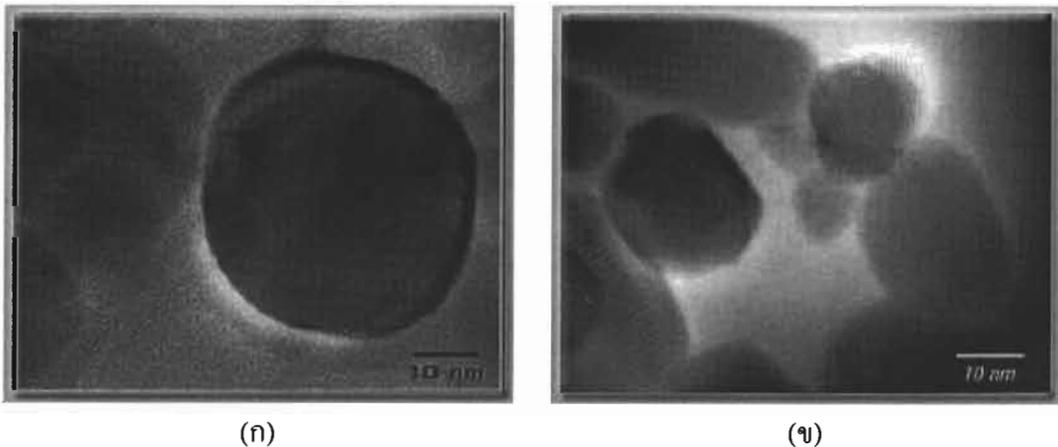
รูปที่ 2.12 เครื่อง Transmission Electron Microscope (TEM) [85]

หลักการการทำงานของเครื่อง TEM

TEM ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์แม่เหล็ก เพื่อให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ จากนั้นลำอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านตัวอย่างที่จะศึกษา (specimen) ไป ซึ่งตัวอย่างที่จะศึกษาจะต้องมีลักษณะที่บางมากหรือเป็นอนุภาคขนาดเล็ก (บ่อยครั้งที่พบว่าอยู่ในช่วงระหว่าง 1 - 100 นาโนเมตร) จากนั้นจะเกิดการกระเจิงอนุภาคขึ้นเมื่ออิเล็กตรอนทะลุผ่านตัวอย่างไป และอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่างนี้ก็จะถูกปรับ โฟกัสของภาพโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ซึ่งเป็นเลนส์ที่ทำหน้าที่ขยายภาพให้ได้รายละเอียดมากที่สุด จากนั้นจะได้รับการขยายด้วยเลนส์ทอดภาพไปสู่จอรับ (projector lens) และปรับ โฟกัสของลำอนุภาคอิเล็กตรอนให้ยาวพอดีที่จะปรากฏบนฉากเรืองแสง สุดท้ายจะเกิดการสร้างภาพขึ้นมาได้



รูปที่ 2.13 ส่วนประกอบและการทำงานของเครื่อง TEM [85]



(ก)

(ข)

รูปที่ 2.14 โครงสร้างนาโนที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่อง TEM [85]

(ก) อนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และ

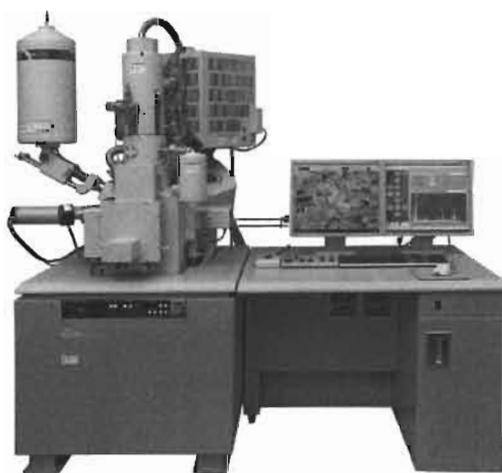
(ข) อนุภาคนาโนออกไซด์ของสังกะสีหรือซิงค์ออกไซด์ (ZnO)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

SEM เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายไม่สูงเท่ากับเครื่อง TEM (เครื่อง SEM มีกำลังขยายสูงสุดประมาณ 10 นาโนเมตร) การเตรียมตัวอย่างเพื่อที่จะดูด้วยเครื่อง SEM นี้ทำได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างสำหรับ TEM เนื่องจากการสร้างภาพของ SEM ทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากพื้นผิวหน้าของตัวอย่างที่ทำการสำรวจ ซึ่งภาพที่ได้จากเครื่อง SEM นี้จะเป็นภาพลักษณะเชิง 3 มิติ ทำให้สามารถเห็นรายละเอียดของภาพได้ดีกว่า TEM [86]

ดังนั้นเครื่อง SEM จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ หน้าตัดของ โลหะและวัสดุ เป็นต้น

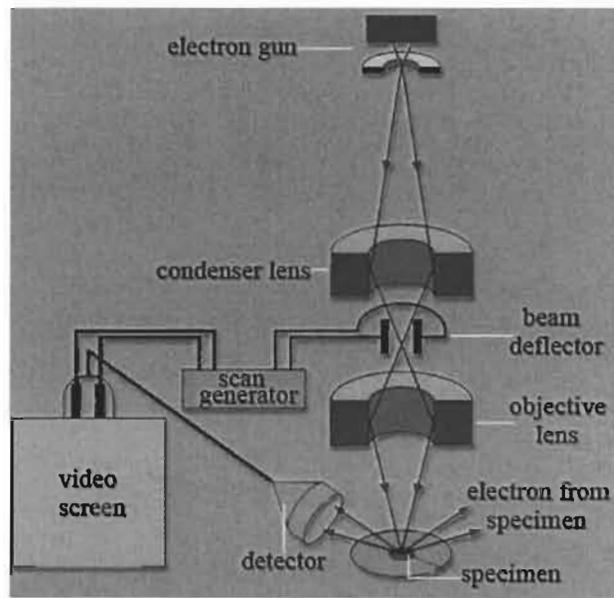
ข้อดีของเครื่อง SEM เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่อง TEM คือ ภาพโครงสร้างที่เห็นจากเครื่อง SEM จะเป็นภาพลักษณะ 3 มิติ ในขณะที่ภาพจากเครื่อง TEM จะให้ภาพลักษณะ 2 มิติ อีกทั้งวิธีการใช้งานเครื่อง SEM จะมีความรวดเร็วและใช้งานง่ายกว่าเครื่อง TEM มาก



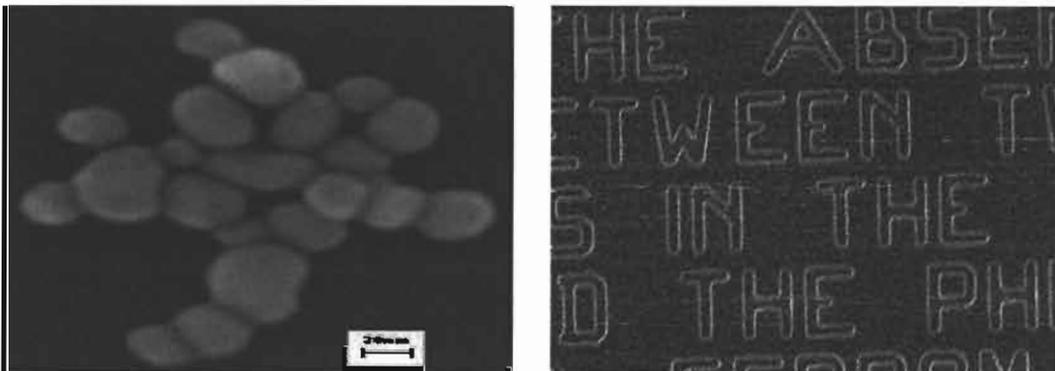
รูปที่ 2.15 เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) [86]

หลักการการทำงานของเครื่อง SEM

จะประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์แม่เหล็ก เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ หากต้องการภาพที่มีความคมชัดจะปรับให้ลำอิเล็กตรอนมีขนาดเล็ก หลังจากนั้นลำอิเล็กตรอนจะถูกปรับระยะ โฟกัส โดยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ลงไปบนผิวชิ้นงานที่ต้องการศึกษา หลังจากลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนชิ้นงานจะทำให้เกิดอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (secondary electron) ขึ้น ซึ่งสัญญาณจากอิเล็กตรอนทุติยภูมินี้จะถูกบันทึกและแปลงไปเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์ จากนั้นจะถูกนำไปสร้างเป็นภาพบนจอโทรทัศน์ต่อไป โดยสามารถบันทึกภาพจากหน้าจอโทรทัศน์ได้เลย



รูปที่ 2.16 ส่วนประกอบและการทำงานของเครื่อง SEM [86]



(ก)

(ข)

รูปที่ 2.17 โครงสร้างนาโนที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่อง SEM [86]

(ก) อนุภาคนาโนคอลลอยด์ของทองคำ

(ข) ตัวอักษรที่ใช้วิธีการ EBL เขียน (ตัวอักษรสูง 150 นาโนเมตร)

2.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุด้วยเทคนิค EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)

การวิเคราะห์ธาตุโดยอาศัยหลักการ EDS เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์แบบไม่ทำลายตัวอย่าง (Non-destructive analysis) สามารถนำมาใช้วิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ในตัวอย่างทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) สามารถทำการวิเคราะห์ธาตุได้ที่ละธาตุหรือหลายๆ ธาตุพร้อมๆ กัน ตั้งแต่คาร์บอนถึงยูเรเนียม นอกจากนั้นยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ในสถานะของแข็ง ของเหลว หรือผง สภาวะการทดสอบสามารถทำได้ทั้งในบรรยากาศปกติ สุญญากาศ และแก๊สเฉื่อย [87]



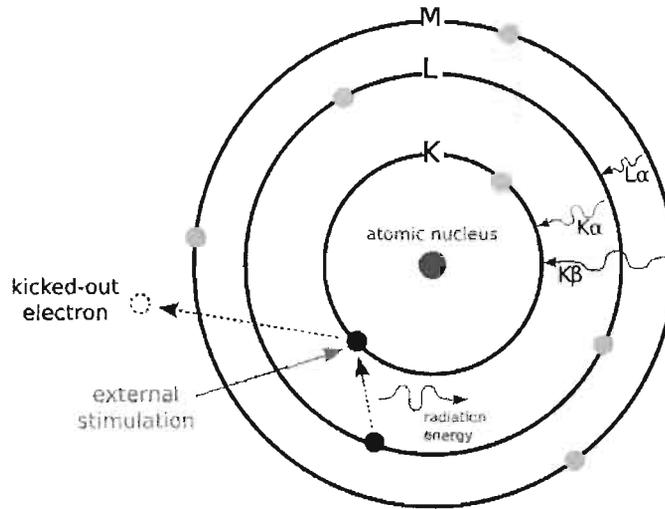
รูปที่ 2.18 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุ [88]

โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบัน มีการพัฒนาอุปกรณ์วิเคราะห์ โปรแกรมของระบบวิเคราะห์ และคอมพิวเตอร์ ให้สะดวกในการใช้งาน ทำให้สามารถวิเคราะห์ชิ้นงานที่ให้สเปกตรัมซับซ้อนได้อย่างรวดเร็ว และถูกต้อง จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นที่นิยมทั้งในด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ ธรณีวิทยา สิ่งแวดล้อม และการเกษตร

รังสีเอกซ์เกิดจากสภาวะการเปลี่ยนระดับพลังงานของอะตอม ทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากการสลายตัวของสารกัมมันตรังสี และที่มนุษย์ผลิตขึ้นจากกลไกทางอิเล็กทรอนิกส์ รังสีเอกซ์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

- (1) รังสีเอกซ์เฉพาะตัว (Characteristic X-ray) มีลักษณะเป็นรังสีเอกซ์ที่มีพลังงานเดี่ยว (monochromatic) เพราะเกิดจากการลดระดับพลังงานที่แน่นอน
- (2) รังสีเอกซ์ต่อเนื่อง (Continuous X-ray) มีลักษณะเป็นรังสีเอกซ์ที่มีพลังงานต่อเนื่อง กระจายจากค่าต่ำสุดถึงค่าสูงสุด บางครั้งเรียกว่า polychromatic หรือ white X-ray

ระบบ EDS จะวัดเฉพาะพลังงานของรังสีเอกซ์เฉพาะตัว ที่เกิดจากอิเล็กตรอนปฐมภูมิซึ่งมีพลังงานสูงพอที่จะพุ่งชน อิเล็กตรอนที่อยู่ในวงโคจรที่ใกล้นิวเคลียสแล้วหลุดออกจากวงโคจร ทำให้เกิดที่ว่างในวงโคจรนั้น อิเล็กตรอนในวงโคจรถัดไป (วงนอก) ซึ่งมีพลังงานสูงกว่าจะกระโดดเข้ามาแทนที่ พร้อมทั้งปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาในรูปรังสีเอกซ์ ธาตุแต่ละธาตุจะปล่อยรังสีออกมาในรูปรังสีเอกซ์ และธาตุแต่ละธาตุจะปล่อยรังสีเอกซ์ออกมามีระดับพลังงานที่มีลักษณะเฉพาะตัวที่ไม่ซ้ำกับธาตุอื่น ทำให้สามารถทราบชนิดของธาตุได้อย่างแม่นยำ โดยพิจารณาค่าพลังงานของรังสีเอกซ์ ซึ่งระบบการวิเคราะห์ธาตุด้วยรังสีเอกซ์แบบ EDS นี้สามารถวิเคราะห์ธาตุในตัวอย่างได้เพียงในเวลาไม่กี่วินาที



รูปที่ 2.19 การเกิดรังสีเอกซ์เฉพาะตัว [87]

การวิเคราะห์นี้มีข้อจำกัดตรงที่สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุที่ผิววัตถุความลึกไม่เกิน 1 ไมโครเมตรเท่านั้น และการเคลือบผิวของชิ้นงานตัวอย่างเพื่อป้องกันการเกิด charging ต้องไม่หนา มาก และวัสดุที่ใช้ในการเคลือบผิว (นิยมใช้คาร์บอน) และสัญญาณที่ได้จากวัสดุที่ใช้เคลือบผิว จะต้องไม่รบกวนสัญญาณที่ต้องการวิเคราะห์

2.4.3.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Spectrofluorometer)

Spectrofluorometer คือ เครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณการเรืองแสงซึ่งเปล่งออกมาจากตัวอย่าง การวัด ปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ถือเป็นการวัดที่เชื่อถือได้และมีความแม่นยำสูง จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้ในการ คำนวณปริมาณและตรวจวัดองค์ประกอบของสาร ซึ่งโดยทั่วไปการวัดปริมาณการเรืองแสงมักจะ ทำการวัดในโมเลกุลของสารอินทรีย์ [89]

การเรืองแสงได้กลายมาเป็นวิธีการที่จำเป็นในการอบรมวิจัยและการวิเคราะห์กันในช่วงกว้าง เช่น ด้าน ชีวโมเลกุลของเซลล์ พันธุศาสตร์ การประเมินคุณภาพด้านสิ่งแวดล้อม เกษษกรรม นิติวิทยาศาสตร์ วิทยาศาสตร์การอาหาร และการตรวจสอบอันตรายทางชีวภาพ เป็นต้น

เครื่อง Spectrofluorometer นั้น บางครั้งอาจเรียกได้หลายแบบ เช่น luminescence spectrometers, fluorimeters, fluorescence spectrometers หรือ spectrofluorometers



รูปที่ 2.20 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Spectrofluorometer) [89]

ฟลูออเรสเซนซ์

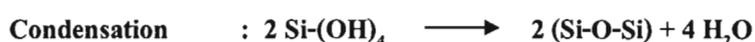
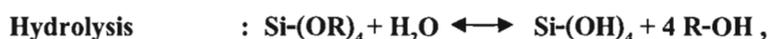
ฟลูออเรสเซนซ์ หรือการเรืองแสง เป็นคุณสมบัติทางกายภาพอย่างหนึ่งของอะตอมและโมเลกุล ซึ่งเป็นความสามารถของโมเลกุลในการดูดซับพลังงานแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่ง และจะปล่อยพลังงานแสงอีกค่าหนึ่งออกมาทันที ซึ่งโดยทั่วไปความยาวคลื่นแสงที่ปล่อยออกมาจะยาวกว่าความยาวคลื่นของแสงที่ใช้กระตุ้น ในสารประกอบแต่ละชนิดนั้น การเรืองแสงจะมีคุณลักษณะของความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (ความยาวคลื่นของแสงที่สารนั้นดูดซับ) และคุณลักษณะของความยาวคลื่นที่ปล่อยออกมา (ความยาวคลื่นของแสงที่ปล่อยออกมาเมื่อโมเลกุลผ่อนคลายตัวและกลับเข้าสู่สภาวะพื้น) แตกต่างกัน ซึ่งความยาวคลื่นทั้ง 2 ค่านี้ ก็คือคุณสมบัติการเรืองแสงของสารประกอบนั่นเอง

โดยเครื่อง Spectrofluorometer จะใช้ excitation monochromator (อุปกรณ์ซึ่งภายในประกอบไปด้วยองค์ประกอบสำหรับการกระจายความยาวคลื่นแสงออก ซึ่งตรงกันข้ามกันกับตัวกรอง) แทน excitation filter และ emission monochromator แทน emission filter และจะทำการวัดโดยการเปลี่ยน fixed slit บน monochromator

ประโยชน์ของเครื่อง spectrofluorometer คือ สามารถเลือกการใช้งานได้ที่ความยาวคลื่นหลายค่า การทำงานจึงสามารถตรวจสอบองค์ประกอบได้ในหลายความยาวคลื่น แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้ค่าใช้จ่ายในการทำงานมากกว่า filter fluorometer และมีความไวและความจำเพาะระดับปานกลางเท่านั้น นอกจากนี้ในเครื่องบางรุ่นอาจมี excitation monochromator หรือ emission monochromator เป็นแบบคู่ (dual) ซึ่งจะช่วยให้มีความไวมากขึ้น และลดการเบี่ยงเบนของแสงได้ดีขึ้น และสามารถนำข้อมูลที่ได้ออกมาจากการวัดเข้าสู่คอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลโดยทันทีได้ด้วย

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Stöber และคณะ [75] ได้รายงานวิธีในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาที่มีลักษณะกลม (spherical) และมีการกระจายตัวแบบเดี่ยว (monodisperse) จากสารละลายแอลกอฮอล์ของ silicon alkoxides ที่มีแอมโมเนียเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดตั้งแต่ 50 นาโนเมตร- 1 ไมโครเมตร โดยขนาดของอนุภาคจะขึ้นอยู่กับชนิดของ silicon alkoxide และแอลกอฮอล์ พบว่าอนุภาคที่เตรียมในสารละลายของเมธานอลจะมีขนาดเล็กที่สุด ขณะที่ขนาดของอนุภาคจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความยาวของสายแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) ทำให้มีการกระจายของขนาดอนุภาค (size distribution) ที่กว้าง ซึ่งปัจจัยหลักในการเกิดปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับ (ก) หมู่ silanol ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ข) siloxane bridges ที่เกิดจากการรวมตัว (condensation) ของปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชัน ดังนี้



Lian และคณะ [8] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70 นาโนเมตร ด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน โดยใช้ TEOS (Tetraethyl orthosilicate) เป็นสารตั้งต้น ผสมเข้าด้วยกันกับน้ำ cyclohexane Triton X-100 และ *n*-hexanol ภายใต้การเร่งปฏิกิริยาของ NH_4OH จากนั้นทำการตกตะกอนอนุภาคนาโนด้วย acetone นำไปปั่นเหวี่ยง และล้างด้วยเอทานอลประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารเคมีส่วนเกินบริเวณผิวของอนุภาคนาโนออก ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้อนุภาคนาโนซิลิกาที่เป็นผงซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในรูปของสารละลาย

Rao และคณะ [90] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกา โดยใช้ TEOS (Tetraethyl orthosilicate) เป็นสารตั้งต้นในสารละลายของเอทานอล และทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาค โดยการแปรผันความเข้มข้นของ TEOS ($0.012\text{-}0.12 \text{ mol L}^{-1}$) แอมโมเนีย ($2.8\text{-}28 \text{ mol L}^{-1}$) น้ำ ($3\text{-}14 \text{ mol L}^{-1}$) แอลกอฮอล์ ($1\text{-}8 \text{ mol L}^{-1}$) และอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา พบว่าอนุภาคนาโนซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 20-460 นาโนเมตร ทำให้สามารถกำหนดและควบคุมขนาดของอนุภาคที่ต้องการได้

Lee และคณะ [91] ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาชนิด core-shell ขนาด 1.5 ไมโครเมตร ที่ภายในมีสี FITC (fluorescein isothiocyanate) บรรจุอยู่ โดยอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและคอนเดนเซชันของ TEOS (tetraethyl orthosilicate) และเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิว SDS (sodium dodecyl sulfate) ลงไปในระบบ จะทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กลง (0.5-1 ไมโครเมตร) และมีการกระจายขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วงแคบ เนื่องจากโซเดียมไอออน (Na^+) จะทำหน้าที่ลดประจุบริเวณผิวของอนุภาค

ส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของ primary particles กลายเป็น secondary particles หลังจากนั้นจะนำอนุภาคที่ได้มาทำการตัดแปลงบริเวณผิวด้วย octadecanol เพื่อให้สามารถกระจายตัวได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าอนุภาคที่ผ่านการตัดแปลงพื้นผิวแล้วนั้นสามารถกระจายตัวได้ดีในคลอโรฟอร์ม และเปลี่ยนสภาพเป็นเจลเมื่ออยู่ใน hexadecane ที่อุณหภูมิห้อง

Santra และคณะ [92] ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาขนาด 135 นาโนเมตร ที่บรรจุสี FITC (fluorescein isothiocyanate) ไว้ภายในอนุภาคด้วยวิธี stöber โดยมี TEOS (tetraethyl orthosilicate) ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น และ NH_4OH ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเพื่อให้อนุภาคนาโนสามารถคงคุณสมบัติในการเป็นสารเรืองแสงได้นาน เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแล้ว จะเติม TEOS ลงไปทำปฏิกิริยาต่ออีก 24 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวชั้นนอกสุดของอนุภาคถูกปกคลุมด้วยซิลิกา จากนั้นนำไปตรวจสอบ % Bleaching พบว่าอนุภาคนาโนที่ปล่อยให้แห้งในอากาศ (dry state) มี % Bleaching สูงถึง 62% ส่วนอนุภาคนาโนที่ละลายใน DI water (solution state) มี % Bleaching เท่ากับ 38% ทั้งนี้เป็นผลมาจากการแพร่ของออกซิเจนผ่านผิวอนุภาคที่เป็นรูพรุนของซิลิกานั้นเอง ซึ่งในอากาศจะมีโมเลกุลของออกซิเจนมากกว่าใน DI water ทำให้เป็นข้อจำกัดของการนำอนุภาคนาโนที่มีสารเรืองแสงอยู่ภายในโมเลกุลไปประยุกต์ใช้ในสถานะ dry state

Nakamura และคณะ [93] ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาที่บรรจุสารเรืองแสงชนิดต่างๆ ไว้ภายในอนุภาค โดยการคอนจูเกต APTS (3-aminopropyl-triethoxysilane) เข้ากับโมเลกุลของสารเรืองแสง เช่น fluorescein, rhodamine, DY-495 ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับ TEOS (tetraethyl orthosilicate) และ NH_4OH ด้วยวิธี stöber พบว่าอนุภาคนาโนซิลิกาที่เตรียมด้วยวิธีนี้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 400 นาโนเมตร มีการกระจายขนาดของอนุภาคที่ดี ให้ความเข้มแสงสูง และสามารถคงคุณสมบัติในการเป็นสารเรืองแสงได้นาน นอกจากนั้นยังสามารถเตรียมได้ง่ายและไม่สิ้นเปลือง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจสอบเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยได้ทดลองฉีดอนุภาคเข้าไปในเซลล์ peritoneal ของหนูทดลอง หลังจากนั้นหนึ่งสัปดาห์นำเซลล์มาตรวจสอบรูปร่างและการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าเซลล์มีการเรืองแสงที่ดีและไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่ผิดปกติเกิดขึ้น

Santra และคณะ [94] ได้ทำการสังเคราะห์ luminophore-doped silica (LDS) nanoparticles ที่มีขนาด 63 ± 4 นาโนเมตร ด้วยวิธีไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน จากนั้นตัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคแล้วตรึงกับแอนติบอดีของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia cell) เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเซลล์ของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจสอบเซลล์ได้ง่าย ให้ผลชัดเจน และมีประสิทธิภาพสูง นอกจากนั้นวิธีนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบสารชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น โปรตีน, เอนไซม์, เพปไทด์ และดีเอ็นเอได้อีกด้วย

Tan และคณะ [7] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน ซึ่งภายในอนุภาคมีสารเรืองแสงเป็นพันๆ โมเลกุลบรรจุอยู่ ทำให้มีความเข้มแสงสูงและคงการเรืองแสงอยู่ได้นานเนื่องจากมีซิลิกาแมทริกซ์ห่อหุ้มเอาไว้ จากนั้นได้ทำการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนให้เกิดหมู่เอมีนแล้วตามด้วยหมู่คาร์บอกซิล เพื่อให้สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับแอนติบอดีของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ แล้วทำการตรวจสอบในตัวอย่างเนื้อวัวพบที่ใช้เวลาเพียง 20 นาทีเท่านั้นในการตรวจจับแบคทีเรียโดยวัดจากความเข้มแสงของสารเรืองแสงที่อยู่ภายในอนุภาคนาโน แต่มีข้อจำกัด คือ ปริมาณเชื้อในตัวอย่างอาหารจะต้องอยู่ในช่วง 1-400 เซลล์ และเชื้อจะต้องกระจายตัวออกจากกัน จึงจะได้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ นอกจากนั้นยังสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ได้โดยอาศัยหลักการเดียวกัน เช่น *Bacillus cereus*

Tan และคณะ [95, 96, 97] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาแบบ multicolored ด้วยวิธี Stöber โดยการแปรผันอัตราส่วนของสี่สามชนิด คือ R6G-SE, FAM-SE และ TMR-SE ซึ่งเมื่อกระตุ้นที่ความยาวคลื่นเดียวกันจะเกิดการเรืองแสงให้สีที่แตกต่างกัน 3 สี สำหรับใช้ตรวจสอบแบคทีเรียที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ 3 ชนิด คือ *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* ได้ในเวลาเดียวกัน จากนั้นนำอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มาดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีนและหมู่คาร์บอกซิลเพื่อตรึงแอนติบอดีของเชื้อแบคทีเรียลงไป ผลการศึกษาพบว่าการดัดแปลงผิวอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีนแล้วนำมาเชื่อมต่อกับ PEG-biotin, streptavidin และ biotin-labeled antibody ตามลำดับ ให้ผลดีที่สุดในการตรึงแอนติบอดี เนื่องจาก PEG จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติในการละลายและกระจายตัวของอนุภาค รวมทั้งลด steric hindrance ต่างๆ ด้วย

Tan และคณะ [98] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกามีขนาด 64 นาโนเมตร ที่บรรจุสี RuBpy dye ไว้ภายในอนุภาคด้วยวิธีไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน เพื่อพัฒนาใช้เป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจสอบเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* จากเสมหะของผู้ป่วยโรควัณโรค โดยนำอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้มาดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคด้วย CNBr ก่อนจะนำไปเชื่อมกับโมเลกุลของโปรตีนเอ แล้วจึงนำไปตรวจสอบกับเสมหะของผู้ป่วยที่เสมหะมีไรโบโซมสไลด์ โดยสังเกตการเรืองแสงของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าวิธีนี้ให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำ มีความจำเพาะสูง และรวดเร็ว โดยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจนถึงการอ่านผลใช้เวลาเพียง 4 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลไวกว่าวิธีปกติที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อมาก (ประมาณ 8-10 ชั่วโมง)

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Analytical balance (Mettler Toledo Model AB 204-S, Switzerland)
- Biosafety cabinet (Biohazard laminar flow Model 25 Manometer, USA)
- Centrifuge (Hettich Model Rotanta 46R, Germany)
- Flask, Beaker, Vial, Test tube, Dropper
- Fluorescent microscopy (Nikon Model Eclipse E600, Japan)
- Incubator (Jeio Tech Model IB-15G, Korea)
- Incubator shaker (Vision Scientific Model KMC-1205SW1, Korea)
- Magnetic stirrer, Magnetic bar (Diligent Model ST-EC, Thailand)
- Micropipette and tip
- pH meter (Hanna Model HI22, Thailand)
- Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL Model JSM-5800, USA)
- Spectrofluorometer (Hitachi Model F2500, Japan)
- Spectrophotometer (Hitachi Model U2010, USA)
- Transmission Electron Microscope (TEM) (JEOL Model JEM-2010, USA)
- Vortex mixer (Vortex genie-2 Model G-560E, USA)
- Ultrasonicator (Sonics & Materials Model VCX600, USA)

3.2 สารเคมี

- (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTS) (Fluka, USA)
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) (Fluka, USA)
- Acetic acid (BHD, Malaysia)
- Acetone (Carlo Erba, Italy)
- Ammonium hydroxide (NH₄OH 28 wt.%) (Carlo Erba, Italy)
- Cyclohexane (Fisher Scientific, UK)
- Deionized water
- 95% Ethanol

- Glutaraldehyde (Fluka, USA)
- *N,N*-dimethylformamide (Lab scan, Thailand)
- *n*-hexanol (Fluka, Germany)
- *N*-hydroxy-succinimide (NHS) (Fluka, USA)
- Polyoxyethylene-*tert*-octylphenyl ether (Triton X-100) (Fisher Scientific, UK)
- Sodium borohydride (Fluka, USA)
- Succinic anhydride (Fluka, Switzerland)
- Tetraethyl orthosilicate (TEOS) (Fluka, Germany)
- Tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate (Rubpy) (Fluka, Germany)
- *Z*-morpholinoethanesulfonic acid (MES) (Acros, USA)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

- *Salmonella* Enteritidis SH 272/07 (SE) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
- *Salmonella* Typhimurium (ST)
- *Escherichia coli* (EC)
- *Staphylococcus aureus* (SA)
- *Bacillus subtilis* (BS)

3.4 แอนติซีรัม

- Agglutinating Serum *Salmonella* O:9 (S&A Reagents Lab Ltd., Part)
- Agglutinating Serum *Salmonella* O:12 (S&A Reagents Lab Ltd., Part)
- Agglutinating Serum *Salmonella* H:g (S&A Reagents Lab Ltd., Part)
- Agglutinating Serum *Salmonella* H:m (S&A Reagents Lab Ltd., Part)
- โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อซัลโมเนลลา โดยความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

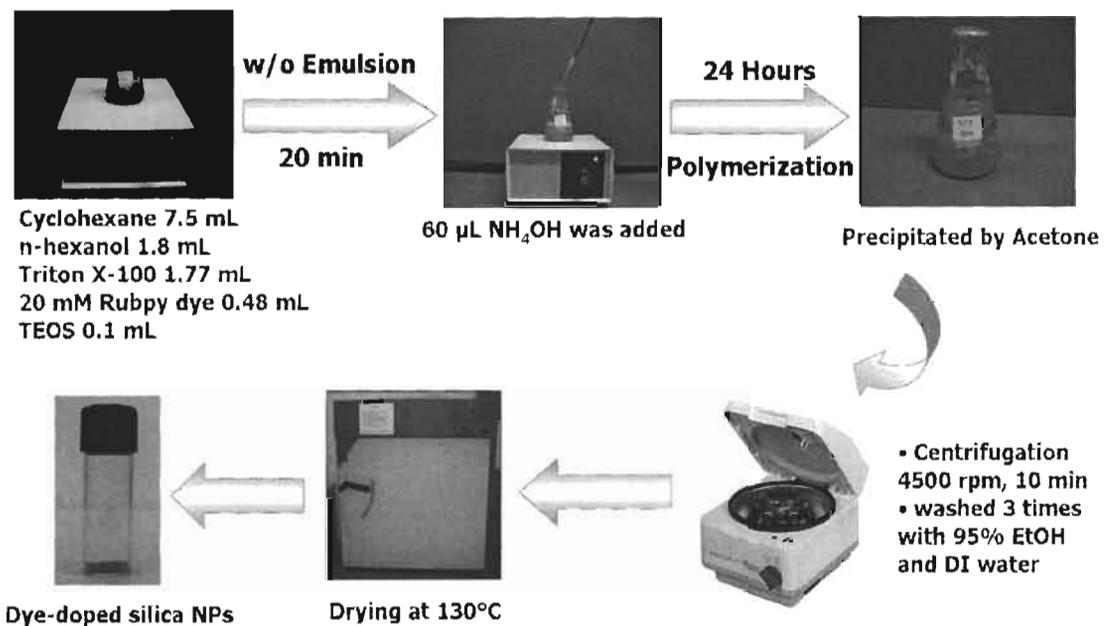
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Trypticase Soy Agar (TSA) (Merck, Germany)

3.6 ขั้นตอนการวิจัย

3.6.1 การเตรียมนอนุภาคนาโนซิลิกา

RuBpy-Doped Silica Nanoparticles จะถูกเตรียมโดยวิธีไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Lian และคณะ [8] โดยในระบบไมโครอิมัลชันจะประกอบไปด้วย Cyclohexane 7.5 mL, *n*-hexanol 1.8 mL, Triton X-100 1.77 mL, 20 mM RuBpy dye in water 0.48 mL และ TEOS 0.1 mL หลังจากผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 20 นาที จะเติม NH_4OH 60 μL เพื่อเร่งปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน



รูปที่ 3.1 การเตรียม RuBpy-Doped Silica Nanoparticles โดยวิธีไมโครอิมัลชัน แบบน้ำในน้ำมัน

เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันของอนุภาคนาโน (Nanoparticles: NPs) จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำการตกตะกอนอนุภาคนาโนด้วยอะซีโตน โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างอนุภาคด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง และน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง เพื่อกำจัดสารเคมีส่วนเกินบริเวณผิวของอนุภาคนาโนออก แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส จะได้อนุภาคนาโนที่มีลักษณะเป็นผงสีส้มเข้ม (รูปที่ 3.1) เก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยใส่ในขวดสีชาหรือหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ เพื่อป้องกันการ Bleaching ของสีเรืองแสงภายในอนุภาคนาโน

RuBpy-Doped Silica Nanoparticles จะถูกทำให้แขวนลอยใน double-distilled water และทำให้กระจายตัวด้วยเครื่อง ultrasonicator (ตั้งค่า amplitude ของเครื่อง = 35% , pulse = 9.0, 5.0) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้อนุภาคมีการกระจายตัวได้ดี จากนั้นหยดชั้นบนของอนุภาคลงบน Carbon-coated copper grid ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) แล้วนำไปวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคดังนี้

3.6.1.1 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาค โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopes; TEM)

3.6.1.2 ตรวจสอบความเข้มแสง (Fluorescence Intensity; FI) และความคงตัวของสีเรืองแสง (Photostability) ภายในอนุภาค โดยใช้เครื่อง Fluorescence Spectrofluorometer

3.6.2 ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา

ทำการเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาตามวิธีในข้อ 3.6.1 แต่เปลี่ยนปริมาตรของ TEOS และ NH_4OH ดังนี้

Sample	Experimental conditions	
	TEOS (mL)	NH_4OH (μL)
NP1	0.05	30
NP2 (control)	0.1	60
NP3	0.1	40
NP4	0.1	80
NP5	0.3	60
NP6	0.5	60
NP7	0.5	80
NP8	0.7	120

3.6.3 การดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา (Surface modification)

ก่อนที่จะมีการจับกันระหว่างแอนติบอดีของเชื้อซัลโมเนลลาและอนุภาคนาโนซิลิกา จำเป็นต้องทำการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาด้วยวิธีทางเคมีก่อน เพื่อให้มีหมู่ฟังก์ชันบนผิวของอนุภาคมากพอที่จะสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของแอนติบอดีได้

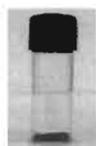
3.6.3.1 Carboxyl Group Modification

เป็นการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาให้กลายเป็นหมู่คาร์บอกซิล โดยนำอนุภาคนาโนซิลิกา (NP3) ปริมาณ 32 mg ละลายใน 20 mL ของ 1% APTS ใน 1 mM Acetic acid ทำให้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่อง ultrasonicator (ตั้งค่า amplitude ของเครื่อง = 35% , pulse = 9.0, 5.0) เป็นเวลา 10 นาที แล้วกวนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำปราศจากไอออนและ *N,N*-dimethylformamide โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ 10% Succinic anhydride ใน *N,N*-dimethylformamide ภายใต้อากาศไนโตรเจนที่มีการกวนอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง ล้างอนุภาคด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ 5 mL ของ 100 mg/mL EDC และ 5 mL ของ 100 mg/mL *N*-hydroxy-succinimide ในสารละลายของ MES บัฟเฟอร์ (pH 6.8) ที่อุณหภูมิห้อง (กวนอย่างสม่ำเสมอ) เป็นเวลา 25 นาที ล้างอนุภาคด้วยน้ำปราศจากไอออน โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้แขวนลอยใน 10 mL ของ 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน (รูปที่ 3.2)

3.6.3.2 Amine Group Modification

เป็นการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาให้กลายเป็นหมู่เอมีน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Yuan และคณะ [99] โดยนำอนุภาคนาโนซิลิกา (NP3) ปริมาณ 30 mg ละลายในน้ำปราศจากไอออน 3 mL แล้วเติม Acetic acid 60 μ L และ APTS 60 μ L ลงไป ทำให้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่อง ultrasonicator (ตั้งค่า amplitude ของเครื่อง = 35% , pulse = 9.0, 5.0) เป็นเวลา 10 นาที แล้วกวนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างอนุภาคด้วย MES บัฟเฟอร์ (pH 5.5) แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ 60 mg ของ BSA ที่ละลายใน 3 mL ของ 0.1 M NaHCO_3 (pH 8.5) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างอนุภาคด้วยน้ำปราศจากไอออนหลายๆ ครั้ง แล้วทำให้แขวนลอยใน 3 mL ของ 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน (รูปที่ 3.4)

Chemical modification: Carboxyl Group Modification



32 mg NPs + 20 mL of 1% APTS in Acetic acid

Sonicated 10 min

Stirred 30 min

Washed with DI and *N,N*-dimethylformamide

4500 rpm, 10 min

Added 10% Succinic anhydride in *N,N*-dimethylformamide

Sonicated 10 min

Stirred 6h under N₂ gas

Activated in 5 mL of 100 mg/mL EDC and
5 mL of 100 mg/mL NHS in MES buffer



Sonicated 10 min

Stirred 25 min

Washed with DI, 12000 rpm 15 min



Dispersed in 10 mL of 10mM Phosphate buffer

Stored at 4°C until used

รูปที่ 3.2 การดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาแบบ Carboxyl Group Modification

Covalently immobilize Abs onto the CNPs surface



5 mL of 0.1 mg/mL CNPs

Added 2 mL of 1 mg/mL Abs

Stirred 4 h, 25°C

Washed with 10 mM Phosphate buffer

12000 rpm, 12 min

Added 1% BSA

Stored at 4°C until used

รูปที่ 3.3 การตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคนาโนที่ดัดแปลงผิวแบบ Carboxyl Group Modification

Chemical modification: Amine Group Modification

30 mg NPs + DI 3 mL + 60 μ L Acetic acid + 60 μ L APTS *Sonicated 10 min*



↓ Stirred 3 h, 25°C

Washed with MES buffer

↓ 4500 rpm, 10 min

Added 60 mg BSA in 3 mL of 0.1 M NaHCO_3

Sonicated 10 min

↓ Stirred 24 h, 10°C
Washed with DI

Suspended in 3 mL of 10mM Phosphate buffer

↓
Stored at 4°C until used

รูปที่ 3.4 การดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาแบบ Amine Group Modification

Covalently immobilize Abs onto the NNPs surface

NNPs 10 mg/mL

↓
Added 2 mL of 1 mg/mL Abs in 1% Glutaraldehyde



↓ Stirred 24 h, 10°C

Added 6 mg of NaBH_4

↓ Stirred 2 h, 10°C

Added 3 mL of 0.03 Glycine solution

↓ Stirred 30 min, 25°C
Washed

Suspended in 10mM Phosphate buffer
Stored at 4°C until used

รูปที่ 3.5 การตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคนาโนที่ดัดแปลงผิวแบบ Amine Group Modification

3.6.4 การตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา

3.6.4.1 Carboxyl Group Modification

5 ml ของ 0.1 mg/mL CNPs (จากข้อ 3.6.3.1) จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับ 2 mL ของ 1 mg/mL antibody for *Salmonella* โดยการกวนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อฟอร์มเป็น antibody-conjugated nanoparticles และเพื่อลดผลกระทบจากการจับที่ไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific binding) antibody-conjugated nanoparticles ที่ได้จะทำปฏิกิริยากับ 1% BSA และล้างใน 10 mM ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 7.4) ก่อนนำไปใช้งาน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้งาน (รูปที่ 3.3)

3.6.4.2 Amine Group Modification

3 mL ของ NNPs ใน 10 mM ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 7.4) จากข้อ 3.6.3.2 จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับ 2 mL ของ 1 mg/mL antibody of *Salmonella* ใน 1% glutaraldehyde โดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจะเติม sodium borohydride ปริมาณ 6 mg บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม 3 mL ของ 0.03 M Glycine ลงไปทำปฏิกิริยา ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างอนุภาคด้วยน้ำปราศจากไอออนและทำให้แขวนลอยใน 10 mM ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 7.4) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้งาน (รูปที่ 3.5)

3.6.5 การใช้ antibody-conjugated nanoparticles ตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา

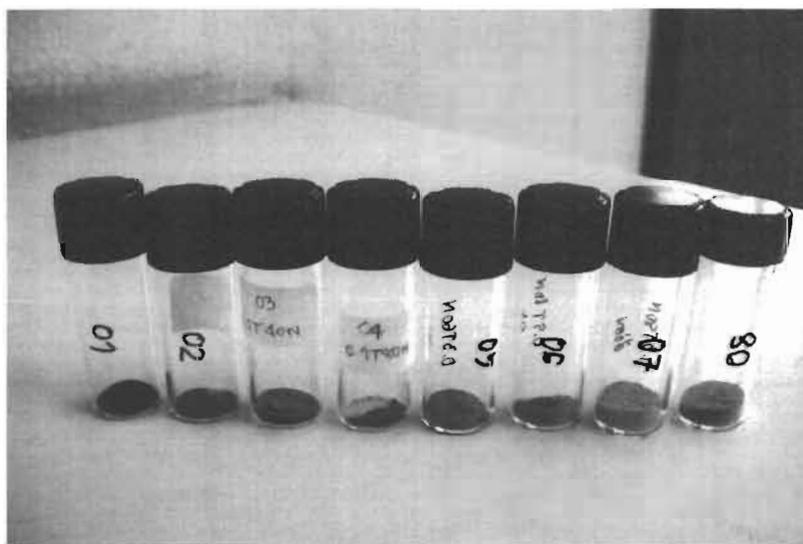
ใช้ซัสเพนชันของเชื้อซัลโมเนลลา (10^4 CFU/mL) ปริมาตร 100 μ L บ่มร่วมกับ 1.4 mL ของ 0.1 mg/mL antibody-conjugated nanoparticles ใน 10 mM ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 7.4) เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อล้างแอนติบอดีส่วนที่ไม่จับกับเชื้อแบคทีเรียออกไป ตรวจสอบการเรืองแสงของอนุภาคนาโนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยเลือกช่วง excitation wavelength เท่ากับ 450-490 นาโนเมตร

ศึกษาความจำเพาะ (Specificity) ของ antibody-conjugated nanoparticles ต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non-*Salmonella* ชนิดที่พบได้บ่อยในอาหาร เช่น *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* เพื่อทดสอบความจำเพาะของ antibody-conjugated nanoparticles ที่เตรียมขึ้น

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล

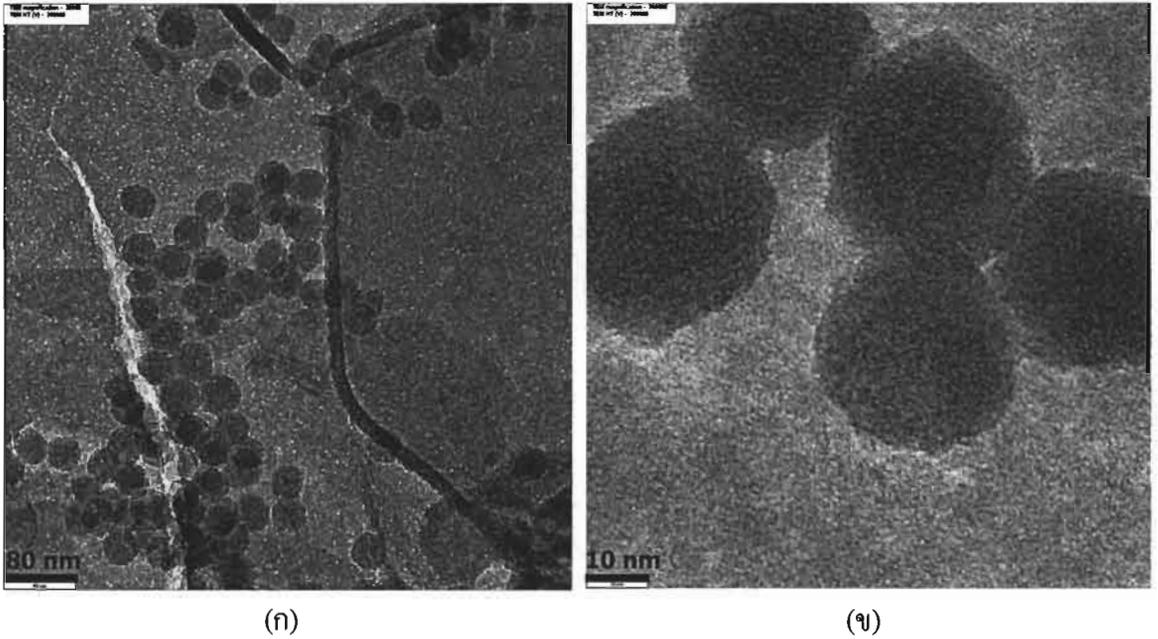
4.1 การเตรียมและวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนซิลิกา

อนุภาคนาโนซิลิกา (RuBpy-doped silica nanoparticles) จะถูกเตรียมโดยวิธีไมโครอิมัลชัน แบบ น้ำในน้ำมัน โดยใช้ TEOS เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส วิธีนี้สามารถเตรียมได้ง่าย และได้ผงอนุภาคนาโนซิลิกาที่มีสีส้มเข้ม ปริมาณ 18 มิลลิกรัมต่อการเตรียมในแต่ละครั้ง (รูปที่ 4.1) นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมขนาดของอนุภาคได้ โดยขนาดของอนุภาคจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วน molar ratio ของน้ำและ surfactant, ความเข้มข้นของ TEOS, NH_4OH และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา [100]



รูปที่ 4.1 อนุภาคนาโนซิลิกา (NPI-NP8) ที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP2) ที่ตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical) ขนาดของเม็ดอนุภาคค่อนข้างสม่ำเสมอ มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 37 ± 3 นาโนเมตร โดยมีการกระจายของขนาดอนุภาค (size distribution) อยู่ระหว่าง 30-45 นาโนเมตร (รูปที่ 4.2) และเมื่อตรวจสอบอนุภาคที่กำลังขยายสูงๆ (200,000 เท่า) จะสังเกตเห็นจุดสีดำเล็กๆ ของอะตอม ruthenium อยู่ในอนุภาค โดย Santra และคณะ [94] พบจุดสีดำของอะตอม ruthenium เมื่อตรวจสอบอนุภาคที่กำลังขยาย 184,000 เท่า ส่วน Yuan และคณะ [99] พบที่กำลังขยาย 200,000 เท่า เปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนที่เตรียมโดยไม่ได้เติมสี RuBpy dye ลงไป ทำให้ทราบว่าจุดสีดำเล็กๆ ภายในอนุภาคนาโน คือ อะตอมของ ruthenium ที่แทรกตัวเข้าไปอยู่ในโครงร่างซิลิกาที่ระหว่างเกิดปฏิกิริยาไมโครอิมัลชัน



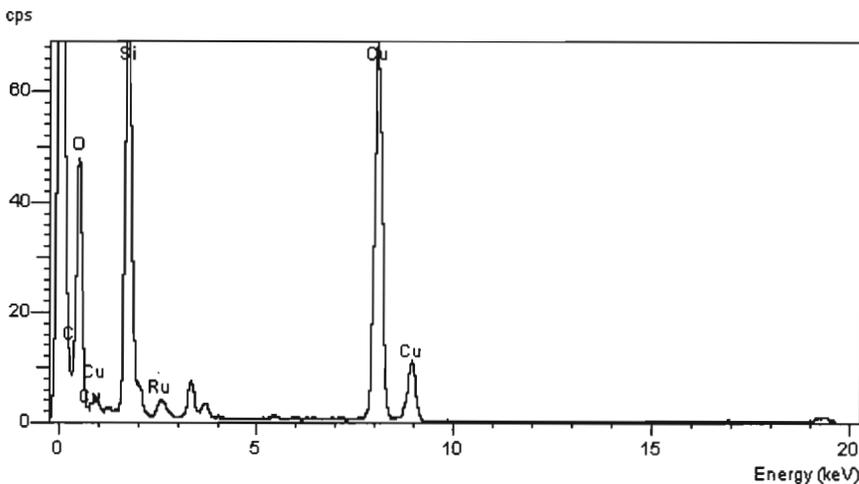
รูปที่ 4.2 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนซิลิกา NP2 (0.1 mL TEOS:60 μ L NH_4OH)
 (ก) ภาพจาก TEM ที่กำลังขยาย 30,000 เท่า และ
 (ข) ภาพจาก TEM ที่กำลังขยาย 200,000 เท่า

การตรวจสอบโมเลกุลของสีฟลูออเรสเซนต์ (RuBpy dye) ในอนุภาคนาโนซิลิกา ใช้เทคนิค Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) (รูปที่ 4.3) ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงปริมาณของธาตุอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอนุภาคอีกด้วย โดยพบว่าอนุภาคนาโนซิลิกานั้นมีธาตุ Si, Ru (RuBpy dye), และ O เป็นองค์ประกอบ โดยมีปริมาณธาตุต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ส่วนธาตุ Cu มาจาก copper grid ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจสอบด้วย TEM

Operator : MTEC

Client : TEM

Job : NP2 (26/11/07, 10.08)



รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP2) ด้วยเทคนิค EDS

ตารางที่ 4.1 ปริมาณธาตุองค์ประกอบต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP2)

ธาตุ	สัดส่วนปริมาณโดยน้ำหนัก (%)	สัดส่วนปริมาณโดยโมล (%)
O	52.60	67.79
Si	42.52	31.22
Ru	4.89	1.00
Total	100.00	100.00

จากข้อมูลการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของอนุภาคนาโน NP2 ในตารางที่ 4.1 ทำให้ทราบว่าอนุภาคนาโน NP2 มีธาตุ ruthenium (Ru) เป็นองค์ประกอบร้อยละ 3.2 โดยโมล เมื่อเปรียบเทียบกับธาตุซิลิกา

4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา

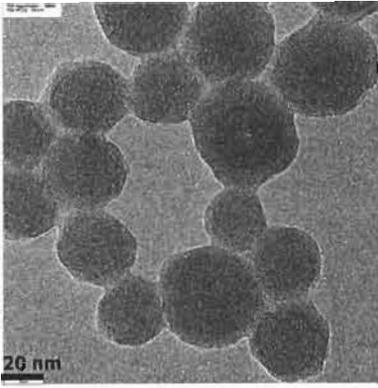
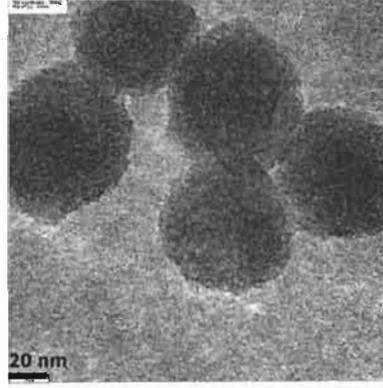
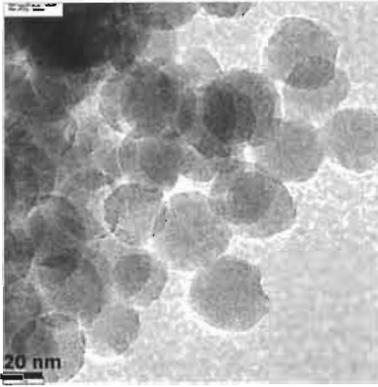
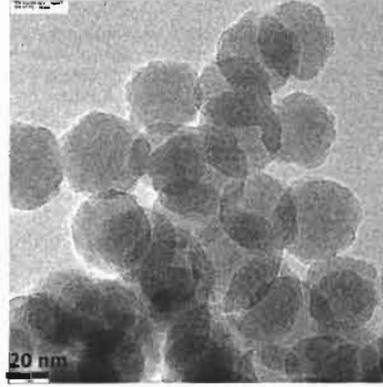
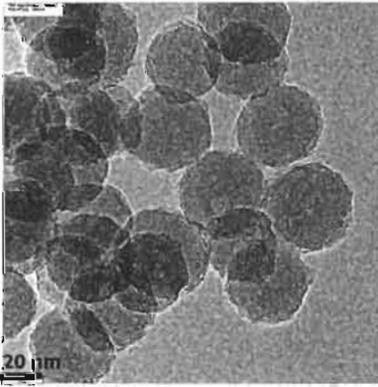
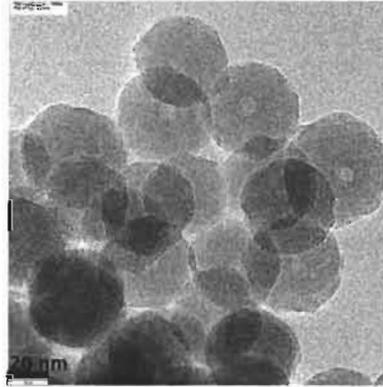
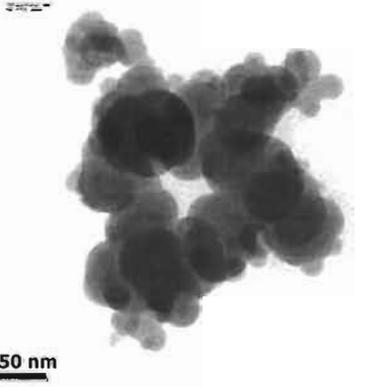
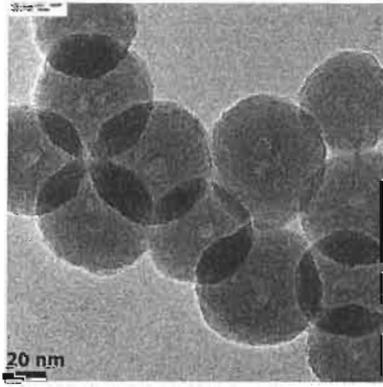
Bogush และ Zukoski [101] พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อขนาดและการกระจายของขนาด (size distribution) ของอนุภาคนาโนซิลิกา มี 5 พารามิเตอร์ คือ (ก) ความเข้มข้นของ TEOS (ข) ความเข้มข้นของแอมโมเนีย (ค) ความเข้มข้นของน้ำ (ง) ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และ (จ) อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งในการทดลองนี้จะศึกษาความเข้มข้นของ TEOS และ NH_4OH ที่ส่งผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา ซึ่งผลการศึกษาดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 พารามิเตอร์ที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา

Sample	Parameter	Size (nm) : d = diameter*	Average particle size (nm)*
NP1	50 μL TEOS:30 μL NH_4OH	29 < d < 54	40 \pm 6
NP2	Control (0.1 mL TEOS:60 μL NH_4OH)	30 < d < 45	37 \pm 3
NP3	Effect of NH_4OH (40 μL)	29 < d < 44	35 \pm 3
NP4	Effect of NH_4OH (80 μL)	34 < d < 44	39 \pm 3
NP5	Effect of TEOS (0.3 mL)	38 < d < 51	44 \pm 3
NP6	Effect of TEOS (0.5 mL)	36 < d < 53	45 \pm 3
NP7	0.5 mL TEOS:80 μL NH_4OH	-	-
NP8	0.7 mL TEOS:120 μL NH_4OH	48 < d < 62	55 \pm 4

* หมายเหตุ : ขนาดของอนุภาคในตารางใช้ข้อมูลจากภาพถ่าย TEM (ภาคผนวก ก)

- หมายเหตุ : ตัวอย่างมีรูปร่างแบบอสัณฐาน (amorphous shape) ทำให้ไม่สามารถวัดขนาดได้

(ก) NP1 (50 μL TEOS:30 μL NH_4OH)(ข) NP2 (100 μL TEOS:60 μL NH_4OH)(ค) NP3 (100 μL TEOS:40 μL NH_4OH)(ง) NP4 (100 μL TEOS:80 μL NH_4OH)(จ) NP5 (300 μL TEOS:60 μL NH_4OH)(ฉ) NP6 (500 μL TEOS:60 μL NH_4OH)(ช) NP7 (500 μL TEOS:80 μL NH_4OH)(ซ) NP8 (700 μL TEOS:120 μL NH_4OH)

รูปที่ 4.4 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP1-NP8 จากสภาวะการเตรียมต่างๆ กัน

4.2.1 ผลของความเข้มข้น TEOS ต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา

เมื่อแปรผันความเข้มข้นของ TEOS ในระบบไมโครอิมัลชัน ที่ควบคุมความเข้มข้นของสารอื่นๆ ในระบบให้คงที่นั้น Stöber และคณะ [75] รายงานว่าความเข้มข้นของ TEOS จะไม่ส่งผลใดๆ ต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา ขณะที่ Bogush และคณะ [102] พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TEOS ในปฏิกิริยา จะทำให้ได้อนุภาคนาโนซิลิกาที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ Van Helden และคณะ [103] กลับพบว่าความเข้มข้นที่มากขึ้นของ TEOS ส่งผลให้ขนาดของอนุภาคลดลง

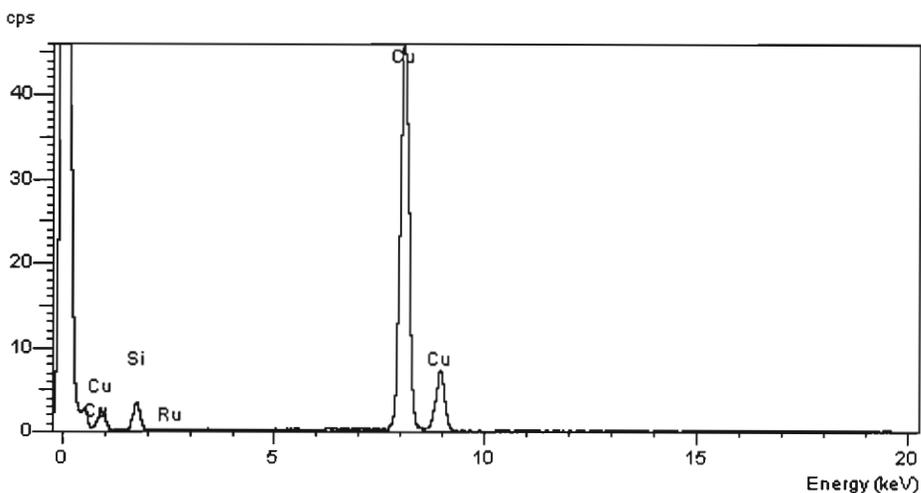
จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TEOS จาก 50-700 μL จะทำให้ได้ขนาดของอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น และการกระจายขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วงกว้าง ดังข้อมูลในตารางที่ 4.2 และเมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนซิลิกาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าที่ความเข้มข้นของ TEOS สูงๆ นั้น (>0.1 mL) จะทำให้เม็ดอนุภาคมีรูเกิดขึ้นตรงกลางคล้ายโดนัทดังรูปที่ 4.4 (จ) - (ข) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mashii [104] ที่พบว่า hollow silica จะเกิดขึ้น เมื่อใช้ TEOS ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 mL ขึ้นไป

และเมื่อใช้เทคนิค Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) วิเคราะห์ปริมาณของธาตุที่เป็นองค์ประกอบในอนุภาคนาโน NP8 พบว่ามีธาตุ Si และ Ru เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.5) โดยธาตุ Cu มาจาก copper grid ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจสอบด้วย TEM

Operator : MTEC

Client : TEM

Job : NP8 (26/11/07, 11.55)



รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP8) ด้วยเทคนิค EDS

ตารางที่ 4.3 ปริมาณธาตุองค์ประกอบต่างๆ ของอนุภาคนาโนซิลิกา (NP8)

ธาตุ	สัดส่วนปริมาณโดยน้ำหนัก (%)	สัดส่วนปริมาณโดยโมล (%)
Si	92.46	97.79
Ru	7.54	2.21
Total	100.00	100.00

จากข้อมูลการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของอนุภาคนาโน NP8 ในตารางที่ 4.3 ทำให้ทราบว่าอนุภาคนาโน NP8 มีธาตุ ruthenium (Ru) เป็นองค์ประกอบร้อยละ 2.26 โดยโมล เมื่อเปรียบเทียบกับธาตุซิลิกา ซึ่งน้อยกว่าที่พบในอนุภาคนาโน NP2 (มี ruthenium ร้อยละ 3.2 โดยโมล เมื่อเปรียบเทียบกับธาตุซิลิกา) เนื่องจาก TEOS ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโน NP8 มีความเข้มข้นสูงกว่า (700 μL) ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโน NP2 (100 μL) ทำให้ RuBpy กระจายตัวเข้าไปในโครงร่างซิลิกาได้น้อยกว่า จึงมีปริมาณน้อยกว่านั่นเอง

Bogush และคณะ [102] อธิบายว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TEOS ลงในระบบไมโครอิมัลชันที่ใช้สำหรับเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกา จะทำให้มีสารตั้งต้นในระบบมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค จึงทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ นอกจากนั้นการใช้ความเข้มข้นของ TEOS ที่ต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลให้อนุภาคมีรูปร่างแบบอสัณฐาน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TEOS ในการใช้เตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาจะอยู่ในช่วง 30-100 μL

4.2.2 ผลของความเข้มข้น NH_4OH ต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา

โดยปกติปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเกิดขึ้นช้ามาก จึงมีการพัฒนาใช้กรดหรือเบสเพื่อเร่งการเกิดปฏิกิริยา (catalysts) โดยในระบบไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันนี้จะใช้ NH_4OH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและการรวมตัว (condensation) ของ TEOS ในสารละลายแอลกอฮอล์ โดย Matsoukas และ Gulari [105] พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ NH_4OH และน้ำจะทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจาก NH_4OH จะทำหน้าที่เร่งอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นการเพิ่มไคนेटิกส์ให้กับระบบ ขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำจะทำให้ได้ขนาดของอนุภาคที่เล็กลง อย่างไรก็ตาม Park และคณะ [106] พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ NH_4OH ส่งผลให้อนุภาคมีขนาดลดลง

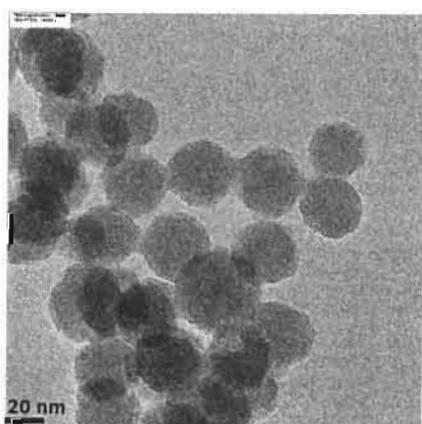
จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NH_4OH จาก 30-120 μL จะทำให้ได้ขนาดของอนุภาคที่เพิ่มขึ้น และมีการกระจายขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วงกว้าง ดังข้อมูลในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.4 (ก) - (ง)

Mashi [104] อธิบายว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NH_4OH ลงในระบบไมโครอิมัลชันที่ใช้สำหรับเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกา จะส่งผลให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดได้เร็วขึ้นก็จริง แต่ในขณะเดียวกันก็ทำให้ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของระบบเพิ่มขึ้นด้วย ส่งผลให้ electrostatic stabilization ของคอลลอยด์มีค่าสูงขึ้น ทำให้เสถียรภาพของระบบไมโครอิมัลชันลดลง ขณะที่การใช้ความเข้มข้นของ NH_4OH ที่ต่ำจะทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดได้ช้าจึงทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NH_4OH ในการใช้เตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาจะอยู่ในช่วง 30-80 μL

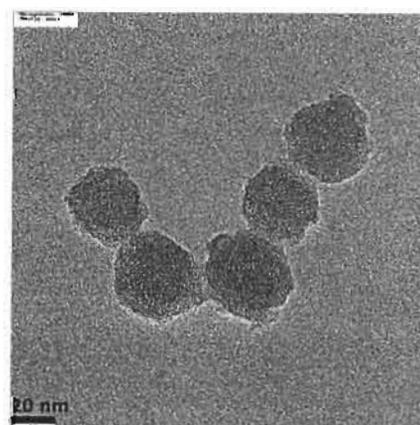
จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกา รวมไปถึงความเข้มแสงและความคงตัวของสเปกตรัมเรสเซนซ์ภายในอนุภาคนาโนซิลิกา พบว่าอนุภาคนาโน NP3 (0.1 mL TEOS:40 μL NH_4OH) มีขนาดเล็กที่สุด เท่ากับ 35 ± 3 นาโนเมตร และมีการ Bleaching ของสีน้อยมาก (0.16 %) จึงเหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

โดยอนุภาคนาโนซิลิกาที่เตรียมได้ในแต่ละครั้ง (1 batch) จะมีปริมาณน้อย (ประมาณ 18 มิลลิกรัม) ไม่เพียงพอสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป ดังนั้นจึงต้องเตรียมอนุภาคนาโนให้มีปริมาณมากพอ (5 batches) แล้วนำอนุภาคนาโนทั้งหมดมาทำให้กระจายตัวใน 95 % เอทานอล เพื่อรวมให้เป็นอนุภาค batch เดียวกัน แล้วทำการตรวจสอบอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของขนาดหรือไม่

จากการตรวจสอบด้วย TEM พบว่าอนุภาคนาโนซิลิกาที่เตรียมแล้วนำมารวมกันนั้น มีขนาดเฉลี่ยของอนุภาคเท่ากับ 32 ± 3 นาโนเมตร (รูปที่ 4.6) และมีการกระจายขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วงแคบ ที่ 30-36 นาโนเมตร มีการ Bleaching ของสเปกตรัมเรสเซนซ์ภายในอนุภาคนาโนซิลิกาน้อยมาก (0.21%)



(ก)



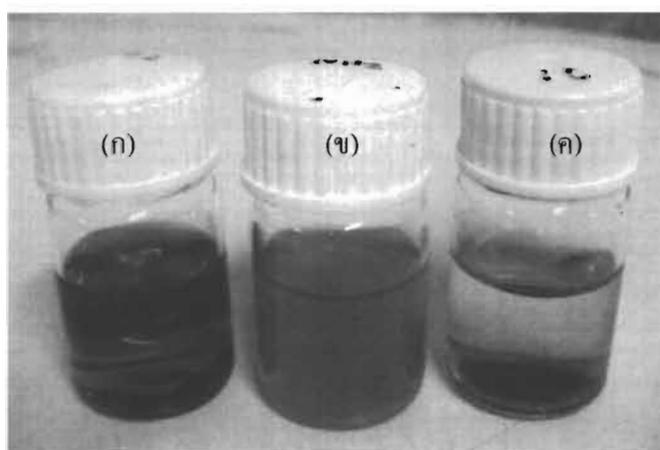
(ข)

รูปที่ 4.6 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP3 ที่ (ก) กำลังขยาย 80,000 เท่า และ (ข) 100,000 เท่า

4.3 คุณสมบัติความเข้มแสงและความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนต์ของอนุภาคนาโนซิลิกา (Fluorescent intensity and photostability of Dye-Doped Silica Nanoparticles)

อนุภาคนาโนซิลิกาที่มีสีเรืองแสงอยู่ในโมเลกุล (RuBpy-doped silica nanoparticles) จะถูกใช้เป็นโพรบในการวิเคราะห์ต่างๆ และใช้ติดฉลาก (Labeling) สำหรับตรวจสอบโมเลกุลทางชีวภาพ ซึ่งอนุภาคนาโนซิลิกามีข้อดี คือ สามารถเตรียมและดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคได้ง่าย มีความชอบน้ำ (Hydrophilic) สูง เป็น biocompatible ที่ดี และไม่เกิดการรั่วไหลของสีที่อยู่ภายใน มีความคงตัวของสีสูง เนื่องจากซิลิกาแมทริกซ์จะทำหน้าที่ป้องกันสีที่อยู่ภายในจากผลกระทบของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ออกซิเจน ตัวทำละลาย และสารละลายต่างๆ ในบัฟเฟอร์ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางชีวภาพที่ต้องการความไวสูง [6, 68, 69, 70]

ความเข้มแสงของอนุภาคนาโนซิลิกา จะถูกวัดเปรียบเทียบกับสี RuBpy dye โดยละลายตัวอย่างอนุภาคนาโนซิลิกาและสีในน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL โดยใช้เครื่อง ultrasonicator ในการทำให้อนุภาคกระจายตัวออกจากกัน (รูปที่ 4.7) แล้วจึงนำไปวัดค่าความเข้มแสง (F.I.) ที่ Ex./Em. Wavelengths เท่ากับ 430/595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Fluorescence Spectrophotometer

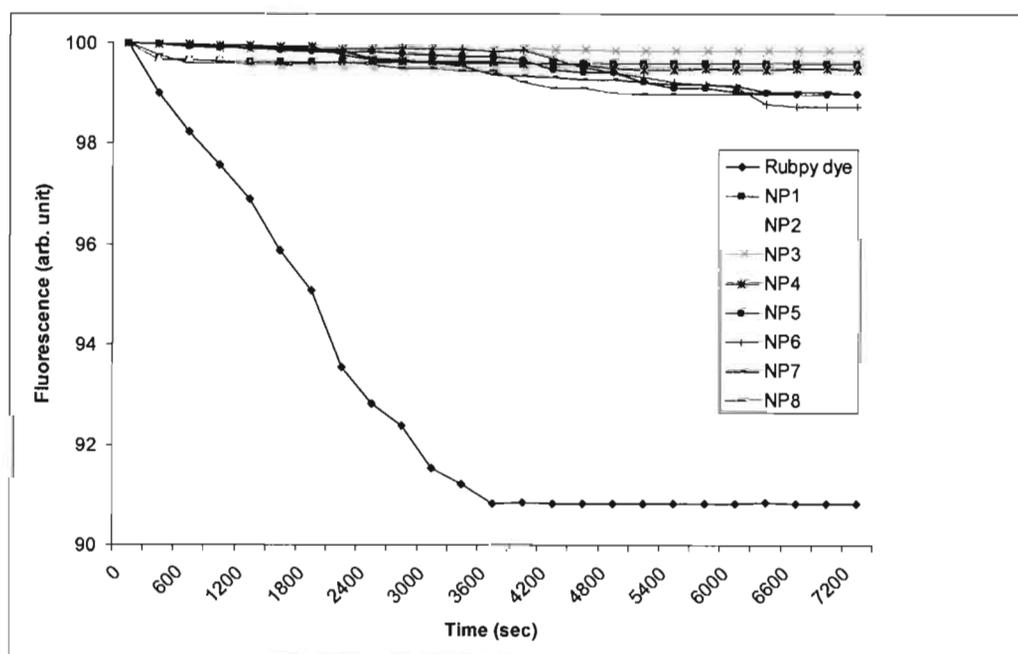


รูปที่ 4.7 สี RuBpy dye (ก) และอนุภาคนาโนซิลิกาที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ที่ถูกทำให้กระจายตัวด้วยเครื่อง ultrasonicator (ข) และไม่ได้ใช้เครื่อง ultrasonicator (ค)

ที่ความเข้มข้นเท่ากัน (1 mg/mL) ของตัวอย่างอนุภาคนาโนซิลิกาและสี RuBpy dye พบว่าอนุภาคนาโน NP7 มีความเข้มแสงสูงสุด เท่ากับ 183.80 arb. units และอนุภาคนาโนซิลิกาทุกตัวอย่าง (NP1-NP8) มีความเข้มแสงสูงกว่าสี RuBpy dye (ตารางที่ 4.4 และภาคผนวก ข) อันเนื่องมาจากโมเลกุลจำนวนมากของสีที่แทรกอยู่ในโครงร่างของซิลิกานั้นเอง

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบความเข้มแสงของตัวอย่างอนุภาคนาโนซิติกาจากสภาวะการเตรียมต่างๆ กัน และสี RuBpy dye

Sample	Ex./Em. wavelengths	Particle size (nm)	F.I. (arb. units)	Photobleaching (%)
Rubpy dye	430/595 nm	-	145.30	9.17
NP1	430/595 nm	40 ± 6	158.50	0.41
NP2	430/595 nm	37 ± 3	158.70	0.49
NP3	430/595 nm	35 ± 3	160.80	0.16
NP4	430/595 nm	39 ± 3	150.70	0.52
NP5	430/595 nm	44 ± 3	151.88	1.02
NP6	430/595 nm	45 ± 3	155.03	1.25
NP7	430/595 nm	-	183.80	1.00
NP8	430/595 nm	55 ± 4	157.17	1.02



รูปที่ 4.8 Photostability เฉลี่ย (n=3) ของอนุภาคนาโนซิติกา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Xenon lamp เป็นเวลา 7,200 วินาที (2 ชั่วโมง)

สำหรับคุณสมบัติความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนต์ของอนุภาคนาโนซิลิกา จะทดสอบโดยนำตัวอย่างอนุภาคนาโนและสี RuBpy dye ไป exposed กับ 150 W Xenon lamp เป็นเวลา 7200 วินาที (120 นาที) โดยทำการวัดค่าความเข้มแสง (F.I.) ของตัวอย่างทุกๆ 300 วินาที พบว่าอนุภาคนาโนซิลิกาทุกตัวอย่าง (NP1-NP8) มีการ Bleaching ของสีเรืองแสงน้อยมากเมื่อเทียบกับสี RuBpy dye โดยอนุภาคนาโน NP3 มีการ Bleaching น้อยที่สุด เท่ากับ 0.16% ขณะที่สี RuBpy dye มีการ Bleaching เท่ากับ 9.17% (ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.8) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับ Santra และคณะ [94] ที่ทำการทดสอบความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนต์ภายในอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับสี RuBpy dye และสี Rhodamine6G โดยการ exposed ด้วย 30 W deuterium lamp เป็นเวลา 60 นาที พบว่าอนุภาคนาโนที่เตรียมขึ้นไม่มีการ Bleaching ของสีเรืองแสงเลย ขณะที่สี RuBpy dye และ Rhodamine6G มีการ Bleaching เท่ากับ 10% และ 60% ตามลำดับ

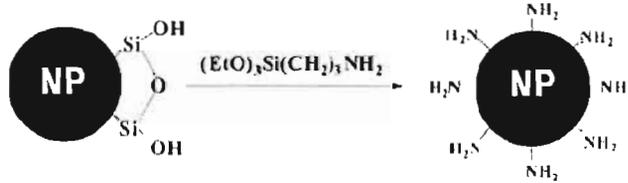
จากรูปที่ 4.8 และข้อมูลการวิเคราะห์ความเข้มแสงและความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนต์ในอนุภาคนาโนซิลิกา (ภาคผนวก ข) พบว่าความคงตัวของสีในอนุภาคนาโนซิลิกามีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 20 นาทีแรก (1,200 วินาที) แล้วจึงค่อยๆ มีค่าคงที่นั้น Yuan และคณะ [99] อธิบายว่าโมเลกุลของสี RuBpy dye บางส่วนอาจเกาะอยู่ตามผิวด้านนอกของอนุภาคนาโนซิลิกา เมื่อสัมผัสกับแสงจึงเกิดการ Bleaching ขึ้นได้

4.4 การดัดแปลงพื้นผิวและการตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา (Surface modification and immobilization of antibody onto NPs)

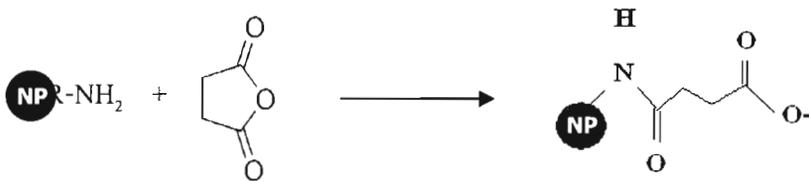
โดยทั่วไปสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น แอนติบอดี ดีเอ็นเอ เปปไทด์ สามารถเชื่อมติดกับผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาได้โดยตรง โดยอาศัยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าอย่างอ่อน ทำให้มีประสิทธิภาพต่ำในการนำไปใช้งาน [68] ดังนั้นการเชื่อมต่อสารชีวโมเลกุลกับผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาด้วยพันธะเคมีที่แข็งแรง (โควาเลนต์) ย่อมจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่า โดยก่อนที่จะมีการเชื่อมต่อเกิดขึ้น จำเป็นที่จะต้องดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวนอกของอนุภาคนาโนซิลิกาเสียก่อน เพื่อให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลได้ ซึ่งการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาที่นิยมในปัจจุบันมี 2 วิธี คือ Carboxyl Group Modification และ Amine Group Modification [69, 70]

4.4.1 Carboxyl Group Modification

วิธีนี้เป็นการดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาให้เกิดเป็นหมู่คาร์บอกซิล โดยนำอนุภาคนาโนซิลิกา (NP3) ปริมาณ 32 mg ทำปฏิกิริยากับ APTS ให้เกิดหมู่เอมีนบริเวณผิวของอนุภาคก่อน (รูปที่ 4.9) จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยากับ succinic anhydride ภายใต้อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลแทนที่หมู่เอมีน (รูปที่ 4.10)

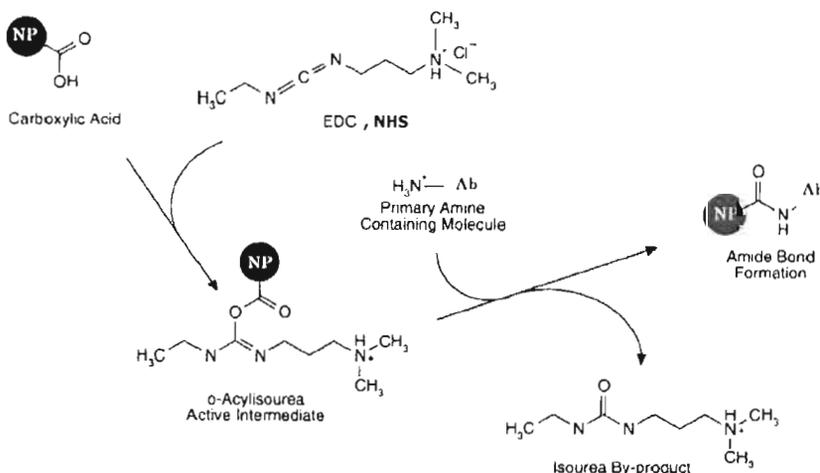


รูปที่ 4.9 APTS ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุภาคนาโนเกิดเป็นหมู่เอมีน



รูปที่ 4.10 Succinic anhydride ทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนที่มีหมู่เอมีนเกิดเป็นหมู่คาร์บอกซิล

จากนั้นจะกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลด้วยรีเอเจนต์ควบคู่ EDC และ NHS โดยต้องเตรียมสารละลายของ EDC ใน MES buffer (pH 5.5) แล้วใช้ทันที เนื่องจาก EDC สลายตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับความชื้น นอกจากนี้ EDC ยังสามารถทำให้เกิด self-polymerization ในสารละลายที่มีทั้งหมู่คาร์บอกซิลและเอมีนได้อีกด้วย [107]



รูปที่ 4.11 การกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลบนผิวของอนุภาคนาโนด้วย EDC และ NHS

ปฏิกิริยาการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลด้วยรีเอเจนท์ควบคู่ EDC และ NHS แสดงในรูปที่ 4.11 โดยขั้นตอนแรกหมู่คาร์บอกซิลบนอนุภาคนาโนจะทำปฏิกิริยากับ EDC และ NHS เพื่อเกิดเป็นสารตัวกลางที่แอคทีฟ (*o*-acylisourea) ซึ่งจากนั้นจะสามารถทำปฏิกิริยากับ primary amine (โมโนโคลนอลแอนติบอดี) ได้โดยการสร้างพันธะเอไมด์ ข้อได้เปรียบของการใช้รีเอเจนท์ควบคู่ EDC และ NHS คือ ช่วยเพิ่มการละลาย (solubility) และความเสถียร (stability) ของตัวอย่าง [81] เปรียบเทียบกับเมื่อใช้ EDC เพียงอย่างเดียวในการเชื่อมอนุภาคนาโนกับโมเลกุลของแอนติบอดี พบว่ามีสารตัวกลาง *o*-acylisourea เกิดขึ้นน้อย ทำให้มีอัตราการเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่ำ และถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายในสารละลายร่วมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของระบบ

นอกจากนั้นในขั้นตอนการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลด้วยรีเอเจนท์ควบคู่ EDC และ NHS จะทำให้เกิดการแทนที่ของประจุลบบนผิวอนุภาคจาก COO^- เป็น SO_3^- ส่งผลให้เกิดการผลักกันอย่างรุนแรงของอนุภาคในสารละลายจนทำให้ไม่สามารถตกตะกอนแยกอนุภาคได้เมื่อหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที จึงต้องเพิ่มความเร็วในการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกอนุภาคออกจากสารละลายเป็น 12,000 รอบต่อนาที โดยปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นกับอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 40 นาโนเมตรเท่านั้น [107]

ปัญหาที่พบได้บ่อยในการดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา คือ การรวมกลุ่มกันตกตะกอน (aggregation) ของอนุภาค ทำให้อนุภาคนาโนสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นคอลลอยด์ (colloidal stability) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ดังนั้นในทุกขั้นตอนของการดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวของอนุภาคจะต้องทำให้อนุภาคกระจายตัวในสารละลายด้วยเครื่อง ultrasonicator ทุกครั้ง ยกเว้นขั้นตอนในการตรึงแอนติบอดีบนผิวของอนุภาค เนื่องจากความร้อนที่เกิดจากคลื่นความถี่สูงของเครื่อง ultrasonicator มีผลทำให้แอนติบอดีเกิดการเสียสภาพ (denature)

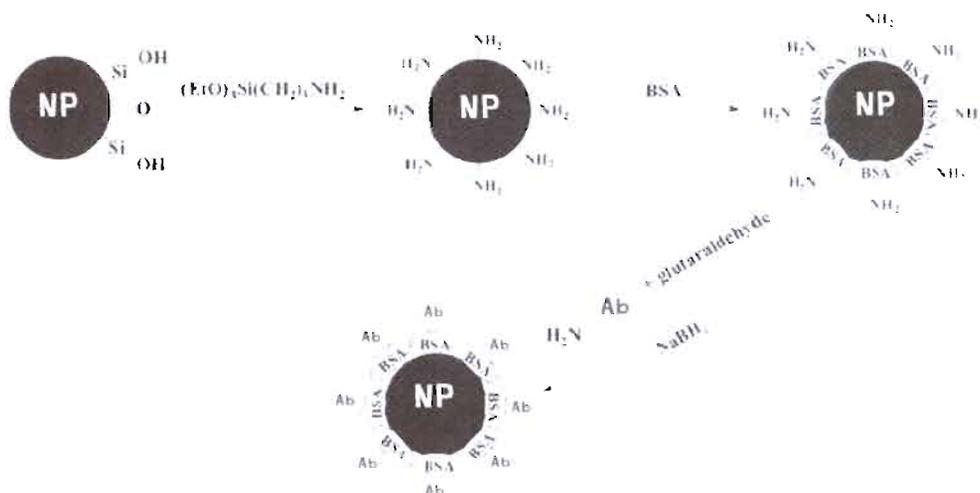


รูปที่ 4.12 อนุภาคนาโนที่ดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวให้เป็นหมู่คาร์บอกซิล (CNPs) ที่ (ก) ความเข้มข้น 3.2 mg/mL และ (ข) 0.1 mg/mL

4.4.2 Amine Group Modification

วิธีนี้เป็นารดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาให้เกิดเป็นหมู่เอมีน โดยนำอนุภาคนาโนซิลิกา (NP3) ปริมาณ 30 mg ทำปฏิกิริยากับ APTS เพื่อให้เกิดหมู่เอมีนขึ้นบริเวณรอบๆ ผิวของอนุภาค พบว่าอนุภาคนาโนที่มีหมู่เอมีนอยู่บริเวณผิวนี้สามารถเชื่อมต่อกับโมเลกุลของแอนติบอดีได้โดยตรง อย่างไรก็ตามการเชื่อมของอนุภาคนาโนกับแอนติบอดีโดยตรงนั้นทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนตัวอย่างที่เป็น solid-phase surface ได้ [99] อันเนื่องมาจากผลของ steric hindrance ระหว่างอนุภาคนาโนกับ solid-phase surface

ปัญหานี้จะแก้ไขได้โดยการเคลือบอนุภาคนาโนด้วยโมเลกุลของ bovine serum albumin (BSA) ก่อน จากนั้นจึงนำอนุภาคนาโนมาเชื่อมต่อกับแอนติบอดีโดยใช้ glutaraldehyde ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมและ NaBH_4 ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวส์ในปฏิกิริยาการตรึงแอนติบอดี โดย BSA จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการเชื่อมระหว่างอนุภาคนาโนและแอนติบอดี ทำให้ steric hindrance ระหว่างผิวของอนุภาคนาโนและ solid-phase surface ลดลง จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ (รูปที่ 4.13)

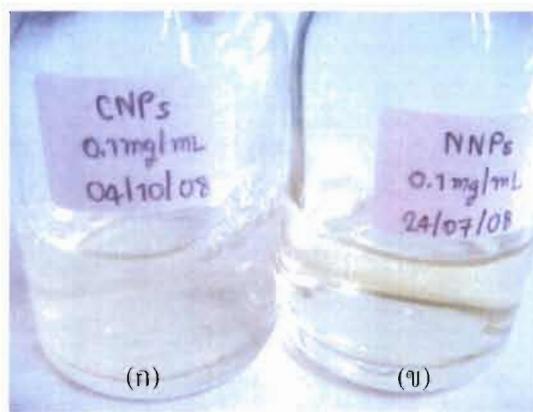


รูปที่ 4.13 การเคลือบผิวของอนุภาคนาโนด้วย BSA ก่อนตรึงแอนติบอดีลงบนผิวอนุภาค



รูปที่ 4.14 อนุภาคนาโนซิลิกาที่ดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวให้เป็นหมู่เอมีน (NNPs) ที่ (ก) ความเข้มข้น 10 mg/mL และ (ข) 0.1 mg/mL

Tan และคณะ [7] พบว่าอนุภาคนาโนที่ดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวให้เป็นหมู่คาร์บอกซิล (CNPs) แล้วนำไปเชื่อมกับโมเลกุลของแอนติบอดีนั้น เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 4 สัปดาห์ โดยยังคงคุณสมบัติในการเป็นแอนติบอดีที่ดี จากการทดลองพบว่า CNPs ที่เตรียมขึ้นสามารถเก็บรักษาได้เพียง 3 สัปดาห์เท่านั้น ก็เกิดการตกตะกอนของอนุภาค ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้งานได้ ในขณะที่ NNPs สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 3 เดือน โดยไม่พบการตกตะกอนของอนุภาค (รูปที่ 4.15)

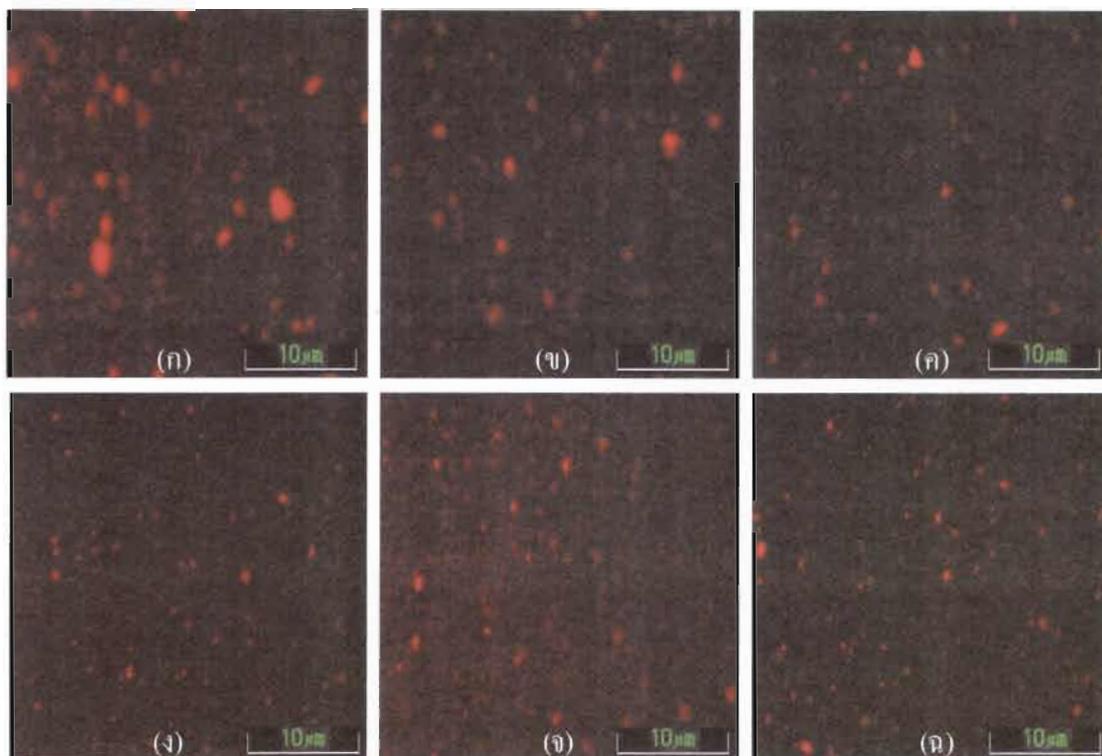


รูปที่ 4.15 Stability ของ CNPs ที่อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ (ก) และ NNPs ที่ 3 เดือน (ข)

4.5 การใช้ antibody-conjugated nanoparticles ตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เลือกใช้เชื้อ *Salmonella* Enteritidis SH 272/07 (SE) และ *Salmonella* Typhimurium (ST) เป็นแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ เนื่องจาก SE และ ST เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ และพบมากเป็นลำดับแรกๆ จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ (รายงานประจำปี 2549 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

โดยการทดลองครั้งแรก ได้ใช้ Agglutinating Serum *Salmonella* O:9, O:12, H:g และ H:m จากบริษัท S&A Reagents Lab ที่เตรียมโดยการฉีดแอนติเจนของเชื้อเข้าไปในร่างกายของกระต่ายเพื่อสร้างแอนติบอดีในซีรัม โดยแอนติบอดีที่ได้นี้จะเรียกว่าโพลีโคลนัลแอนติบอดี นำมาตรึงลงบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาที่ผ่านการดัดแปลงพันธะเคมีให้มีหมู่คาร์บอกซิลและเอมีนแล้ว ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนซิลิกาที่ดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวของอนุภาคให้เป็นหมู่คาร์บอกซิลและเอมีนสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับโมเลกุลของแอนติบอดีต่อเชื้อซัลโมเนลลาได้ และเมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จะสังเกตเห็นการเรืองแสงของเชื้อที่จับกับอนุภาคนาโน (รูปที่ 4.16)



รูปที่ 4.16 การจับกันของอนุภาคนาโนซิลิกากับเชื้อจุลินทรีย์

(ก) CNPs + O:9,12 + SE

(ง) CNPs + O:9,12 + EC

(ข) CNPs + H:g,m + SE

(จ) CNPs + H:g,m + EC และ

(ค) NNPs + O:9,12 + H:g,m + SE

(ฉ) NNPs + O:9,12 + H:g,m + EC

รูปที่ 4.16 แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนที่ตรึงแอนติบอดีสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ SE ไม่มี ความจำเพาะ (specificity) ในการจับกับเชื้อ SE เนื่องจากสามารถจับกับเชื้อ *Escherichia coli* (EC) ได้ด้วย ซึ่งการจับแบบนี้ถือเป็น non-specific binding ที่ส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของการทดลอง โดยสอดคล้องกับการผลการทดลองของพัชรี [108] ที่นำแอนติบอดีของเชื้อซัลโมเนลลา กรุ๊ป E เคลือบลงบน Dynabeads เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหาร ซึ่งพัชรีได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียชนิด non-Salmonella (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* และ *Enterobacter cloacae*) สามารถเกิดปฏิกิริยาแบบ non-specific binding ต่อ Dynabeads ได้

เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองนั้นเป็น crude serum ที่ยังไม่ได้มีการดูดซับสารอื่น ๆ ออกไป ดังนั้นเมื่อนำมาตรึงลงบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา จึงทำให้สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย ชนิดอื่นนอกจาก SE และ ST ได้

ดังนั้นในการทดลองต่อมา จึงได้เปลี่ยนมาใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อซัลโมเนลลา ซึ่งผลิตโดยใช้เทคนิคฟาจดิสเพลย์ (phage display) จึงมีความจำเพาะสูงต่อโมเลกุลที่เป็นแอนติเจน โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 1 mg/mL (การวิเคราะห์แอนติบอดีไตเตอร์และปริมาณโปรตีนแสดงในภาคผนวก ง) ทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนซิลิกาที่ดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวให้เป็นหมู่คาร์บอกซิล (CNP) และเอมีน (NNP) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาบ่มร่วมกับเชื้อ SE, ST และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (Negative control) ได้แก่ *Escherichia coli* (EC), *Bacillus subtilis* (BS) และ *Staphylococcus aureus* (SA) เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการตรึงผิวของอนุภาคนาโนซิลิกา โดยตรวจสอบการเรืองแสงของอนุภาคนาโน (Positive control) และเชื้อที่มีอนุภาคนาโนเกาะอยู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

ผลการทดลองพบว่าอนุภาคนาโน CNPs และ NNPs มีการเรืองแสงสีแดงเข้มภายใต้การกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 450-490 นาโนเมตร (รูปที่ 4.17) และสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับโมเลกุลของแอนติบอดีได้ ทำให้ใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ SE และ ST อย่างจำเพาะได้ โดยตรวจสอบได้จากการเรืองแสงของเชื้อที่เกาะกับอนุภาคนาโนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เปรียบเทียบกับ Bright field ขณะที่เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น คือ *Escherichia coli* (EC), *Bacillus subtilis* (BS) และ *Staphylococcus aureus* (SA) ไม่พบการเรืองแสงเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากความเฉพาะเจาะจง (high specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้นั้นเอง (รูปที่ 4.18 และ 4.19)

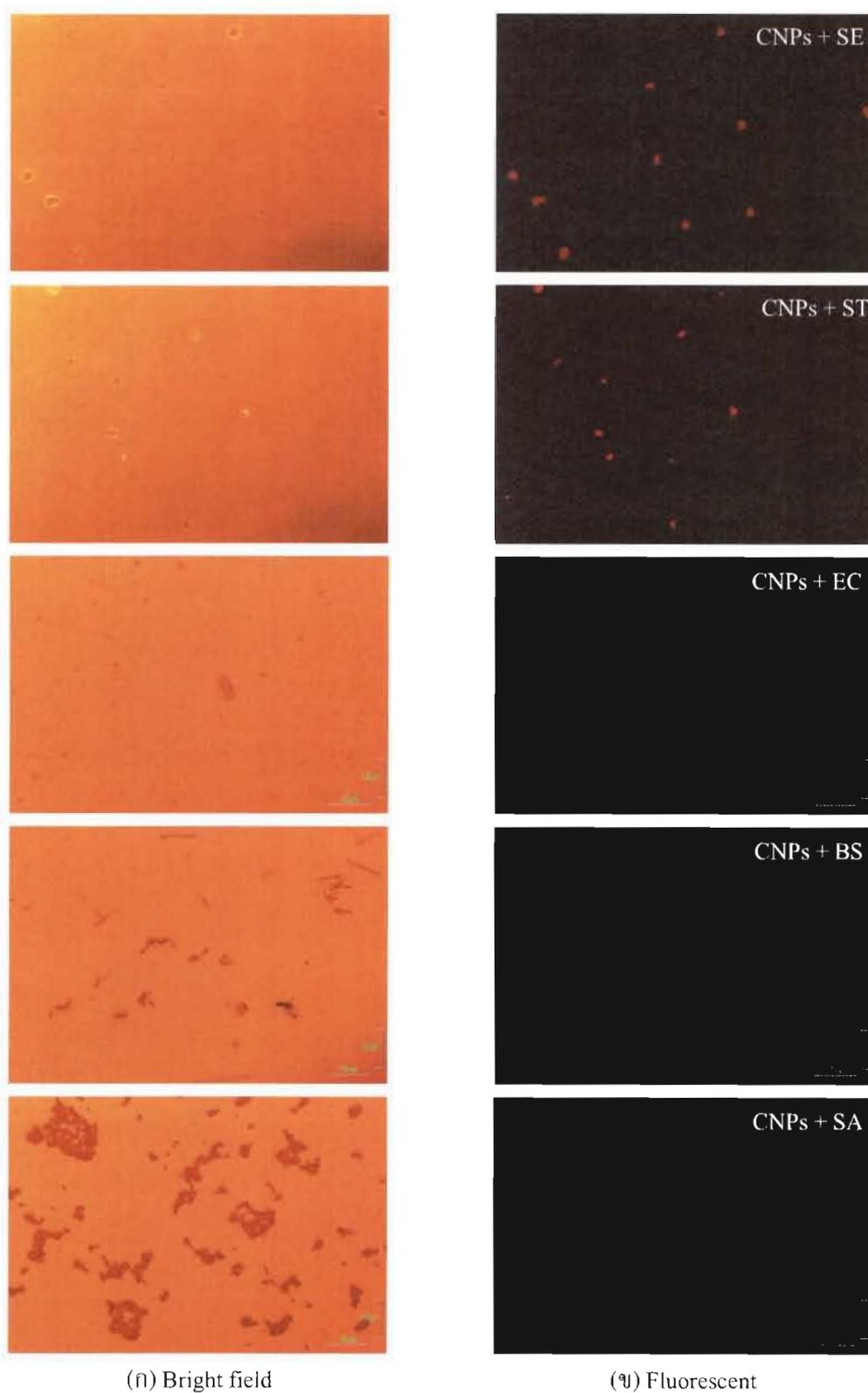


(ก) Bright field

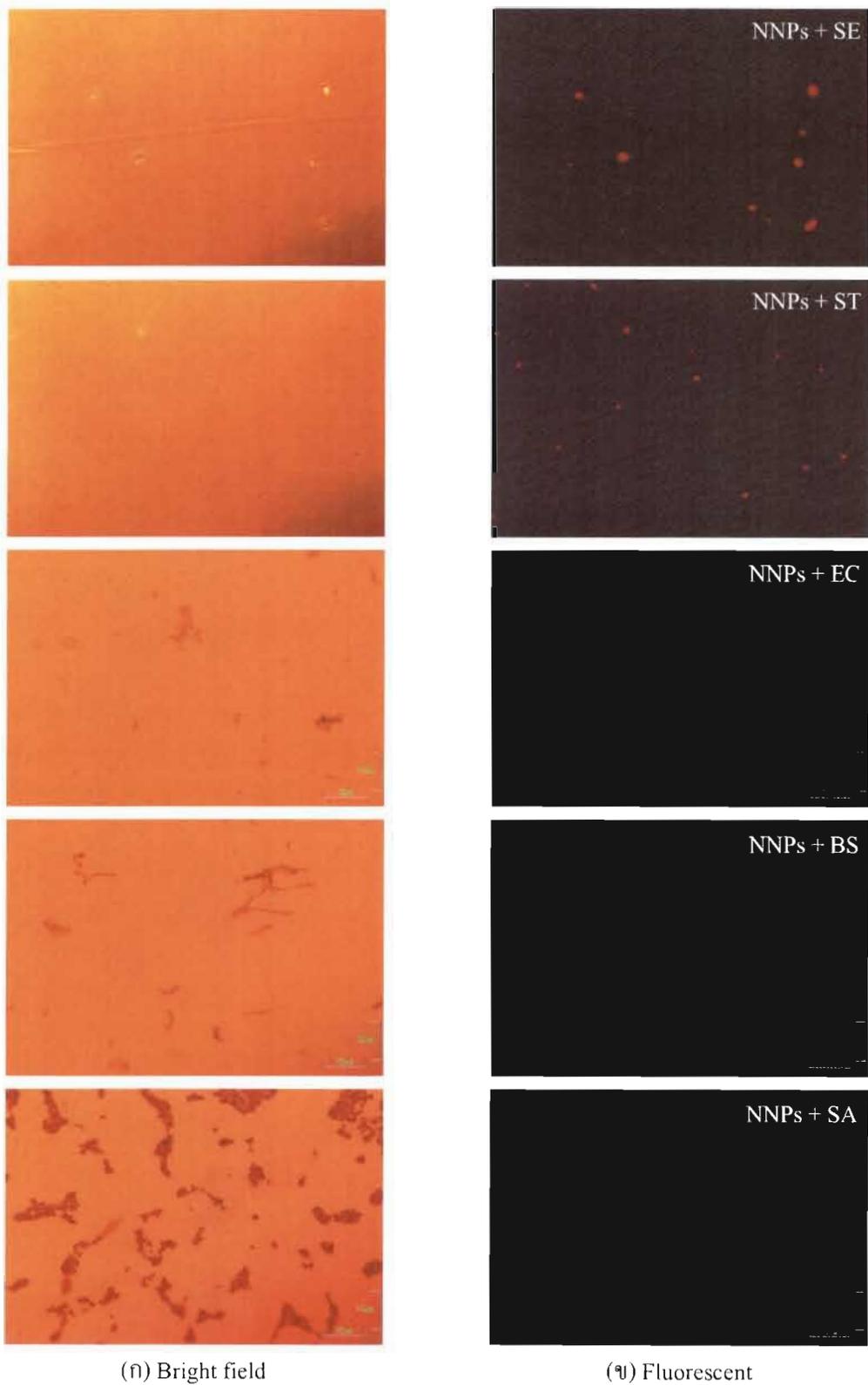


(ข) Fluorescent

รูปที่ 4.17 การเรืองแสงของ NNPs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

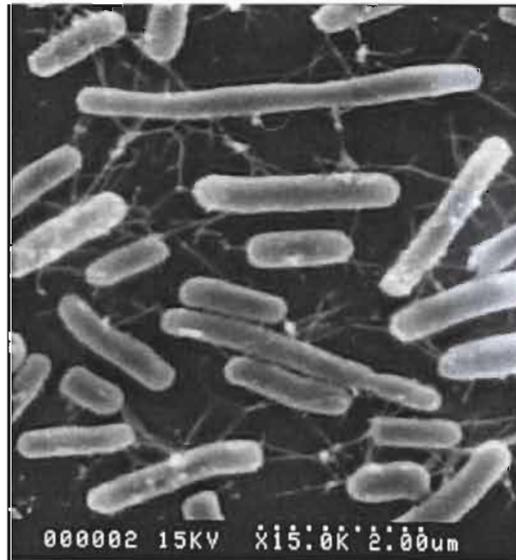


รูปที่ 4.18 การจับกันของอนุภาคนาโน (CNPs) กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ก) เปรียบเทียบกับ Bright field (ข) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

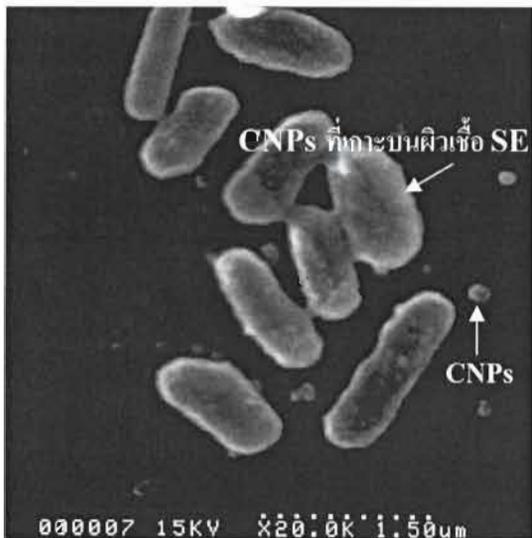


รูปที่ 4.19 การจับกันของอนุภาคนาโน (NNPs) กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ก) เปรียบเทียบกับ Bright field (ข) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

เมื่อนำอนุภาคนาโน CNPs และ NNPs ที่ปนเปื้อนกับเชื้อแบคทีเรีย SE ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่ามีการเกาะของอนุภาคนาโนจำนวนมากบนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย SE (รูปที่ 4.20 และ 4.21) ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย SE เกิดการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ได้



รูปที่ 4.20 ภาพถ่าย SEM ของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Enteritidis SH 272/07 (SE)



(ก) CNPs + SE



(ข) NNPs + SE

รูปที่ 4.21 การจับกันของอนุภาคนาโน CNPs และ NNPs กับเชื้อ SE ภายใต้กล้อง SEM

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ซัล โมเนลลาเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สำคัญมากลำดับต้นๆ ที่ก่อปัญหาโรคติดเชื้อจากอาหารในคน ซึ่งมีรายงานการระบาดทั่วโลก [14, 26, 27, 28] จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัล โมเนลลาให้รวดเร็วเพื่อจำกัดการเกิดโรค ซึ่งในปัจจุบันกระแสของนาโนเทคโนโลยีได้เข้ามามีบทบาทมากขึ้นในวงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ โดยมีการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนซิลิกาในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น *E. coli* O157:H7, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus cereus* [7, 97, 98] ซึ่งอนุภาคนาโนซิลิกามีข้อดีคือ สามารถเตรียมได้ง่าย มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ สามารถดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวได้ง่าย ทำให้สามารถเชื่อมต่อกับ โมเลกุลทางชีวภาพได้หลากหลาย [68, 69, 70]

ในการศึกษานี้ จะเริ่มจากการเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาเพื่อใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อซัล โมเนลลา โดยวิธีไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา (TEOS) ในช่วง 50-700 μL และความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการสังเคราะห์ซิลิกา (NH_4OH) ในช่วง 30-120 μL จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TEOS และ NH_4OH ลงในระบบ จะส่งผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากการเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แต่ขณะเดียวกันค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เพิ่มขึ้นของสารละลายในระบบจะส่งผลให้เสถียรภาพของระบบลดลง นอกจากนั้นการใช้ TEOS และ NH_4OH ที่ความเข้มข้นต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลต่อรูปร่างลักษณะของอนุภาคด้วย โดยอนุภาคอาจมีรูปร่างแบบอสัณฐาน (amorphous shape) หรือเกิดขึ้นตรงกลางอนุภาค (hollow silica)

จากการศึกษาพบว่าการเตรียมอนุภาคนาโนซิลิกาที่มีองค์ประกอบของ $\text{TEOS}:\text{NH}_4\text{OH}$ เท่ากับ 0.1 mL:40 μL (NP3) นั้น จะทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาด 35 นาโนเมตร และมีการกระจายขนาดของอนุภาคในช่วงแคบ ($\text{SD}=3$) เมื่อวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบพบว่ามี ซิลิกา และรูทีเนียม เป็นองค์ประกอบหลัก แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของสีเรืองแสง (รูทีเนียม) ถูกห่อหุ้มอยู่ในโครงร่างของซิลิกา ซึ่งทำให้อนุภาคนาโนสามารถกักคุณสมบัติในการเป็นสารเรืองแสงได้นานกว่าโมเลกุลของสีปกติ เหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งานด้านการติดตามโมเลกุลชีวภาพ

จากนั้นนำอนุภาคนาโนที่เตรียมมาดัดแปลงพันธะเคมีบริเวณผิวด้านนอก โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่บริเวณผิวของอนุภาคให้เป็นหมู่คาร์บอกซิล (COO) และเอมีน (NH_2) ตามลำดับก่อนจะตรึงกับแอนติบอดีที่จำเพาะสำหรับเชื้อซัล โมเนลลา โดยการทดลองนี้ได้ใช้แอนติบอดี 2 ชนิด

คือ แอนติบอดีที่เป็น crude serum (โพลีโคลนอลแอนติบอดี) และ โมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าแอนติบอดีทั้งสองชนิดสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาได้ แต่แอนติบอดีที่เป็น crude serum ไม่มีความจำเพาะเจาะจง (non-specific binding) ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิด non-Salmonella

การตรวจสอบการจับกันของอนุภาคนาโนซิลิกา กับเชื้อซัลโมเนลลา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่ามีอนุภาคนาโนเป็นจำนวนมากเกาะอยู่บริเวณผิวเซลล์ของเชื้อซัลโมเนลลา ทำให้เชื้อเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ได้ วิธีนี้จึงนับว่ามีประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อที่ต้องการผลรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเชื้อซัลโมเนลลาที่ไม่อนุญาตให้พบในอาหาร

เนื่องจากอนุภาคนาโนที่เตรียมได้มีความคงตัวของสีเรืองแสงสูง โดยมี % Bleaching เพียง 0.16 เท่านั้น จึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำไปพัฒนาใช้เป็นตัวติดตามเซลล์ในการศึกษาทางชีววิทยาระดับสูงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Padungtoda, P. and Kaneene, J. B., 2006, “*Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand”, **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 108, pp. 346-354.
2. Saitanu, K., Koowatananukul, C., Jerngklinchan, J. and Sasipreeyajan, J., 1994, “Detection of *Salmonellae* in hen eggs in Thailand”, **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Vol. 25, pp. 324-327.
3. Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornrunangwong, S., Marrnrim, N., Kaneko, K. and Ogawa, M., 1998, “*Salmonella* in broiler chickens in Thailand with special reference to contamination of retail meat with *Salmonella* Enteritidis”, **Journal of Veterinary Medical Science**, Vol. 60, pp. 1233-1236.
4. Afflu, L. and Gyles, C. L., 1997, “A comparison of procedures involving single step *Salmonella*, 1-2 Test, and Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for detection of *Salmonella* in group beef”, **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 37, pp. 241-244.
5. Swaminathan, B. and Feng, P., 1994, “Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria”, **Annual Review of Microbiology**, Vol. 48, pp. 401-426.
6. Wang, L., Zhao, W. and Tan, W., 2008, “Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications”, **Nano Research**, Vol. 1, pp. 99-115.
7. Tan, W., Zhao, X., Hilliard, L. R., Mechery, S. J., Wang, Y., Bagwe, R. P. and Jin, S., 2004, “A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles”, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Vol. 101, pp. 15027-15032.

8. Lian, W., Litherland, S. A., Badrane, H., Tan, W., Wu, D., Baker, H. V., Gulig, P. A., Lim, D. V. and Jin, S., 2004, "Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles", **Analytical Biochemistry**, Vol. 334, pp. 135-144.
9. D'Aoust J.-Y., 1989, "*Salmonella*", In **Foodborne Bacterial Pathogens**, Doyle, M. P. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., pp. 327-445.
10. Le Minor, L., 1981, "The genus *Salmonella*", In **The Prokaryotes**, Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G. (Eds.), Springer-Verlag, New York, N. Y., pp. 1148-1159.
11. อรุณ บำงตระกูลนนท์, 2540, "การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารและผลิตภัณฑ์ : ผลการสำรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในประเทศไทย", การสัมมนาเรื่องความก้าวหน้าในการตรวจหาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ, บริษัทเมอร์ค จำกัด, กรุงเทพฯ.
12. White, P. B., 1926, **Further Studies of the *Salmonella* Group**, H. M. Stationery Office, Oxford, p. 103.
13. Popoff, M. Y., Bockemuhl, J. and Brenner, F. W., 2000, "Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme", **Research in Microbiology**, Vol. 151, pp. 63-65.
14. Acha, P. N. and Szyfres, B., 2001, **Zoonoses and Communicable Disease Common to Man and Animals**, 3rd ed. Pan American Health Organization Pan American Sanitary Bureau Regional Office of the World Health Organization, Washington, D. C.
15. Bailey, S. J. and Maurer, J. J., 2001, "*Salmonella* species", In **Food Microbiology : fundamentals and frontiers**, Montville, T. J. (Ed.), ASM Press, Washington, D. C., p. 872.
16. Wikipedia the free encyclopedia, *Salmonella* [Online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Salmonella> [2007, February 25]

17. Popoff, M. Y. and Le Minor, L., 1997, **Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars**, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut. Pasteus, France.
18. Popoff, M. Y., 2001, **Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars**, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut. Pasteus, France, p. 150.
19. Salyers, A. A. and Whitt, D. D., 1994, **Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach**, ASM Press, Washington, D. C., pp. 650-658.
20. Andrew, W. H., Bruce, V. R., June, G. A., Sherrod, P., Hammack, T. S. and Amaguana, R. M., 1995, **Bacteriological Analytical Manual**, 8th ed., AOAC International, Gaithersburg, Md., p. 1.
21. Mirkin, C.A., 2003, **Introduction to Enterobacteriaceae** [Online], Available : <http://www.ratsteachmicro.com/Assets/Enterobacteriaceae/> [2007, March 23]
22. Fall, N.J., 2000, **BSCT 424 Pathogenic Microbiology** [Online], Available : <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Salmonella.htm> [2007, April 29]
23. Blake, P. A., Weaver, R. E. and Hollis, D. G., 1980, "Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*", **Annual Review of Microbiology**, Vol.34, pp. 341-367.
24. Jay, J. M., 1992, **Modern Food Microbiology**, 4th ed., Chapman&Hall, New York, pp. 431-467.
25. Sakazaki, R., 1979, "Food-borne infections and intoxications", In **Food Science and Technology**, Bryan, F. L. (Ed.), Academic Press, New York, p. 748.

26. Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornrunangwong, S., Marnrim, N., Kaneko, K. and Ogawa, M., 1998, "Predominant serovars of *Salmonella* in humans and foods from Thailand", **The Journal of Veterinary Medical Science**, Vol. 60, pp. 877-880.
27. NSSC, 2000, **Annual Report of Confirmed *Salmonella* and *Shigella* in Thailand**, National *Salmonella* and *Shigella* center, Department of Medical Science, Ministry of Public Health.
28. Sasipreeyajan, J., Jerngklinchan, J., Koowatananukul, C. and Saitanu, K., 1996, "Prevalence of *Salmonella* in broiler, layer and breeder flocks in Thailand", **Tropical Animal Health and Production**, Vol. 28, pp. 174-180.
29. Thorns, C. J., 2000, "Bacterial food-borne zoonoses", **Review of Science and Technology**, Vol. 19, pp. 226-239.
30. International Association of Milk Food and Environmental Sanitations, 1999, **Procedures to Investigate Foodborne Illness**, 5th ed., Des Moines, Iowa, USA.
31. Olsen, S. J., MacKinnon, L. C., Goulding, J. S., Bean, N. H. and Slutsker, L., 2000, "Surveillance for foodborne-disease outbreaks United States 1993-1997", **MMWR CDC Surveillance Summaries**, Vol. 49, pp. 1-62.
32. Varavithya, W., Vathanophas, K., Bodhidatta, L., Punyaratabandhu, P., Sangchai, R., Athipanyakom, S., Wasi, C. and Echeverria, P., 1990, "Importance of *Salmonellae* and *Campylobacter jejuni* in the etiology of diarrheal disease among children less than 5 years of age in a community in Bangkok Thailand", **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 28, pp. 2507-2510.
33. Hanson, R., Kaneene, J. B., Padungtod, P., Hirokawa, K. and Zeno, C., 2002, "Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* and their resistance to antimicrobial agents in farming communities in Northern Thailand", **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Vol. 33, pp. 120-126.

34. Peterson, R. and Trümper, K., 1997, "European Standard EN 12824", **European Committee for Standardization**, Vol. 219, pp. 171-177.
35. D' Aoust, J.-Y., Sewell, A. M. and Warburton, D. W., 1992, "A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 16, pp. 41-50.
36. Chen, H., Fraser, A. D. E. and Yamazaki, H., 1993, "Evaluation of the toxicity of *Salmonella* selective media for shortening the enrichment period", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 18, pp. 151-159.
37. O' Donoghue, D. and Winn, E., 1993, "Comparison of the MSRV method with an in-house conventional method for the detection of *Salmonella* in various high and low moisture foods", **Letters in Applied Microbiology**, Vol. 17, pp. 174-177.
38. Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F. and Colin, P., 1997, "Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp. from poultry products", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 38, pp. 222-216.
39. Allen, G., Bruce, V. R., Stephenson, P., Satchell, F. B. and Andrews, W. H., 1991, "Recovery of *Salmonella* from high moisture foods by abbreviated selective enrichment", **Journal of Food Protection**, Vol. 54, pp. 492-495.
40. Maijala, R., Johansson, T. and Hiern, J., 1992, "Growth of *Salmonella* and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis (RV) media", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 17, pp. 1-8.
41. June, G. A., Sherrod, P. S., Hammack, T. S., Amaguana, R. M. and Andrews, W. H., 1996, "Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. from raw flesh, highly contaminated foods and poultry feed: collaborative study", **Journal of AOAC International**, Vol. 79, pp. 1307-1323.

42. Fries, R. and Steinhof, U., 1997, "Growth kinetics of *Salmonella* in mixed cultures incubated in Rappaport-Vassiliadis medium", **Food Microbiology**, Vol. 14, pp. 503-513.
43. De Boer, E., 1998, "Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 45, pp. 43-45.
44. Waltman, W. D., Horne, A. M. and Prikle, C., 1993, "Influence of enrichment incubation time on the isolation of *Salmonella*", **Avian Diseases**, Vol. 37, pp. 884-887.
45. D' Aoust, J.-Y., Sewell, A. M. and McDonald, C., 1995, "Recovery of *Salmonella* spp. from refrigerated pre-enrichment cultures of dry food composites", **Journal of AOAC International**, Vol. 78, pp. 1322-1324.
46. O' Donoghue, D., Morgan, R., Pugh, S. and Davda, C., 1992, "Comparison of the MSRV method with various rapid and conventional *Salmonella* detection methods for chocolate, confectionary and biscuit ingredients", **Letters in Applied Microbiology**, Vol. 15, pp. 92-95.
47. Pless, P., Asperger, H. and Schopf, E., 1993, "Erweiterte Einsatzmöglichkeiten eines modifizierten Beweglichkeitsmediums (MSRV medium) für den Salmonellennachweis", **Archives Lebensmittel**, Vol. 44, pp. 125-127.
48. Oggel, J. J., Nundy, D. C., Zebchuk, P. A. and Shaw, S. J., 1995, "Reliability of the modified 1-2 TestTM system for detection of *Salmonella* on poultry feeds", **Journal of Food Protection**, Vol. 58, pp. 98-101.
49. Bolderdijk, R. F. and Milas, J. E., 1996, "*Salmonella* detection in dried milk products by motility enrichment on Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis medium : collaborative study", **Journal of AOAC International**, Vol. 79, pp. 441-450.
50. Schalch, B. and Eisgruber, H., 1997, "Nachweis von Salmonellen mittels MSRV-medium", **Fleischwirtschaft**, Vol. 77, pp. 344-347.

51. Pless, P. and Reissbrodt, R., 1995, "Improvement of *Salmonella* detection on motility enrichment media by ferrioxamine E - supplementation of pre-enrichment culture", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 27, pp. 147-159.
52. Payne, M. J. and Kroll, R. G., 1991, "Methods for the separation and concentration of bacteria from foods", **Trends in Food Science and Technology**, Vol. 2, pp. 315-319.
53. The International Organization for Standardization (ISO), 2002, "Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for Detection of *Salmonella* spp.", **International Standard**, ISO/FDIS 6579:2002 (E).
54. De Bore, E. and Beumer, R. R., 1999, "Methodology for detection and typing foodborne microorganisms", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 50, pp. 119-130.
55. Pettipher, G. L., 1983, "The Direct Epifluorescent Filter Technique for the Rapid Enumeration of Microorganisms", **Research Studies Press Ltd.**, Letchworth, England, p. 193.
56. MacKenzie, N. M. and Pinder, A. C., 1987, "Flow cytometry and its applications in veterinary medicine", **Research in Veterinary Science**, Vol. 42, pp. 31-139.
57. Ogden, K., 1993, "Practical experiences of hygiene control using ATP bioluminescence", **Journal of the Institute of Brewing and Distilling**, Vol. 99, pp. 389-393.
58. Fung, D. Y. C., 1994, "Rapid methods and automation in food microbiology: a review", **Food Reviews International**, Vol. 10, pp. 3357-3375.
59. Mattila, T., 1987, "Automated turbidometry - a method for enumeration of bacteria in food samples", **Journal of Food Protection**, Vol. 50, pp. 640-642.
60. AOAC International, 2003, **Rapid Test Kits** [Online], Available : <http://www.aoac.org/testkits/microbiologykits.htm> [2007, June 25]

61. Deak, T. and Beuchat, L. R., 1995, "Modified indirect conductimetric technique for detecting low populations of yeasts in beverage concentrates and carbonated beverages", **Food Microbiology**, Vol. 12, pp. 165-172.
62. Simpson, W. J., Hammond, J. R. M., Thurston, P. A. and Kyriakides, A. L., 1989, "Brewery Process Control and The Role of "Instant" Microbiological Techniques", **Proceedings of the European Brewery Convention**, Zurich, IRL Press, p. 663.
63. Huis in't Veld, J. and Hofstra, H., 1991, "Biotechnology and the quality assurance of foods", **Food Biotechnology**, Vol. 5, pp. 313-322.
64. Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A. V. and Muñoz, R., 2006, "PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine", **Journal of Food Protection**, Vol. 69, pp. 2509-2514.
65. Wikipedia, the free encyclopedia, **Nanoparticles** [Online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanoparticle> [2007, October 25]
66. West, J. L. and Halas, N. J., 2003, "Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics", **Annual Review of Biomedical Engineering**, Vol. 5, pp. 285-292.
67. Santra, S., Wang, K., Tapeç, R. and Tan, W., 2001, "Development of novel dye-doped silica nanoparticles for biomarker application", **Journal of Biomedical Optics**, Vol. 6, pp. 160-166.
68. Wang, L., Wang, K., Santra, S., Zhao, X., Hilliard, L. R., Smith, J. E., Wu, Y. and Tan, W., 2006, "Glow in the biological world", **Analytical Chemistry**, Vol. 78, pp. 647-654.
69. Smith, J. E., Wang, L. and Tan, W., 2006, "Bioconjugated silica-coated nanoparticles for bioseparation and bioanalysis", **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 25, pp. 848-855.

70. Yan, J., Estévez, M. C., Smith, J. E., Wang, K., He, X., Wang, L. and Tan, W., 2007, "Dye-doped nanoparticles for bioanalysis", **Nanotoday**, Vol. 2, pp. 44-50.
71. Wikipedia, the free encyclopedia, **Sol-Gel** [Online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Sol-gel> [2008, May 11]
72. Aksay, I.A., 2000, **Sol-Gel Chemistry** [Online], Available: <http://phys.suwon.ac.kr/~jgyoon/lab/solgel.htm> [2008, May 11]
73. Wen, L., 2004, **Sol-Gel Technology** [Online], Available: <http://www.chemat.com/html/solgel.html> [2008, May 11]
74. Yamashita, I., 2008, **Simulations of Sol Gel Materials** [Online], Available: <http://www.chemistry.wustl.edu/~gelb/solgel.html> [2008, May 11]
75. Stöber, W., Fink, A. and Bohn, E., 1968, "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range", **Journal of Colloid and Interface Science**, Vol. 26, pp. 62-69.
76. Yoshio, K., 2005, **Silica Coating of Silver Nanoparticles Using a Modified Stöber Method** [Online], Available: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=18607634> [2007 May 28]
77. Wikipedia, the free encyclopedia, **Microemulsion** [Online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Microemulsion> [2007, October 11]
78. Tang, X., 2007, **Microemulsion and Its Phase Diagram** [Online], Available: www.chem.leidenuniv.nl/cis/presentations/xiaohua.pdf [2007, October 11]
79. Skagerlind, P., 2002, **Effect of the Surfactant in Microemulsion System** [Online], Available: www.informaworld.com/index/775988844.pdf [2007, October 11]

80. Wikipedia, the free encyclopedia, **Surfactant** [Online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Surfactant> [2007, October 11]
81. Tan, W., Bagwe, R. P. and Hilliard, L. R., 2006, "Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding", **Langmuir**, Vol. 22, pp. 4357-4362.
82. Hilliard, L. R., Zhao, X. and Tan, W., 2002, "Immobilization of oligonucleotides onto silica nanoparticles for DNA hybridization studies", **Analytica Chimica Acta**, Vol. 470, pp. 51-56.
83. Tapeç, R., Zhao, X. and Tan, W., 2002, "Development of organic dye-doped silica nanoparticles for bioanalysis and biosensors", **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Vol. 2, pp. 405-409.
84. Wikipedia, the free encyclopedia, **Electron Microscope** [Online], Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Electron_microscope [2007, August 19]
85. Wikipedia, the free encyclopedia, **Transmission Electron Microscopy** [Online], Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscope [2007, August 19]
86. Wikipedia, the free encyclopedia, **Scanning Electron Microscopy** [Online], Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_Electron_Microscope [2007, August 19]
87. Wikipedia, the free encyclopedia, **Energy Dispersive X-ray Spectroscopy** [Online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/EDAX> [2008, October 31]
88. Silicon Cert Ltd., 2005, **Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)** [Online], Available: <http://www.siliconcert.com/eds.htm> [2008, October 31]
89. Wikipedia, the free encyclopedia, **Spectrofluorometer** [Online], Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Spectrofluorometer> [2007, November 13]

90. Rao, K. S., El-Hami, K., Kodaki, T., Matsushige, K. and Makino, K., 2005, "A novel method for synthesis of silica nanoparticles", **Journal of Colloid and Interface Science**, Vol. 289, pp. 125-131.
91. Lee, M. H., Beyer, F. L. and Furst, E. M., 2005, "Synthesis of monodisperse fluorescent core-shell silica particles using a modified Stöber method for imaging individual particles in dense colloidal suspensions", **Journal of Colloid and Interface Science**, Vol. 288, pp. 114-123.
92. Santra, S., Liesenfeld, B., Bertolino, C., Dutta, D., Cao, Z., Tan, W. and Moudgil, B. M., 2006, "Fluorescence lifetime measurements to determine the core-shell nanostructure of FITC-doped silica nanoparticles: An optical approach to evaluate nanoparticles photostability", **Journal of Luminescence**, Vol. 117, pp. 75-82.
93. Nakamura, M., Shona, M. and Ishimura, K., 2007, "Synthesis, characterization, and biological applications of multifluorescent silica nanoparticles", **Analytical Chemistry**, Vol. 79, pp. 6507-6514.
94. Santra, S., Zhang, P., Wang, K., Tapeç, R. and Tan, W., 2001, "Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers", **Analytical Chemistry**, Vol. 73, pp. 4988-4993.
95. Tan, W., Wang, L. and Yang, C., 2005, "Dual-luminophore-doped silica nanoparticles for multiplexed signaling", **Nanoletters**, Vol. 5, pp. 37-43.
96. Tan, W. and Wang, L., 2006, "Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation", **Nanoletters**, Vol. 6, pp. 84-88.
97. Tan, W., Wang, L., Zhao, W. and O'Donoghue, M. B., 2007, "Fluorescent nanoparticles for multiplexed bacteria monitoring", **Bioconjugate Chemistry**, Vol. 18, pp. 297-301.

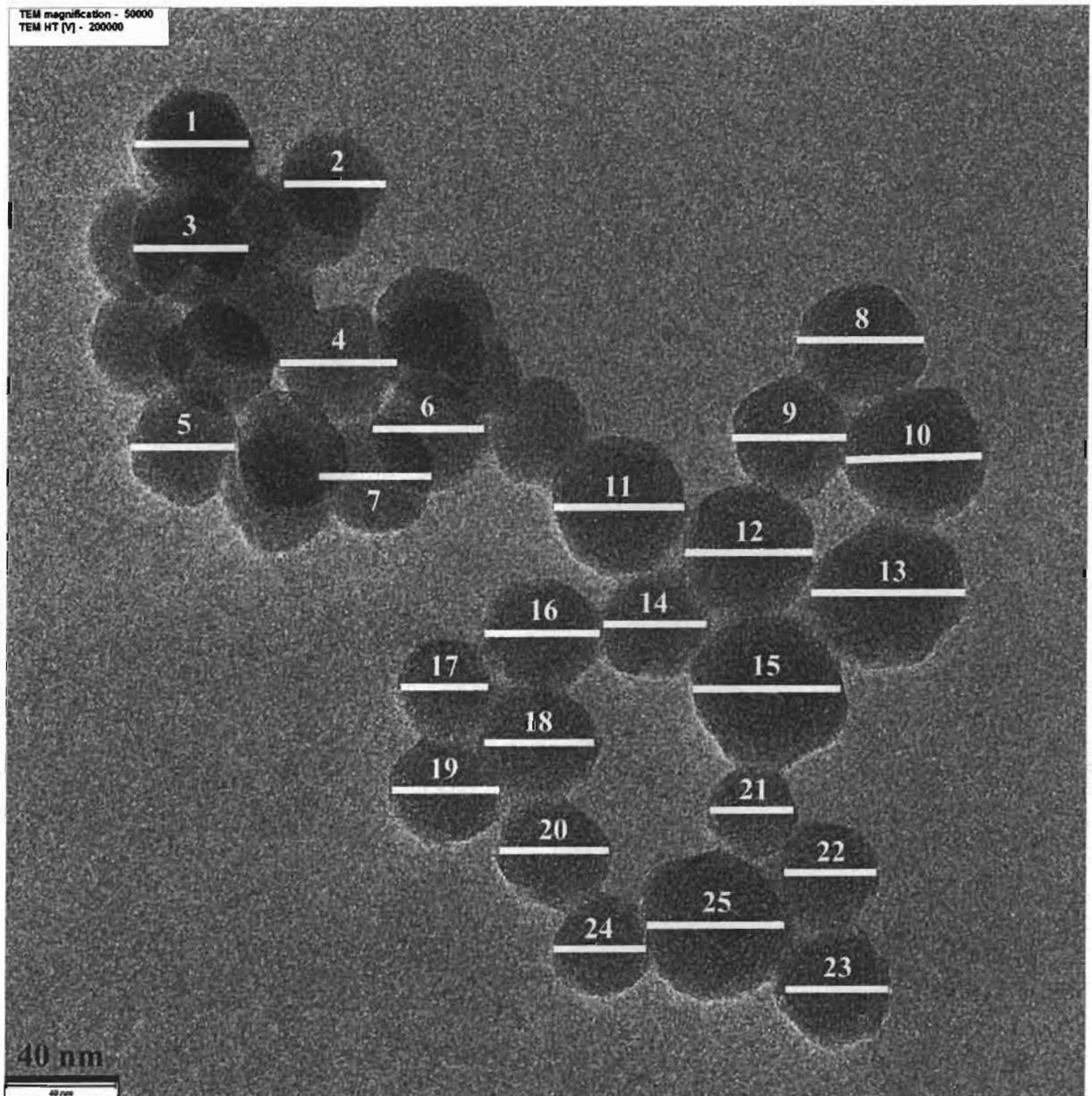
98. Tan, W., Qin, D., He, X., Wang, K., Zhao, X. J. and Chen, J., "Fluorescent nanoparticle-based indirect immunofluorescence microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis*", **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Vol. 7, pp. 1-9.
99. Yuan, J., Ye, Z., Tan, M. and Wang, G., 2004, "Preparation, characterization, and time-resolved fluorometric application of silica-coated terbium (III) fluorescent nanoparticles", **Analytical Chemistry**, Vol. 76, pp. 513-518.
100. Vogel, R., Surawski, P. P. T., Littleton, B. N., Miller, C. R., Lawrie, G. A., Battersby, B. J. and Trau, M., 2007, "Fluorescent organosilica micro- and nanoparticles with controllable size", **Journal of Colloid and Interface Science**, Vol. 310, pp. 144-150.
101. Bogush, G. H. and Zukoski, C. F., 1991, "Studies of the kinetics of the precipitation of uniform silica particles through the hydrolysis and condensation of silicon alkoxides", **Journal of Colloid and Interface Science**, Vol. 142, pp. 1-18.
102. Bogush, G. H., Tracy, M. A. and Zukoski, C. F., 1998, "Preparation of monodisperse silica particles: control of size and mass fraction", **Journal of Non-Crystalline Solids**, Vol. 104, pp. 95-106.
103. Van Helden, A. K., Jansen, J. W. and Vrij, A., 1981, "Preparation and characterization of spherical monodisperse silica dispersions in nonaqueous solvents", **Journal of Colloid and Interface Science**, Vol. 81, pp. 354-368.
104. Masih, D., 2007, **Silica Coated Nanocomposites** [Online], Available : http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/3817/pdf/thesis_final_version_masih_darbandi.pdf [2008, October 13]
105. Matsoukas, T. and Gulari, E., 1998, "Dynamics of growth of silica particles from ammonia-catalyzed hydrolysis of tetra-ethyl-orthosilicate", **Journal of Colloid and Interface Science**, Vol. 124, pp. 252-261.

106. Park, S. K., Kim, K. D. and Kim, H. T., 2002, "Preparation of silica nanoparticles: determination of the optimal synthesis conditions for small and uniform particles", **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Vol. 197, pp. 7-17.
107. Hermanson, G. T., 2008, "Microparticles and Nanoparticles", In **Bioconjugate Techniques**, Hermanson, G.T. (Ed.), Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA, pp. 582-625.
108. พัชรีย์ แก้วดวง, 2547, การพัฒนาวิธี **Immunomagnetic Separation** สำหรับการตรวจหา **Salmonella** ที่พบมากในประเทศไทย, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, หน้า 59-60.

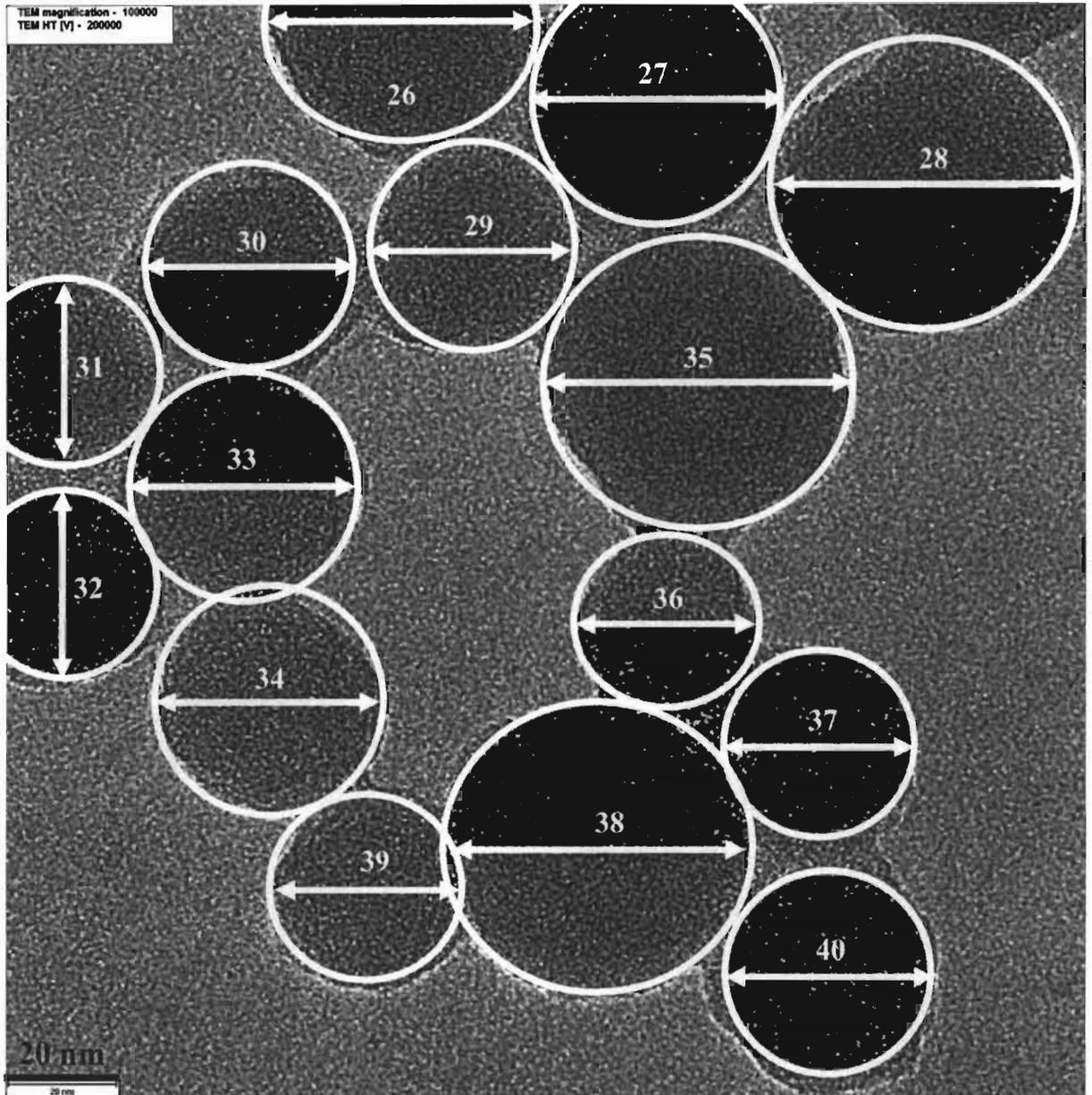
ภาคผนวก ก

การหาขนาดของอนุภาคนาโนซิลิกาจากภาพถ่าย TEM

ก.1 NP1 (50 μ L TEOS : 30 μ L NH_4OH)



รูปที่ ก.1.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP1 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า

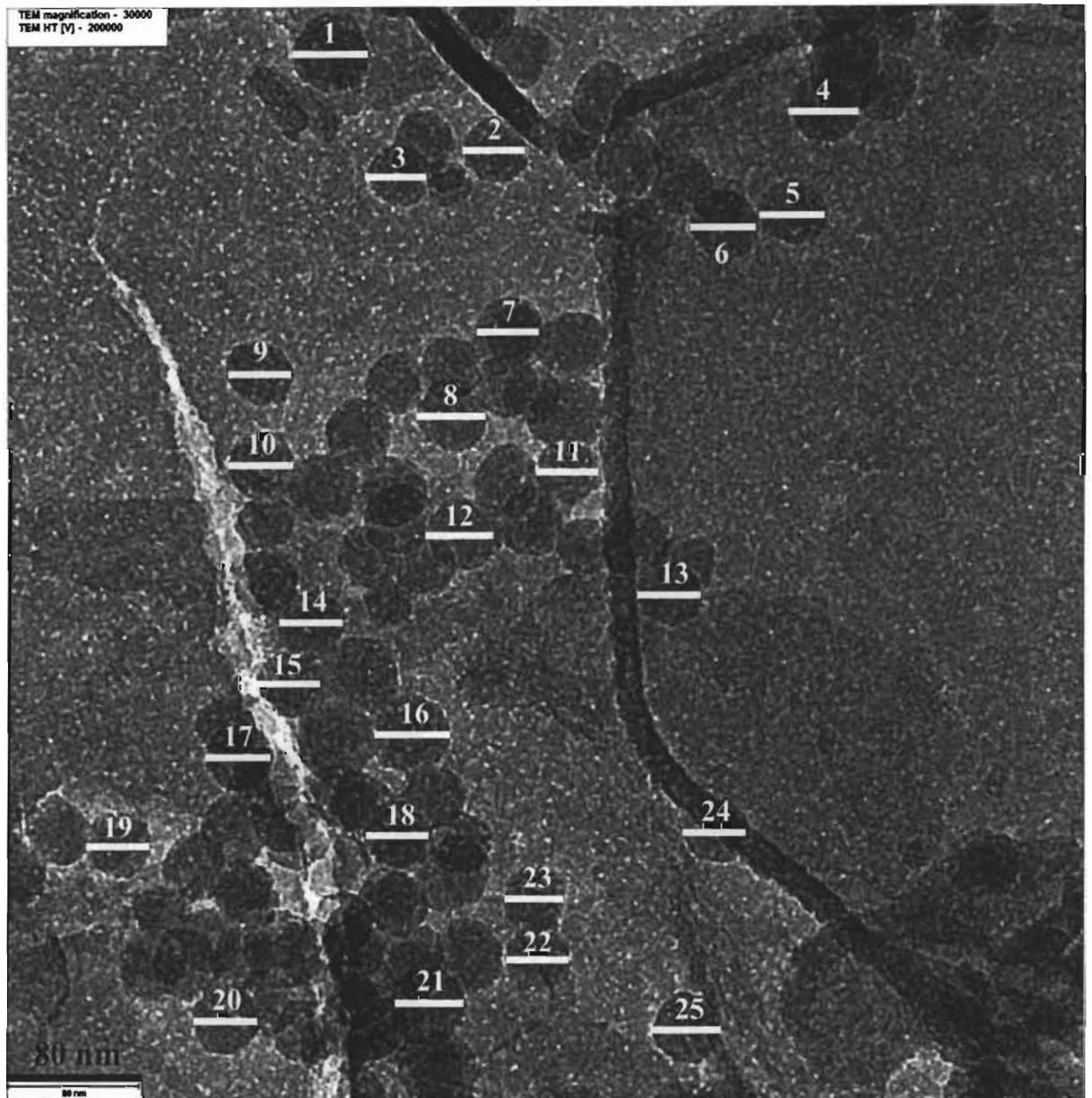


รูปที่ ก.1.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP1 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า

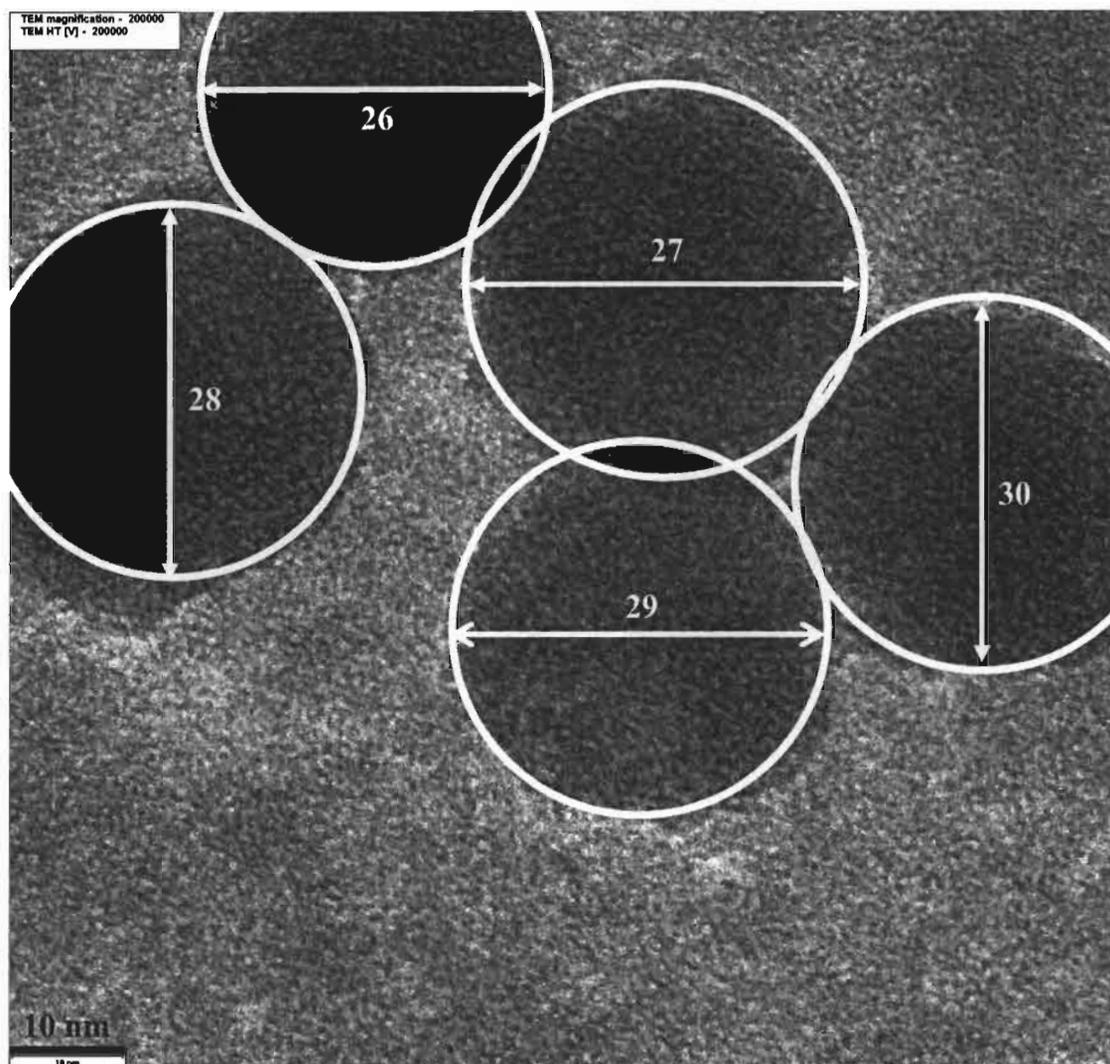
ตารางที่ ก.1 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP1 จากภาพถ่าย TEM

NO.	กำลังขยาย	ขนาดอ้างอิง (cm)	ความยาวจริงจากรูป (cm)	ขนาดอนุภาค (nm)
1	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.74	39.10
2	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.57	35.28
3	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.76	39.55
4	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.80	40.45
5	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.61	36.18
6	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.72	38.65
7	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.74	39.10
8	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.97	44.27
9	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.75	39.33
10	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	2.11	47.42
11	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	2.00	44.94
12	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.96	44.04
13	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	2.40	53.93
14	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.95	43.82
15	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	2.26	50.79
16	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.77	39.78
17	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.35	30.34
18	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.69	37.98
19	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.67	37.53
20	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.69	37.98
21	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.28	28.76
22	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.42	31.91
23	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.59	35.73
24	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	1.42	31.91
25	50,000 เท่า	40 nm (1.78 cm)	2.10	47.19
26	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	4.13	45.89
27	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	3.97	44.11
28	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	4.76	52.89
29	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	3.15	35.00
30	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	3.25	36.11
31	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	2.67	29.67
32	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	2.88	32.00
33	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	3.49	38.78
34	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	3.44	38.22
35	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	4.76	52.89
36	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	2.77	30.78
37	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	2.96	32.89
38	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	4.52	50.22
39	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	2.86	31.78
40	100,000 เท่า	20 nm (1.80 cm)	3.23	35.89
ขนาดอนุภาคเฉลี่ย				39.58
SD				6.35

ก.2 NP2 (0.1 mL TEOS : 60 μ L NH_4OH)



รูปที่ ก.2.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP2 ที่กำลังขยาย 30,000 เท่า

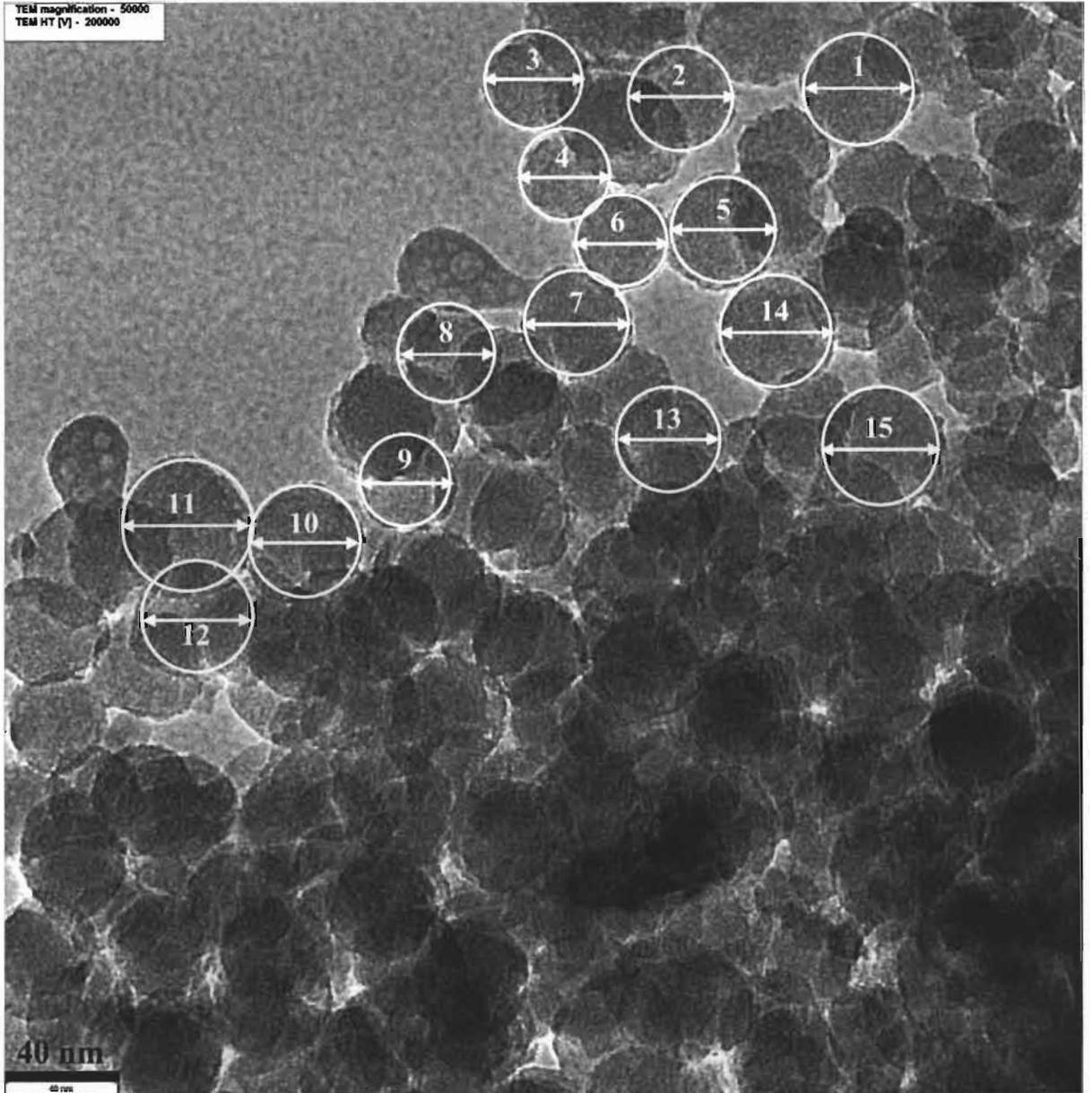


รูปที่ ก.2.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP2 ที่กำลังขยาย 200,000 เท่า

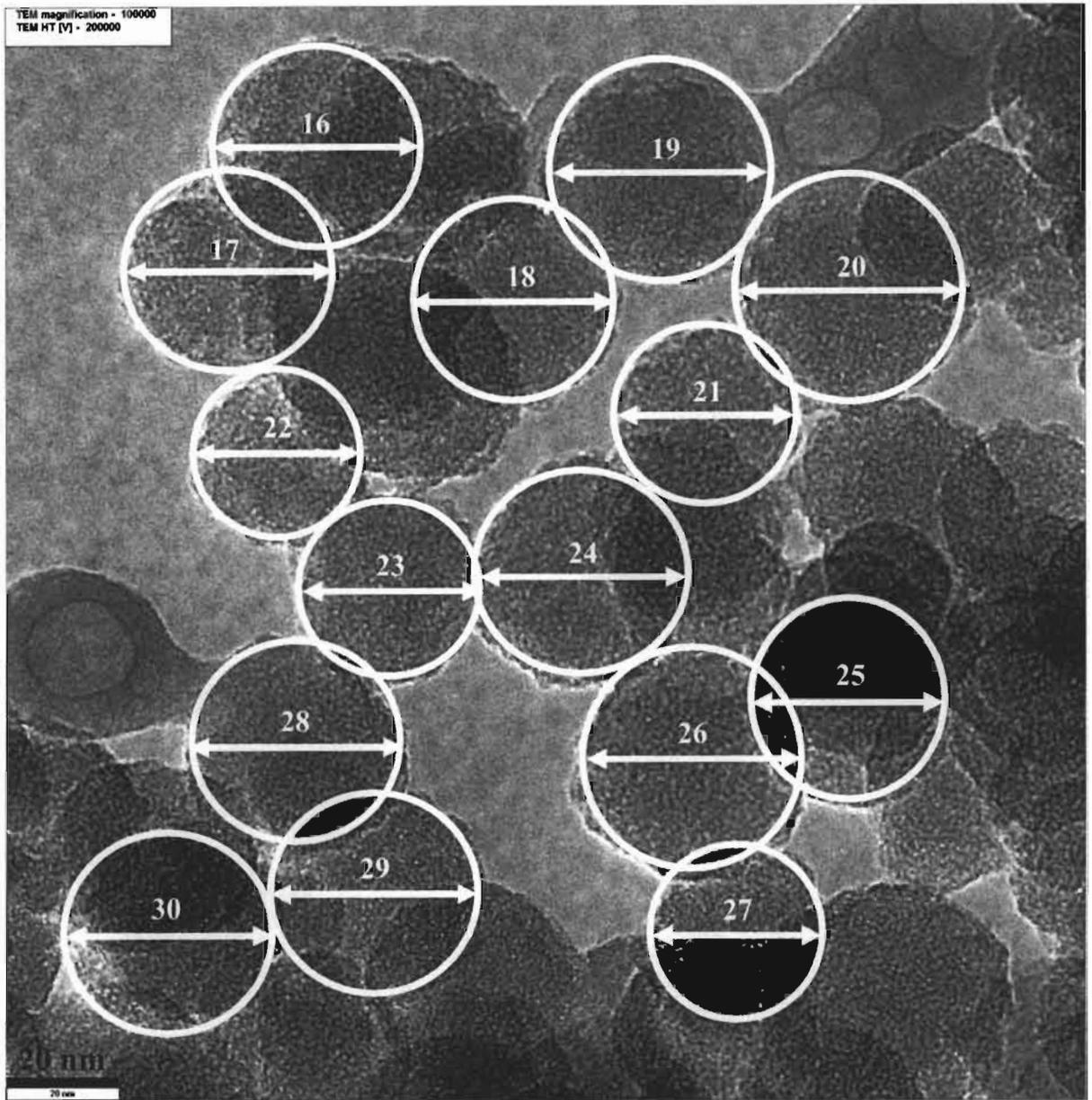
ตารางที่ ก.2 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP2 จากภาพถ่าย TEM

NO.	กำลังขยาย	ขนาดอ้างอิง (cm)	ความยาวจริงจากรูป (cm)	ขนาดอนุภาค (nm)
1	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.17	44.57
2	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
3	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.95	36.19
4	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.07	40.76
5	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.00	38.10
6	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.00	38.10
7	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
8	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.07	40.76
9	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
10	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.00	38.10
11	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
12	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.05	40.00
13	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
14	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
15	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
16	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.17	44.57
17	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.00	38.10
18	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
19	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
20	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
21	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.07	40.76
22	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
23	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.90	34.29
24	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	0.97	36.95
25	30,000 เท่า	80 nm (2.10 cm)	1.07	40.76
26	200,000 เท่า	10 nm (1.59 cm)	4.76	29.94
27	200,000 เท่า	10 nm (1.59 cm)	5.40	33.96
28	200,000 เท่า	10 nm (1.59 cm)	5.08	31.95
29	200,000 เท่า	10 nm (1.59 cm)	5.19	32.64
30	200,000 เท่า	10 nm (1.59 cm)	4.88	30.69
ขนาดอนุภาคเฉลี่ย				37.25

ก.3 NP3 (0.1 mL TEOS : 40 μ L NH_4OH)



รูปที่ ก.3.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP3 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า

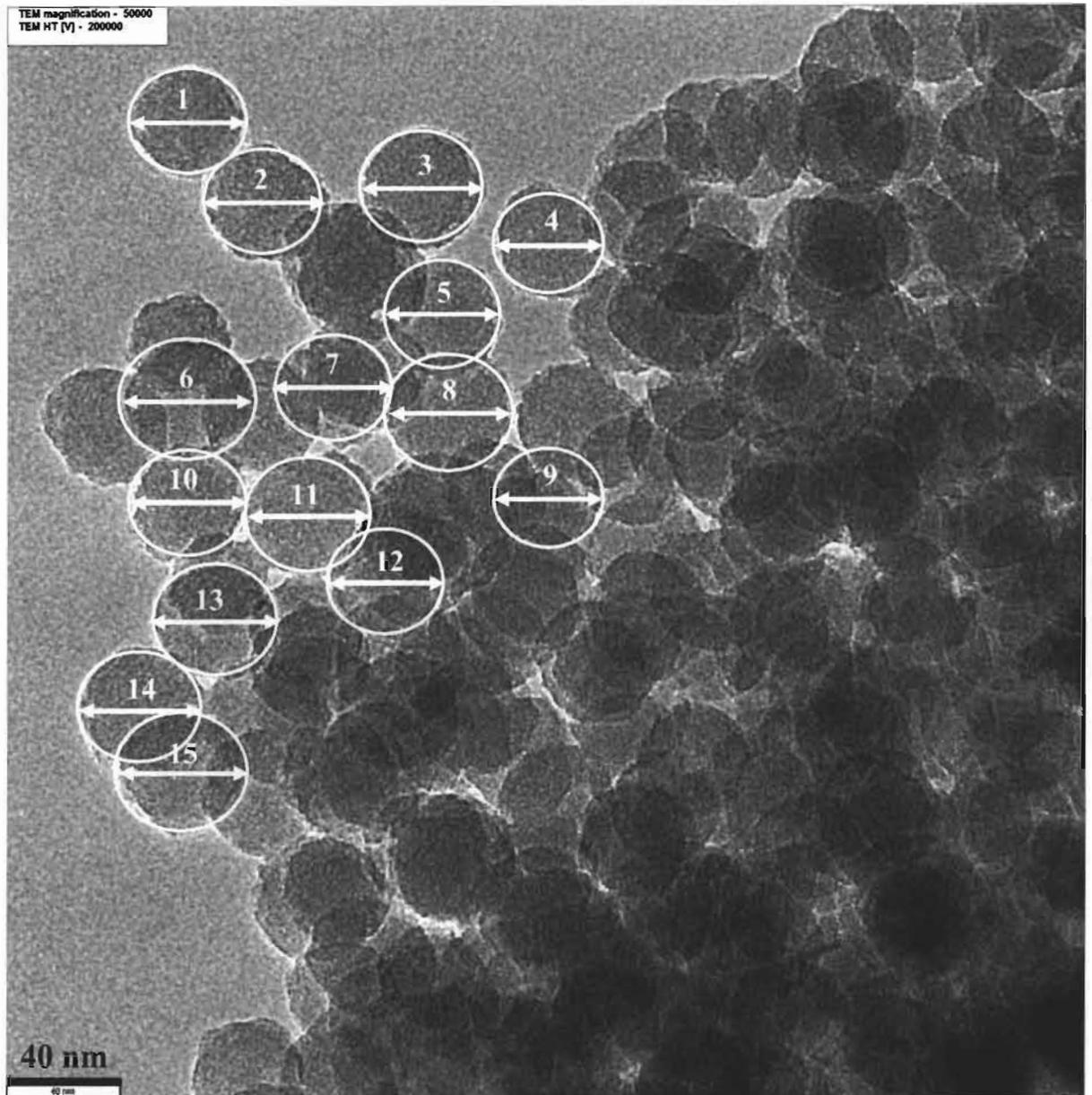


รูปที่ ก.3.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP3 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า

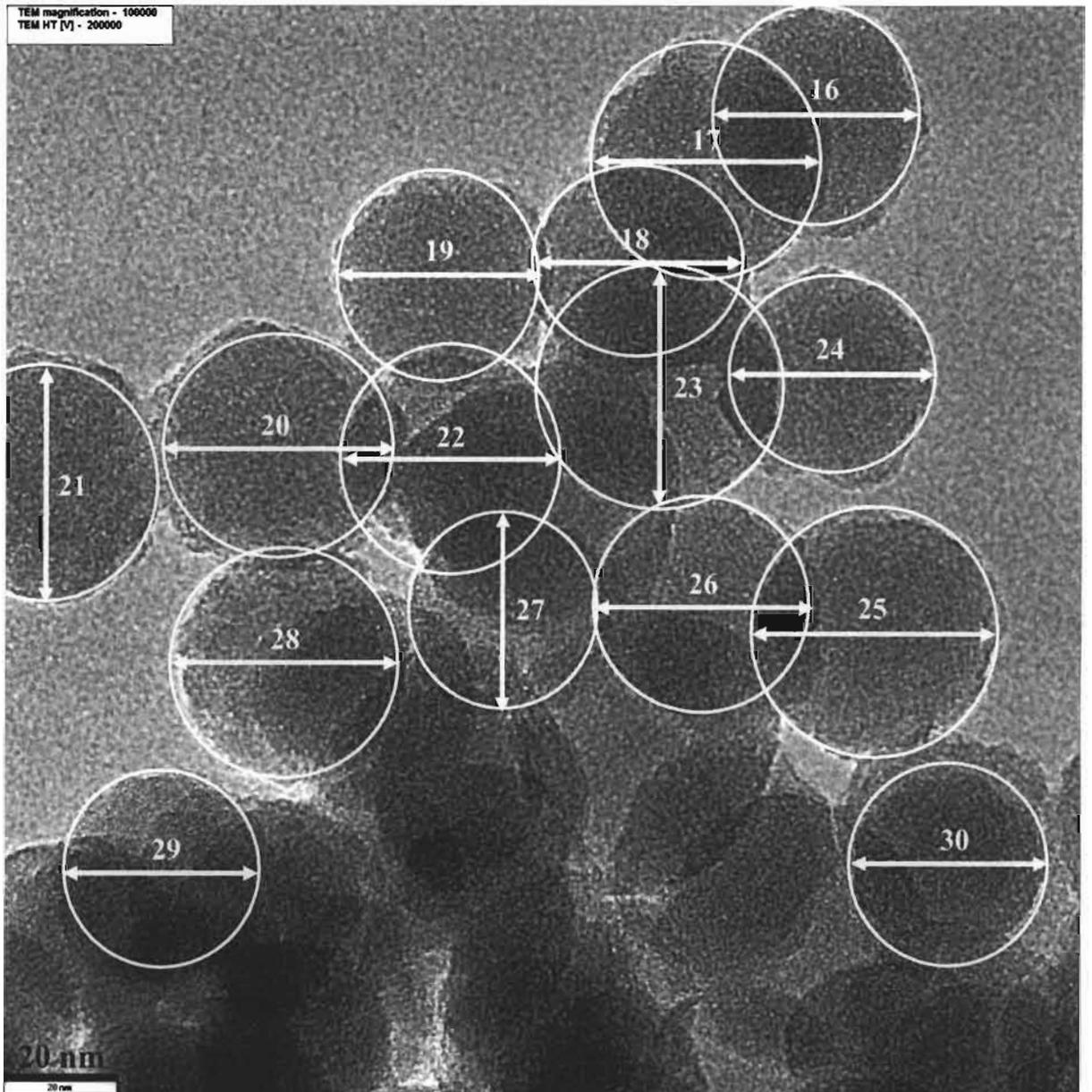
ตารางที่ ก.3 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP3 จากภาพถ่าย TEM

NO.	กำลังขยาย	ขนาดอ้างอิง (cm)	ความยาวจริงจากรูป (cm)	ขนาดอนุภาค (nm)
1	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.69	37.77
2	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.59	35.53
3	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.49	33.30
4	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.39	31.06
5	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.59	35.53
6	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.39	31.06
7	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.59	35.53
8	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.49	33.30
9	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.39	31.06
10	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.69	37.77
11	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.99	44.47
12	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.69	37.77
13	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.59	35.53
14	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.69	37.77
15	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.79	40.00
16	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.18	36.34
17	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.18	36.34
18	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.18	36.34
19	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.28	37.49
20	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.48	39.77
21	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	2.70	30.86
22	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	2.54	29.03
23	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	2.78	31.77
24	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.18	36.34
25	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	2.96	33.83
26	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.28	37.49
27	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	2.59	29.60
28	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.28	37.49
29	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.18	36.34
30	100,000 เท่า	20 nm (1.75 cm)	3.18	36.34
ขนาดอนุภาคเฉลี่ย				35.43
SD				3.42

ก. 4 NP4 (0.1 mL TEOS : 80 μ L NH_4OH)



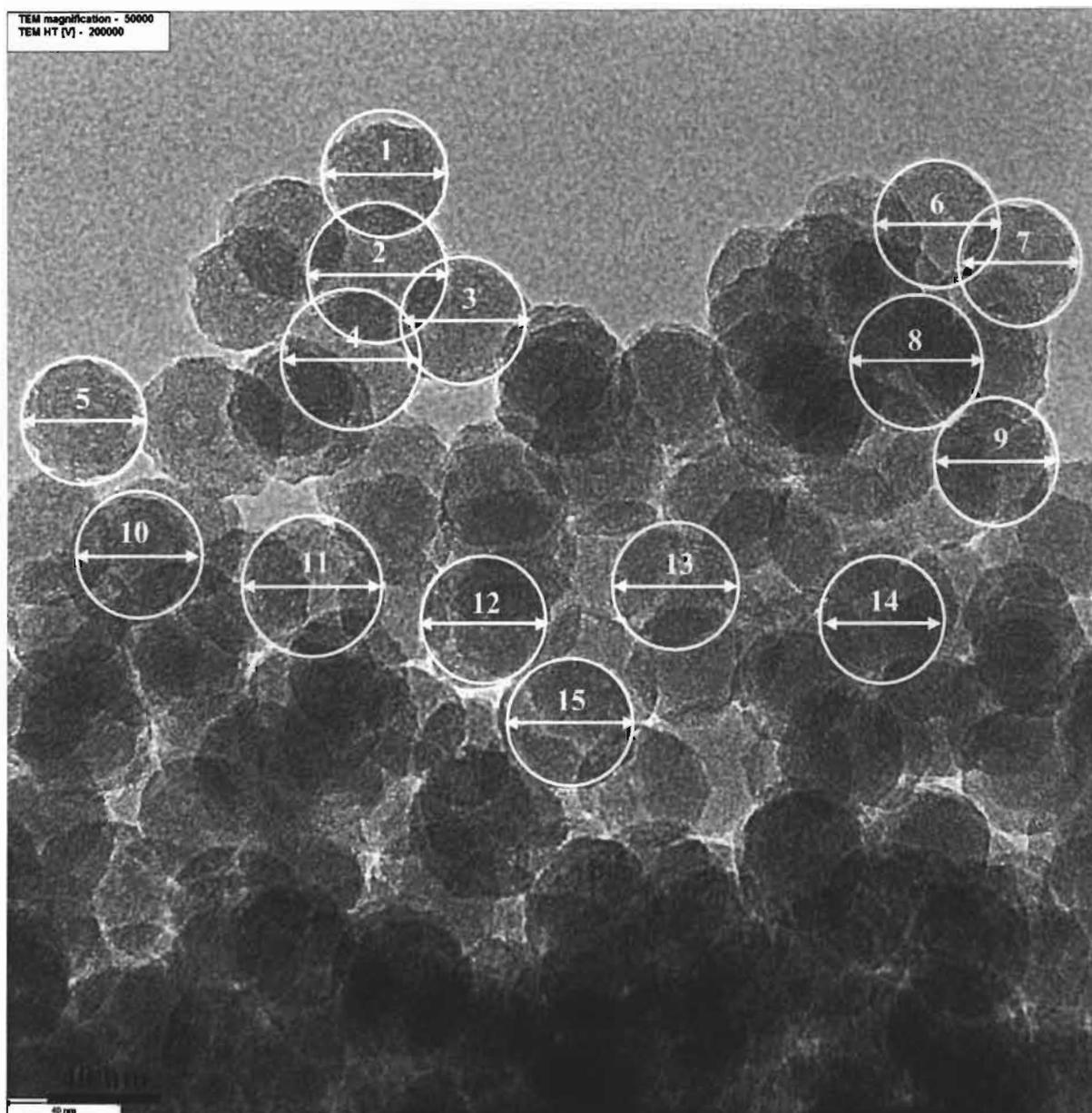
รูปที่ ก.4.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP4 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า



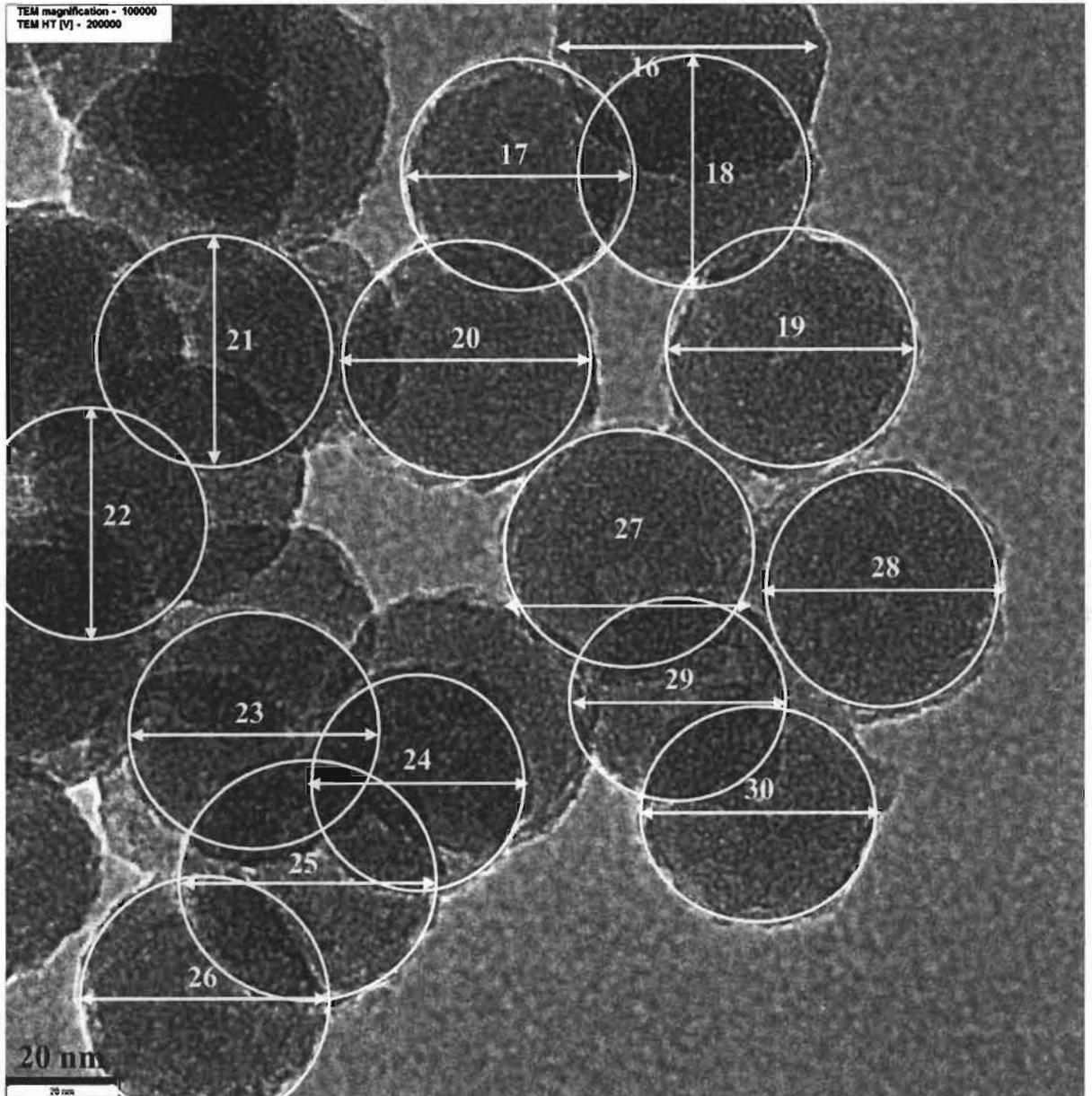
รูปที่ ก.4.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP4 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า

ตารางที่ ก.4 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP4 จากภาพถ่าย TEM

NO.	กำลังขยาย	ขนาดอ้างอิง (cm)	ความยาวจริงจากรูป (cm)	ขนาดอนุภาค (nm)
1	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.79	40.00
2	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.89	42.23
3	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.89	42.23
4	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.69	37.77
5	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.79	40.00
6	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.99	44.47
7	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.89	42.23
8	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.89	42.23
9	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.69	37.77
10	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.79	40.00
11	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.89	42.23
12	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.79	40.00
13	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.99	44.47
14	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.89	42.23
15	50,000 เท่า	40 nm (1.79 cm)	1.99	44.47
16	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.18	35.53
17	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.48	38.88
18	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.18	35.53
19	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.18	35.53
20	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.58	40.00
21	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.59	40.11
22	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.38	37.77
23	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.59	40.11
24	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.18	35.53
25	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.78	42.23
26	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.38	37.77
27	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.06	34.19
28	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.48	38.88
29	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.01	33.63
30	100,000 เท่า	20 nm (1.79 cm)	3.08	34.41
ขนาดอนุภาคเฉลี่ย				39.41
SD				3.18

ก. 5 NP5 (0.3 mL TEOS : 60 μ L NH_4OH)

รูปที่ ก.5.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP5 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า

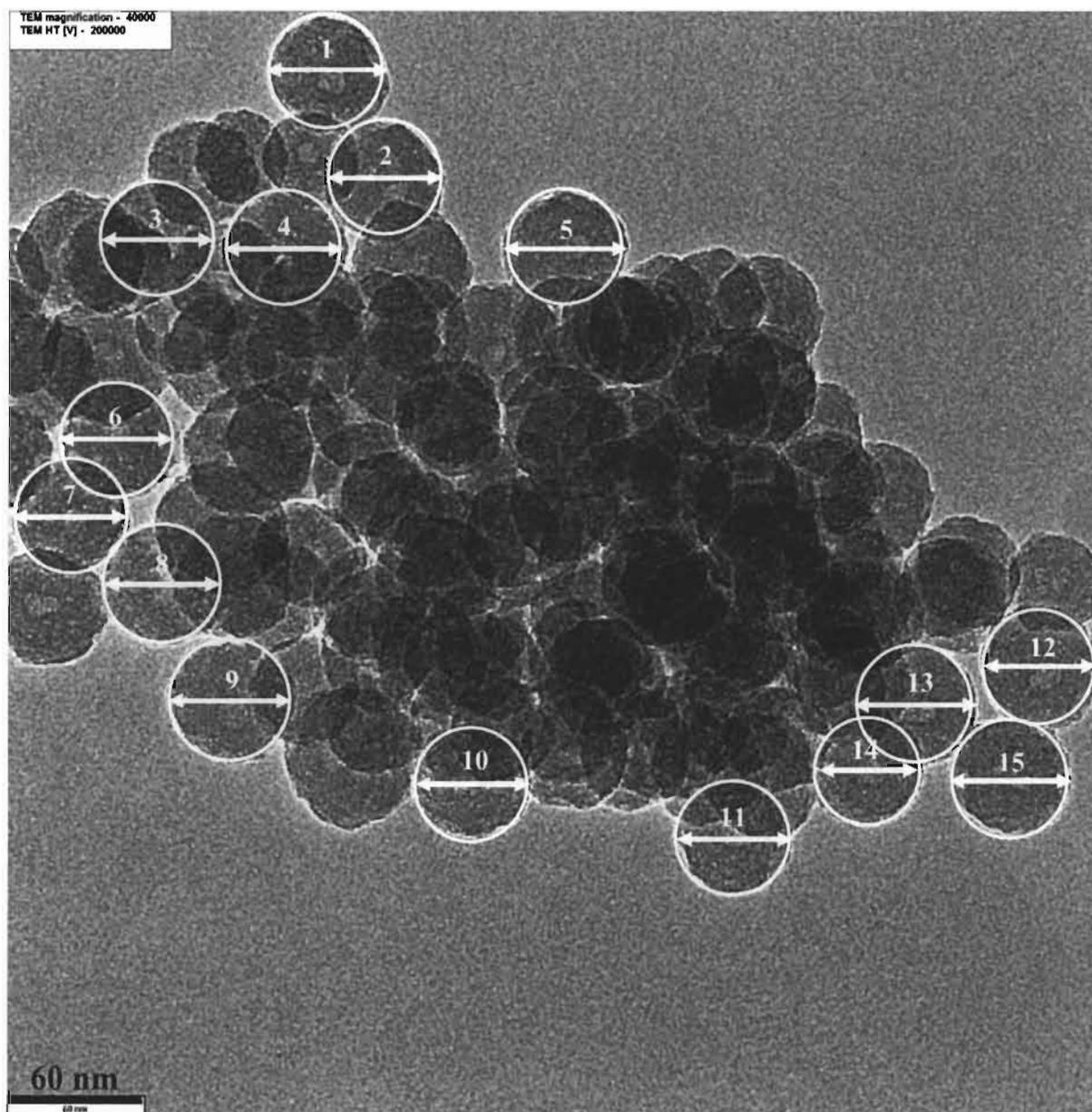


รูปที่ ก.5.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP5 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า

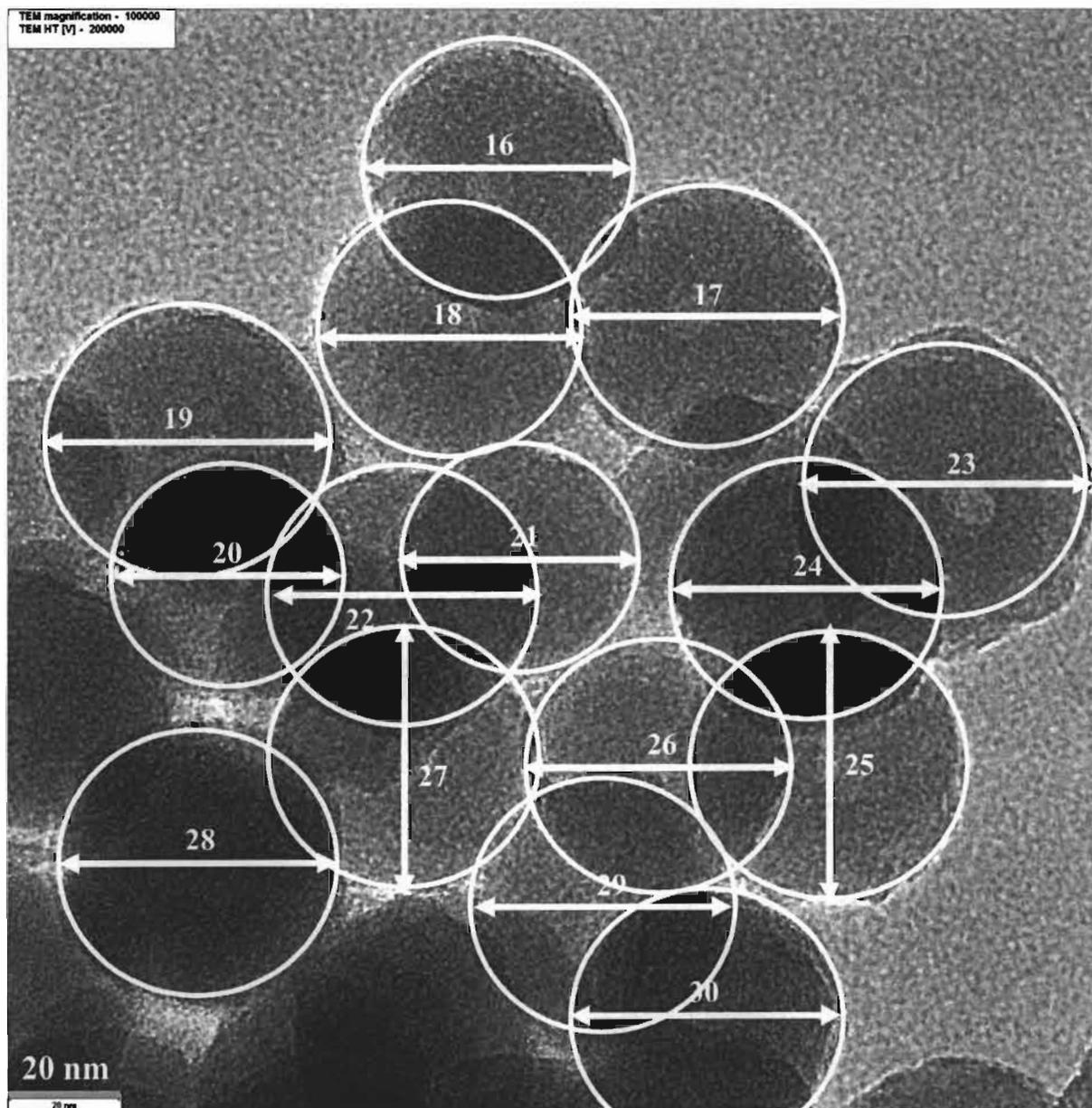
ตารางที่ ก.5 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP5 จากภาพถ่าย TEM

NO.	กำลังขยาย	ขนาดอ้างอิง (cm)	ความยาวจริงจากรูป (cm)	ขนาดอนุภาค (nm)
1	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	1.91	44.16
2	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.21	51.10
3	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.21	51.10
4	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.01	46.47
5	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	1.91	44.16
6	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.01	46.47
7	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	1.91	44.16
8	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.11	48.79
9	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	1.91	44.16
10	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	1.91	44.16
11	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.14	49.48
12	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.01	46.47
13	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	1.91	44.16
14	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	1.81	41.85
15	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.01	46.47
16	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.01	46.36
17	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.49	40.35
18	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.61	41.73
19	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.81	44.05
20	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.91	45.20
21	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.49	40.35
22	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.59	41.50
23	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.81	44.05
24	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.43	39.65
25	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.91	45.20
26	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.81	44.05
27	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.81	44.05
28	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.81	44.05
29	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.29	38.03
30	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.71	42.89
ขนาดอนุภาคเฉลี่ย				44.49
SD				3.10

ก. 6 NP6 (0.5 mL TEOS : 60 μ L NH_4OH)



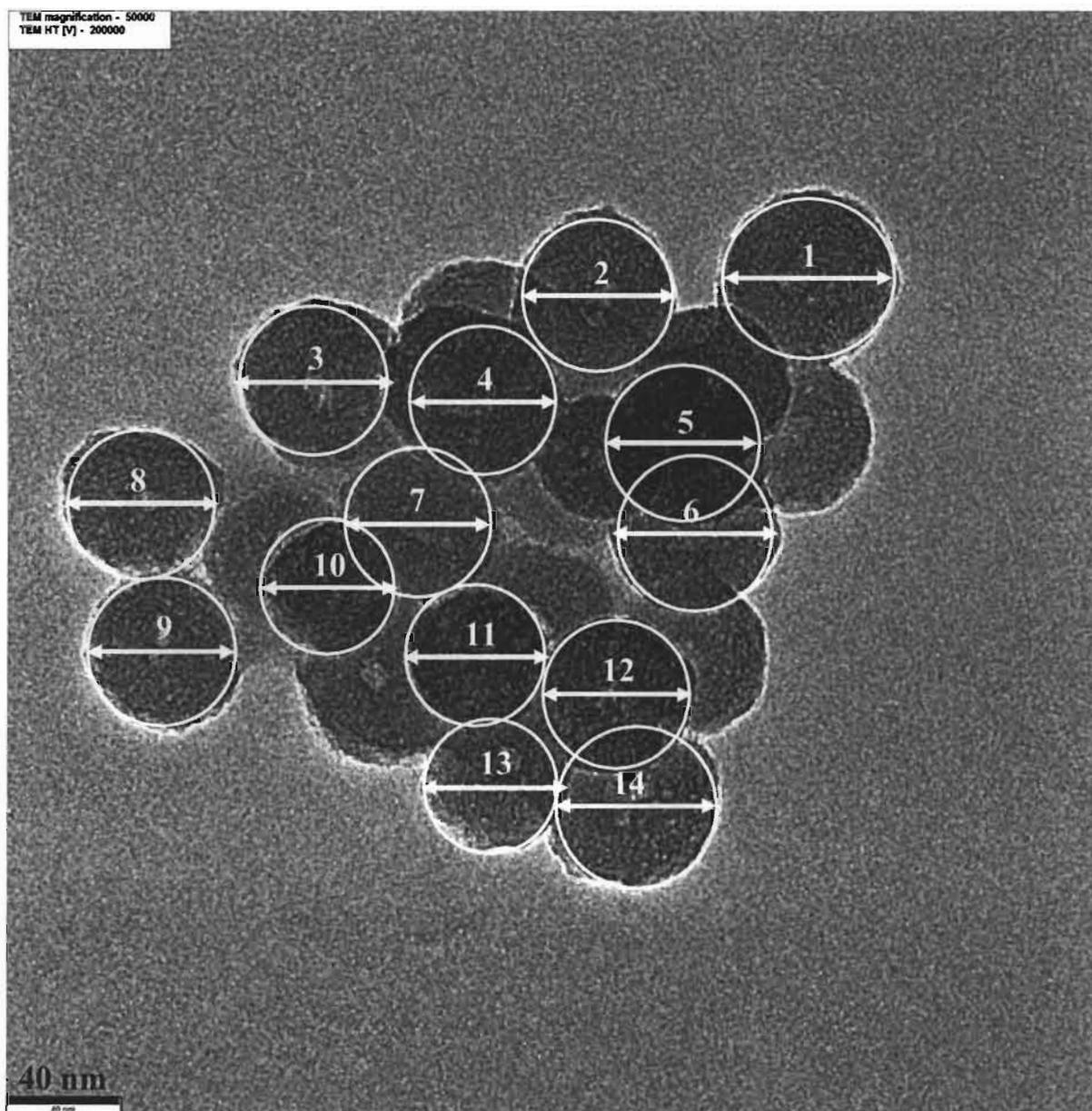
รูปที่ ก.6.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP6 ที่กำลังขยาย 40,000 เท่า



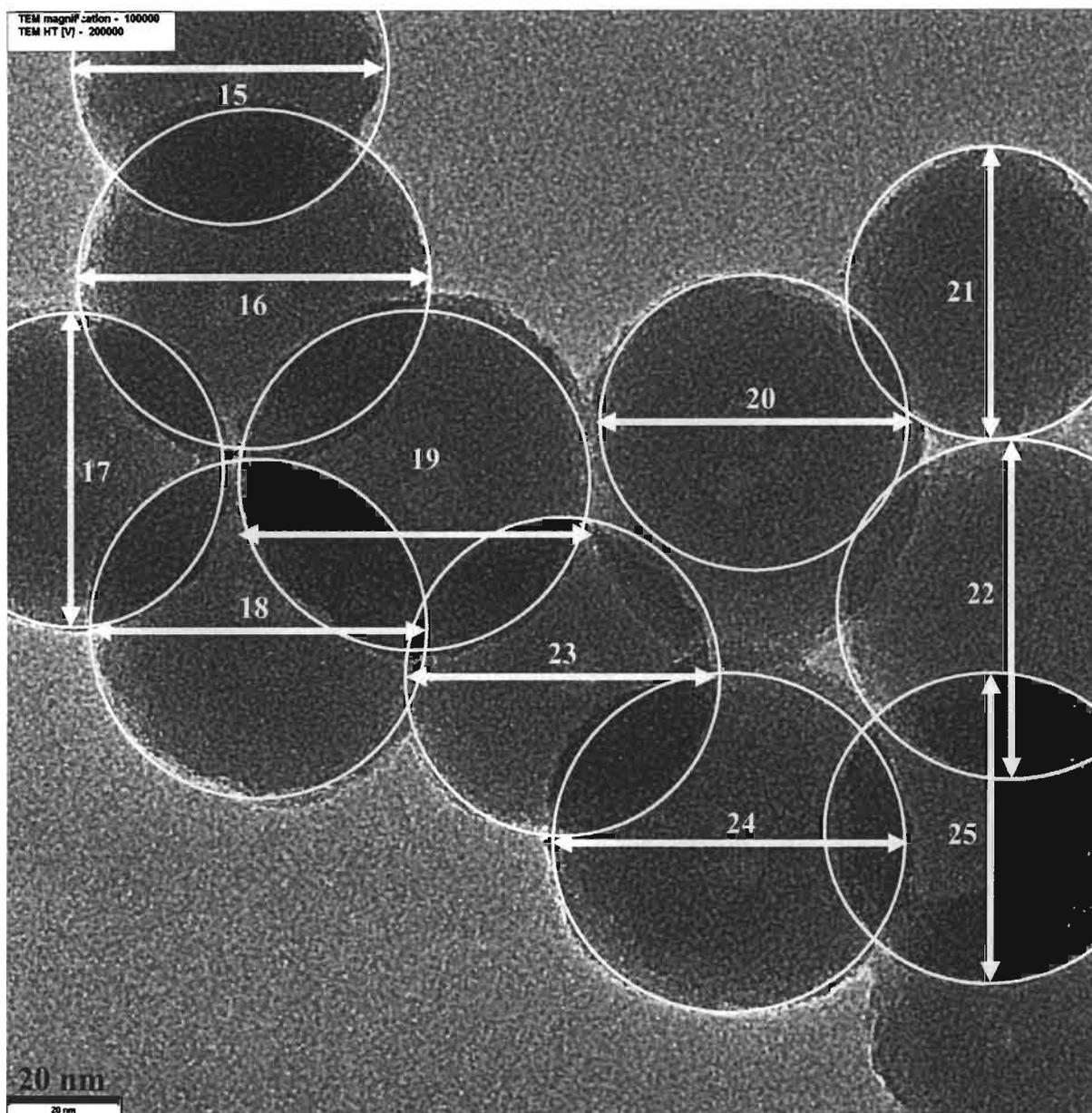
รูปที่ ก.6.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP6 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า

ตารางที่ ก.6 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP6 จากภาพถ่าย TEM

NO.	กำลังขยาย	ขนาดอ้างอิง (cm)	ความยาวจริงจากรูป (cm)	ขนาดอนุภาค (nm)
1	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.87	44.88
2	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.77	42.48
3	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.72	41.28
4	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.83	43.92
5	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.91	45.84
6	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.75	42.00
7	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.77	42.48
8	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.78	42.72
9	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.87	44.88
10	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.77	42.48
11	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.77	42.48
12	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.75	42.00
13	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.91	45.84
14	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.52	36.48
15	40,000 เท่า	60 nm (2.05 cm)	1.91	45.84
16	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.13	47.75
17	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.13	47.75
18	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.13	47.75
19	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.45	51.45
20	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.49	40.35
21	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.73	43.12
22	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.13	47.75
23	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.55	52.60
24	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.13	47.75
25	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.23	48.90
26	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.13	47.75
27	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.13	47.75
28	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.23	48.90
29	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	3.93	45.43
30	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.13	47.75
ขนาดอนุภาคเฉลี่ย				45.28
SD				3.48

ก. 7 NP8 (0.7 mL TEOS : 120 μ L NH_4OH)

รูปที่ ก.7.1 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP8 ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า



รูปที่ ก.7.2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโน NP8 ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า

ตารางที่ ก.7 การคำนวณขนาดของอนุภาคนาโน NP8 จากภาพถ่าย TEM

NO.	กำลังขยาย	ขนาดอ้างอิง (cm)	ความยาวจริงจากรูป (cm)	ขนาดอนุภาค (nm)
1	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.58	59.65
2	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.35	54.34
3	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.45	56.65
4	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.25	52.02
5	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.33	53.87
6	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.53	58.50
7	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.25	52.02
8	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.35	54.34
9	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.25	52.02
10	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.08	48.09
11	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.25	52.02
12	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.30	53.18
13	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.25	52.02
14	50,000 เท่า	40 nm (1.73 cm)	2.46	56.88
15	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.76	55.03
16	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	5.40	62.43
17	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.76	55.03
18	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	5.08	58.73
19	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	5.40	62.43
20	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.82	55.72
21	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.39	50.75
22	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	5.08	58.73
23	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.71	54.45
24	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	5.40	62.43
25	100,000 เท่า	20 nm (1.73 cm)	4.63	53.53
ขนาดอนุภาคเฉลี่ย				55.39
SD				3.81

ภาคผนวก ข

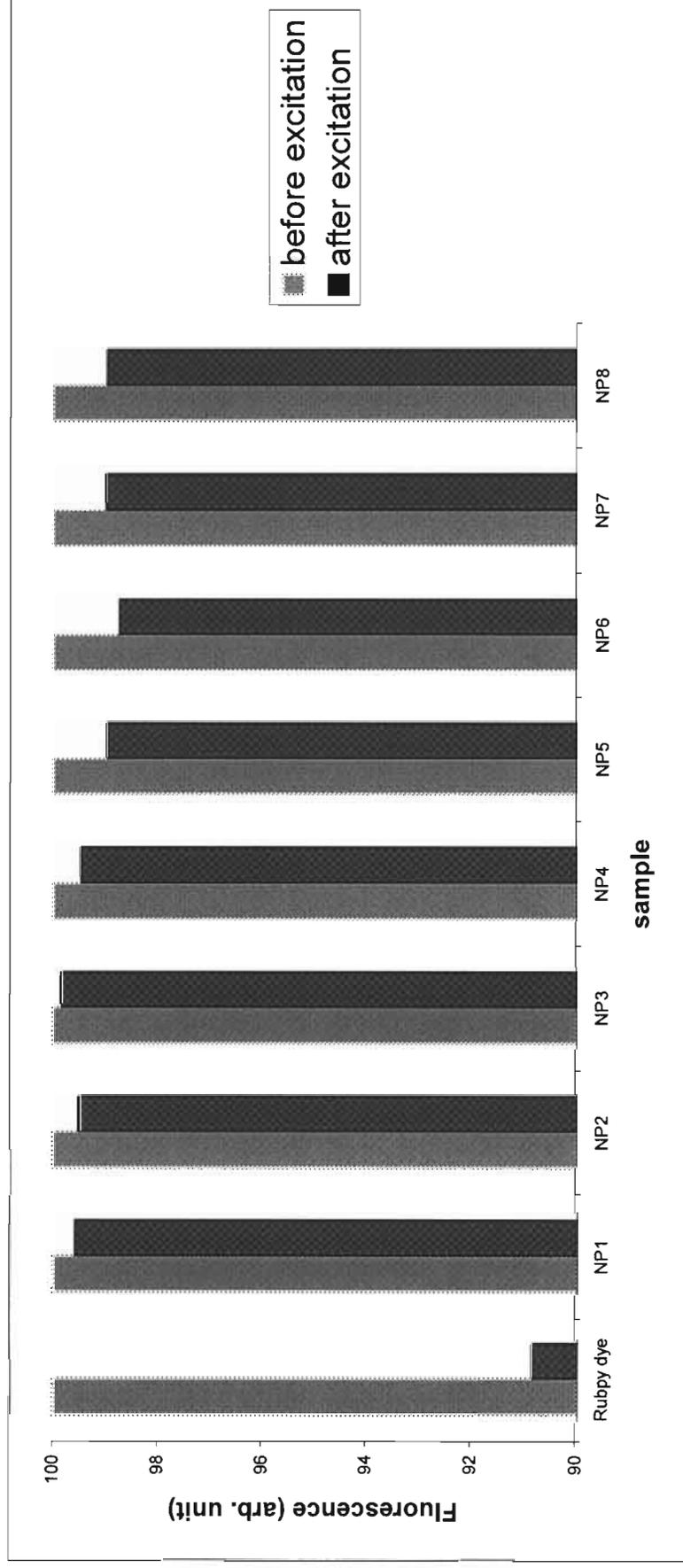
ข้อมูลการวิเคราะห์ความเข้มแสงและความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนซ์ในอนุภาคนาโนซีลีคา

ตารางที่ ข.1 ความเข้มแสงและความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนซ์ในอนุภาคนาโนซีลีคาเปรียบเทียบกับสี RuBpy dye เมื่อกระตุ้นด้วย 150 W Xenon lamp เป็นเวลา 7,200 วินาที

Time (sec)	Fluorescence (arb. unit)								
	RuBpy dye	NP1	NP2	NP3	NP4	NP5	NP6	NP7	NP8
0	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
300	98.996	99.670	99.693	99.980	99.967	99.967	99.980	99.967	99.748
600	98.222	99.651	99.693	99.920	99.973	99.933	99.960	99.980	99.582
900	97.583	99.629	99.694	99.915	99.947	99.914	99.907	99.947	99.602
1200	96.890	99.609	99.597	99.880	99.940	99.900	99.901	99.875	99.569
1500	95.885	99.609	99.538	99.877	99.927	99.847	99.901	99.875	99.569
1800	95.072	99.609	99.525	99.877	99.927	99.840	99.888	99.868	99.575
2100	93.534	99.609	99.525	99.877	99.748	99.794	99.868	99.822	99.622
2400	92.815	99.609	99.524	99.877	99.648	99.840	99.874	99.677	99.569
2700	92.382	99.603	99.521	99.872	99.628	99.787	99.907	99.651	99.489
3000	91.530	99.603	99.518	99.867	99.628	99.754	99.874	99.612	99.482
3300	91.216	99.596	99.512	99.852	99.628	99.734	99.881	99.546	99.445
3600	90.830	99.593	99.512	99.854	99.635	99.727	99.841	99.368	99.436
3900	90.850	99.593	99.512	99.874	99.582	99.654	99.848	99.335	99.213
4200	90.830	99.592	99.511	99.854	99.582	99.468	99.674	99.322	99.107
4500	90.837	99.593	99.512	99.861	99.562	99.428	99.516	99.269	99.102
4800	90.830	99.593	99.512	99.841	99.496	99.415	99.412	99.263	98.996
5100	90.830	99.593	99.512	99.841	99.476	99.223	99.324	99.216	98.983
5400	90.824	99.593	99.513	99.839	99.476	99.106	99.218	99.184	98.982
5700	90.830	99.593	99.512	99.840	99.489	99.105	99.175	99.170	98.982
6000	90.830	99.592	99.512	99.840	99.476	99.031	99.129	99.144	98.981
6300	90.850	99.590	99.512	99.841	99.476	98.996	98.775	99.039	98.982
6600	90.830	99.591	99.511	99.840	99.482	98.992	98.744	99.039	98.982
6900	90.837	99.591	99.510	99.840	99.482	98.983	98.729	99.039	98.982
7200	90.830	99.591	99.511	99.840	99.476	98.978	98.749	98.993	98.982

ตารางที่ ข.2 Bleaching (%) ของอนุภาคนาโนเปรียบเทียบกับสี RuBpy dye

Fluorescence (arb. unit)	RuBpy dye	NP1	NP2	NP3	NP4	NP5	NP6	NP7	NP8
before excitation	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
after excitation	90.83	99.59	99.51	99.84	99.48	98.98	98.75	99.00	98.98
% bleaching	9.17	0.41	0.49	0.16	0.52	1.02	1.25	1.00	1.02



รูปที่ ข.1 Bleaching (%) ของอนุภาคนาโนเปรียบเทียบกับสี RuBpy dye

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมบัฟเฟอร์

1. Trypticase Soy Agar (TSA) (Merck, Germany)

Trypticase peptone	15	กรัม
Soy peptone	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
pH	7.3±0.2	

ซังอาหารสำเร็จรูป TSA ปริมาณ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งละลายเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. 10X Stock Phosphate buffer (pH 7.4)

ก. 0.2 M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ข. 0.2 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย ก ปริมาตร 95 มิลลิลิตร กับ 405 มิลลิลิตร ของสารละลาย ข เข้าด้วยกัน ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 7.4 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อจะใช้งานให้ทำการเจือจาง 10 เท่า ความเข้มข้นที่เจือจางแล้วจะเท่ากับ 10 mM Phosphate buffer (pH 7.4)

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์แอนติบอดี

1. การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี Direct agglutination

การตรวจสอบปริมาณของแอนติบอดี จะใช้วิธี microtiter plate direct agglutination (สูตรที่ 2543) ดังนี้

1.1 ใส่ 0.85% NaCl ลงใน microtiter plate หลุมละ 50 μ L จนครบ 12 หลุม

1.2 ทำ serial dilution โดยเจือจางแอนติบอดี เป็น 2 เท่า จนความเจือจางสุดท้ายเท่ากับ 1:2,048 (หลุมที่ 11)

1.3 ใส่เชื้อซัลโมเนลลาที่ใช้เป็นแอนติเจน (ขั้นตอนการเตรียมเชื้อเพื่อใช้เป็นแอนติเจนแสดงในภาพที่ 13) ลงในแต่ละหลุมที่มีแอนติบอดีแต่ละความเจือจางอยู่จนครบทั้ง 11 หลุม โดยหลุมที่ 12 จะมีแต่ 0.85% NaCl เพื่อใช้เป็น negative control

1.4 นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

1.5 ตรวจสอบผลโดยสังเกต agglutination pattern ซึ่งจะเกิดที่ก้นหลุม โดยวางถาดหลุมบนกระดาษหรือผ้าดำจะสังเกตตะกอน ได้ชัดเจน

อ่านผล โดยสังเกตจากปริมาณของ agglutinate

++++ 100% complete agglutination

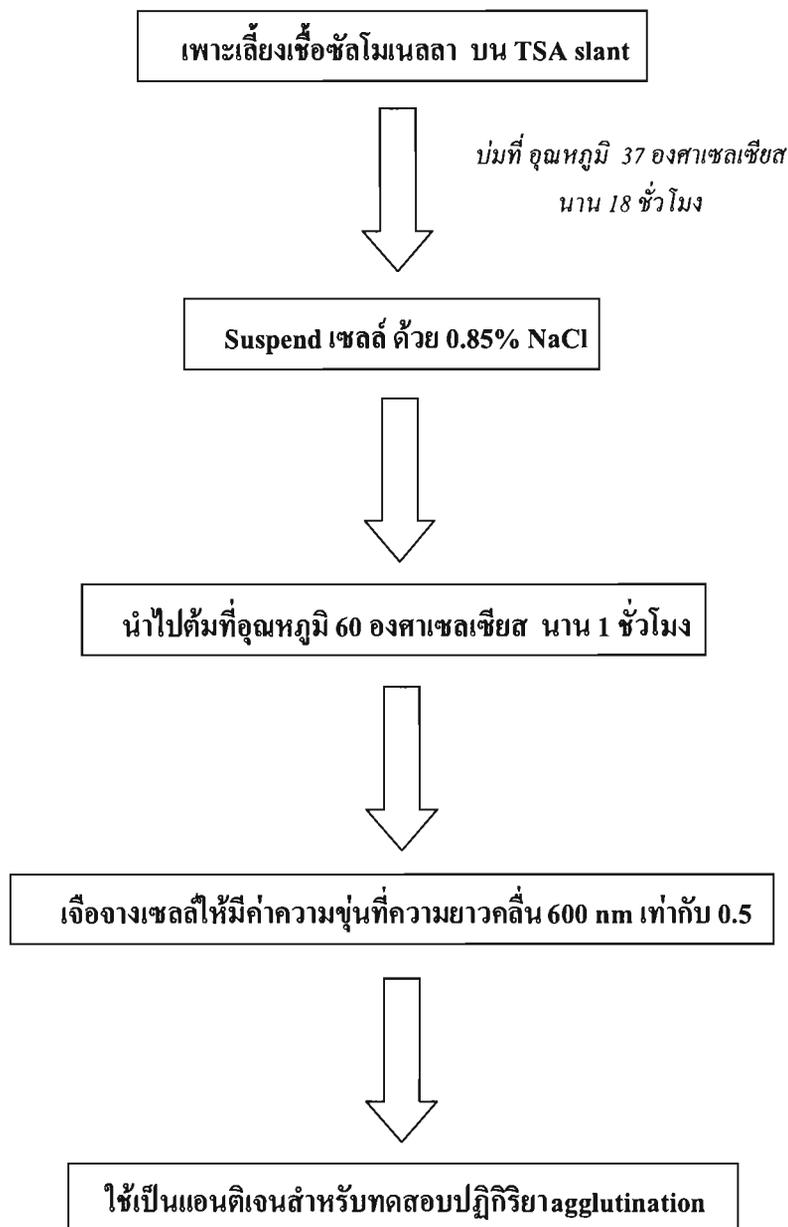
+++ 75% agglutination

++ 50% agglutination

+ 25% agglutination

- no agglutination

โดยอ่านผลบวกตั้งแต่ 50% agglutination ขึ้นไป



รูปที่ ง.1 การเตรียมเชื้อซัลโมเนลลาเป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบปฏิกิริยา agglutination

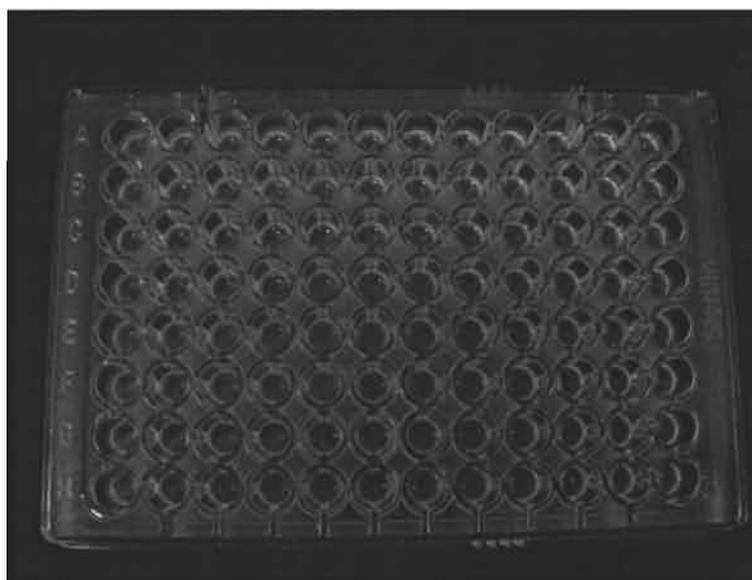
ตารางที่ ง.1 การเกิดปฏิกิริยา agglutination ของแอนติบอดี โดยวิธี Direct agglutination

หลุมที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Titer	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1,024	1:2,048	control
SE:g	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	-	-	-	-
SE:m	++++	++++	++++	++++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
SE:09	++++	++++	++++	++++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
SE:012	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	-	-	-	-
ST:g	++++	++++	++++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
ST:m	++++	++++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST:09	++++	++++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST:012	++++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* หมายถึง : SE คือ *Salmonella* Enteritidis

ST คือ *Salmonella* Typhimurium

g, m, 09, 012 คือ แอนติบอดีสำหรับ SE



รูปที่ ง.2 แสดงการเกิดปฏิกิริยา agglutination ของแอนติบอดี โดยวิธี Direct agglutination

โดยเชื้อ *Salmonella* Enteritidis มีแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ H:g, H:m, 0:9 และ 0:12 เท่ากับ 1:256, 1:64, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *Salmonella* Typhimurium มีแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ H:g, H:m, 0:9 และ 0:12 เท่ากับ 1:16, 1:8, 1:8 และ 1:4 ตามลำดับ

ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อซัลโมเนลลา มี ELISA titre เท่ากับ 1:128,000

2. การตรวจสอบปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี โดยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลาย ก

ละลาย Na_2CO_3 ปริมาณ 2 g ใน 0.1 N NaOH ปริมาตร 100 mL

2.1.2 สารละลาย ข

ละลาย $\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 2.7 g ในน้ำกลั่น 100 mL

2.1.3 สารละลาย ค

ละลาย $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1 g ในน้ำกลั่น 100 mL

2.1.4 สารละลาย ง

นำสารละลาย ก ปริมาตร 100 mL ผสมเข้ากับสารละลาย ข ปริมาตร 1 mL และสารละลาย ค ปริมาตร 10 mL (สารนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

2.1.5 Folin-Ciocalteu reagent 1 N

นำ Folin-Ciocalteu reagent 2 N มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (สารนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

2.1.6 สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin

ละลาย bovine serum albumin ปริมาณ 0.25 g ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 mL แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ระหว่าง 50-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

2.2 วิธีวิเคราะห์

2.2.1 ใส่ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 1 mL ในหลอดทดสอบ

2.2.2 เติมสารละลาย ง ปริมาตร 5 mL ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

2.2.3 เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 N ปริมาตร 0.5 mL ลงในหลอดทดลองข้อ 2.2.2 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 nm นำค่า OD ที่ได้มาหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2.4 ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 50-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 2.2.1-2.2.3 เขียนกราฟระหว่างค่า OD และความเข้มข้นของ bovine serum albumin

2.3 การคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

BSA ($\mu\text{g/mL}$)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
OD 750	0	0.181	0.306	0.434	0.563	0.692	0.829	0.937	1.056	1.183	1.320

Antiserum	O9 (100X)	O12 (100X)	H:g (100X)	H:m (100X)	Monoclonal Antibody (500x)
OD 750	0.2315	0.2375	0.1816	0.1845	0.1711

จากสมการ $Y = 0.0026X + 0.0396$

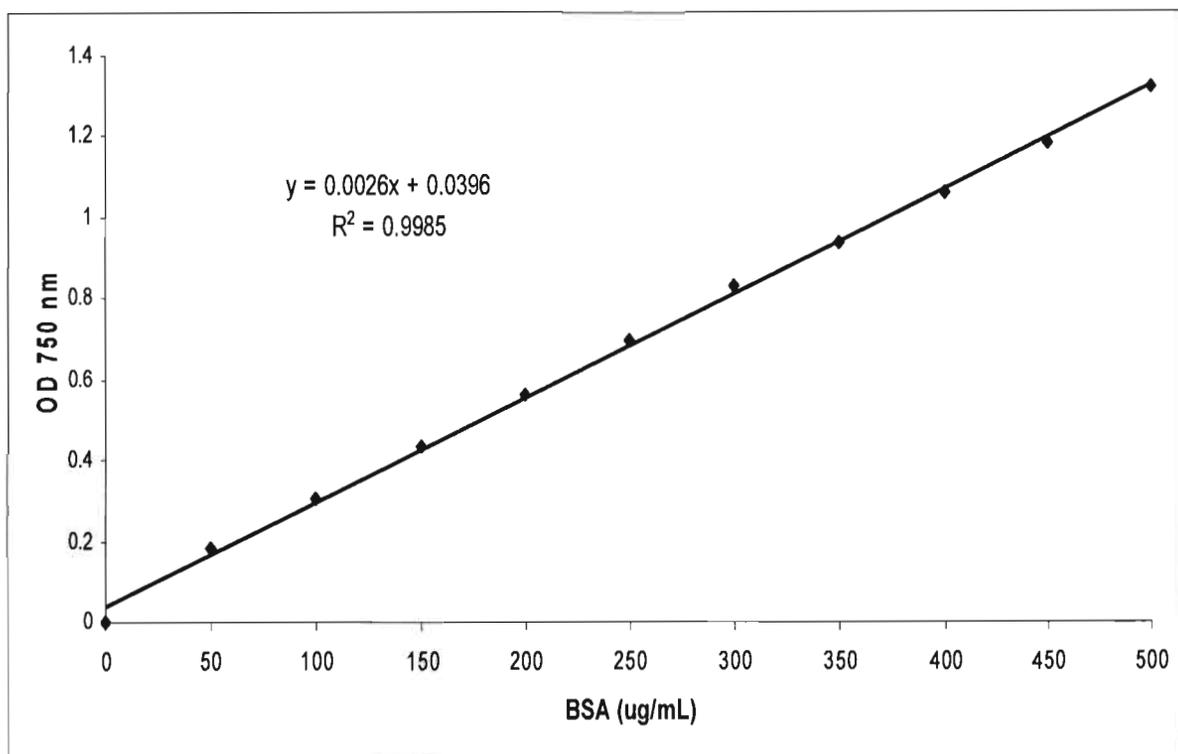
$$\begin{aligned} \text{Antiserum O9 มีปริมาณโปรตีน} &= (0.2315 - 0.0396) / 0.0026 \times 100 \\ &= 7.38 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Antiserum O12 มีปริมาณโปรตีน} &= (0.2375 - 0.0396) / 0.0026 \times 100 \\ &= 7.61 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Antiserum H:g มีปริมาณโปรตีน} &= (0.1816 - 0.0396) / 0.0026 \times 100 \\ &= 5.46 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Antiserum H:m มีปริมาณโปรตีน} &= (0.1845 - 0.0396) / 0.0026 \times 100 \\ &= 5.57 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Monoclonal antibody มีปริมาณโปรตีน} &= (0.1711 - 0.0396) / 0.0026 \times 500 \\ &= 25.29 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$



รูปที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณ โปรตีน bovine serum albumin โดยวิธี Lowry (1951)

ภาคผนวก จ

การเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1. เคลือบกระจกปิดสไลด์ด้วย L-polylysine ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง
2. เกลี่ยตัวอย่าง (เชื้อแบคทีเรียที่บ่มกับอนุภาคนาโน) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ให้กระจายบนกระจกปิดสไลด์จากข้อ 1 ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
3. แช่ตัวอย่างให้ท่วมใน 2.5 % glutaraldehyde ใน sodium cacodylate buffer (pH 7.4) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
4. ล้างตัวอย่างด้วย sodium cacodylate buffer (pH 7.4) 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
5. แช่ตัวอย่างให้ท่วมใน 2 % osmium tetroxide ใน sodium cacodylate buffer (pH 7.4) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
6. ล้างตัวอย่างด้วย sodium cacodylate buffer (pH 7.4) 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
7. คึงน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydration) ด้วย graded series of ethanol solutions
8. ทำตัวอย่างให้แห้ง โดยใช้เครื่อง critical point drying (CPD) ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์เหลว
9. ติดตัวอย่างลงบนแท่นติดตัวอย่างที่ทำจากอลูมิเนียม (aluminum stub)
10. ฉาบผิวตัวอย่างด้วย Palladium (Pd) ผสมกับ Platinum (Pt) ด้วยเครื่องฉาบผิวแบบ DC sputtering
11. ได้ตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวศศิธร อำนางรุ่งตระกูล
วัน เดือน ปีเกิด	10 ตุลาคม 2523
ประวัติการศึกษา	
ระดับมัธยมศึกษา	ประโยคมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสงวนหญิง พ.ศ. 2542
ระดับปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2546
ระดับปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี พ.ศ. 2551
ทุนการศึกษา	ทุน “เพชรพระจอม” มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีงบประมาณ 2549 ทุน “ผู้ช่วยสอน” สายสังคมศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์ ภาคการศึกษา 2/2550, 1/2551
ประวัติการทำงาน	นักวิชาการส่งเสริมการเกษตร สำนักงานเกษตรจังหวัดสุพรรณบุรี กรมส่งเสริมการเกษตร พ.ศ. 2547-2549
ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์	Amnatrungrakool, S., Tuitemwong, P., Ketkaew, P. and Angkaew, S., 2007, “Preparation of Fluorescent Dye-doped Silica Nanoparticles via W/O Microemulsion: Control of Nanoparticle Size by Varying Sol-gel Compositions”, The First Thailand National Nanotechnology Conference: Pharmaceutical, Nanomaterials, Devices and Applications , 14-16 August 2007, Central Duangtawan Hotel, Chiang Mai, p. 25 (7 pages).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ข้อตกลงว่าด้วยการโอนลิขสิทธิ์ในวิทยานิพนธ์

วันที่ 11 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551

ข้าพเจ้า นางสาวศศิธร อำนางรุ่งตระกูล รหัสประจำตัว 49402214 เป็นนักศึกษาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ อยู่บ้านเลขที่ 94/2 ถนนหมื่นหาญ ตำบลท่าพี่เลี้ยง อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี 72000

ขอโอนลิขสิทธิ์ในวิทยานิพนธ์ให้ไว้กับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยมี ผศ.ดร.วรณช เกิดสินธุ์ชัย ตำแหน่ง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ เป็นผู้รับโอนลิขสิทธิ์และมีข้อตกลงดังนี้

1. ข้าพเจ้าได้จัดทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง การเตรียมและศึกษาสมบัติของอนุภาคนาโนเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* sp. (Preparation of Bioconjugated Fluorescent Nanoparticles for the Detection of *Salmonella* sp.)

ซึ่งอยู่ในความควบคุมของ รศ.ดร.ประเวทย์ ดุ้ยเต็มวงศ์

ตามมาตรา 14 แห่ง พ.ร.บ.ลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2537 และถือว่าเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

2. ข้าพเจ้าตกลงโอนลิขสิทธิ์จากผลงานทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการสร้างสรรค์ของข้าพเจ้าในวิทยานิพนธ์ให้กับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ตลอดจนอายุแห่งการคุ้มครองลิขสิทธิ์ตามมาตรา 23 แห่งพระราชบัญญัติลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2537 ตั้งแต่วันที่ได้รับอนุมัติโครงร่างวิทยานิพนธ์จากมหาวิทยาลัย

3. ในกรณีที่ข้าพเจ้าประสงค์จะนำวิทยานิพนธ์ไปใช้ในการเผยแพร่ในสื่อใดๆ ก็ตาม ข้าพเจ้าจะต้องระบุว่าวิทยานิพนธ์เป็นผลงานของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีทุก ๆ ครั้งที่มีการเผยแพร่

4. ในกรณีที่ข้าพเจ้าประสงค์จะนำวิทยานิพนธ์ไปเผยแพร่ หรืออนุญาตให้ผู้อื่นทำซ้ำ หรือดัดแปลง หรือเผยแพร่ต่อสาธารณชน หรือกระทำการอื่นใด ตามมาตรา 27, มาตรา 28 , มาตรา 29 และมาตรา 30 แห่งพระราชบัญญัติลิขสิทธิ์ พ.ศ.2537 โดยมีค่าตอบแทนในเชิงธุรกิจ ข้าพเจ้าจะกระทำได้เมื่อได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ลงชื่อ..... ศศิธร อำนางรุ่งตระกูล..... ผู้โอนลิขสิทธิ์
(นางสาวศศิธร อำนางรุ่งตระกูล)

ลงชื่อ..... วรณช เกิดสินธุ์ชัย..... ผู้รับโอนลิขสิทธิ์
(ผศ.ดร.วรณช เกิดสินธุ์ชัย)

ลงชื่อ..... ประเวทย์ ดุ้ยเต็มวงศ์..... พยาน
(รศ.ดร.ประเวทย์ ดุ้ยเต็มวงศ์)

ลงชื่อ..... ภัณฑิรา เกตุแก้ว..... พยาน
(ผศ.ดร.ภัณฑิรา เกตุแก้ว)