

การนำแผ่นเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่โดยวิธียูวี-โอโซน สำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพ
ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์

ธันวาคม 2559

การนำแผ่นเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่โดยวิธียูวี-โอโซน สำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพ
ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์

ธันวาคม 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การนำแผ่นเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่โดยวิธียูวี-โอโซน สำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพ
ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์

ธันวาคม 2559

นท ศานติคีตา. (2559). การนำแผ่นเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่โดยวิธียูวี-โอโซน สำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน. ปรินญานิพนธ์ วท.ม. (ฟิลิกส์).กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปรินญานิพนธ์: อาจารย์ ดร. โชคชัย พุทธิรักษา.

งานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาวิธีการแบบใหม่ในการทำความสะอาดพื้นผิวของบนแผ่น SPR สำหรับเทคนิคเชิงแสงคลื่นผิวพลาสมอนแบบภาพ แผ่น SPR ที่ถูกใช้ในการตรวจจำแนกหมู่เลือดในระบบ ABO จะถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน เพื่อชะล้างชั้นพื้นผิวคาร์บอกซิเมทิลเลทเดกทรานซ์ (CMD) และชั้นสารชีวภาพ (ตัวอย่างเลือดและแอนติบอดี) ออกจากแผ่น SPR เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ หลังจากการทำความสะอาดแผ่น SPR แล้ว พื้นผิวจะถูกวิเคราะห์โดย การวัดเส้นโค้ง SPR การบันทึกภาพ SPR การวัดมุมสัมผัส การวัดสมบัติเชิงแสงโดยอิลิปโซเมทรี และการวัดสภาพพื้นผิวโดยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม ในส่วนของการนำกลับมาใช้ใหม่ของแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดจะทดสอบด้วยวิธีการตรวจจำแนกหมู่เลือด เพื่อทำการเปรียบเทียบสัญญาณ SPR กับแผ่น SPR ใหม่ ก่อนการตรวจจำแนกหมู่เลือด anti-A และ anti-B จะถูกตรึงบนพื้นผิว CMD ของแผ่น SPR ที่ต้องการนำกลับมาใช้ใหม่ หลังจากนั้นตัวอย่างเลือดหมู่ เอ บี เอบีและโอ จะถูกผ่านบนพื้นผิวเพื่อทำการวิเคราะห์หมู่เลือด จากผลการทดลองพบว่าสัญญาณ SPR มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อแอนติเจนบนเม็ดเลือดจับกับแอนติบอดีบนพื้นผิวอย่างเฉพาะเจาะจง และมีค่าใกล้เคียงกับสัญญาณ SPR ของแผ่น SPR ใหม่ ประกอบด้วยผลการวิเคราะห์ความสะอาดของพื้นผิวเปรียบเทียบระหว่างแผ่น SPR ใหม่กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นวิธียูวี-โอโซน จึงเป็นวิธีทำความสะอาดแผ่น SPR เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้เป็นอย่างดี

REUSE OF SENSOR CHIP BY UV-OZONE METHOD FOR SURFACE PLASMON
RESONANCE BIOSENSOR



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Physics
at Srinakharinwirot University

December 2016

Nott Santiketa. (2016). *Reuse of Sensor chip by UV/ozone Method for Surface Plasmon Resonance Biosensor*. Master thesis, M.Sc. (Physics). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor: Dr. Chokchai Puttharugsa.

This work presents a novel method to reuse the gold (Au) sensor chip for surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. The SPR chip, used in ABO blood group typing, was regenerated with a functional layer and biomolecule layer on the SPR surface by the UV/ozone method. The layer of used SPR consisted of a functional layer of carboxyl methylate dextran (CMD) and a layer of biomolecules (antibody and red blood cell (RBC)). After regeneration, the reused SPR chip was monitored by the SPR imager, including SPR image and SPR curve. The ability of the reused SPR chip was again tested in ABO blood typing and compared to that of the new SPR chip. For the construction of the blood group typing biosensor, the anti-A and anti-B were covalently immobilized on the CMD surface of the reused or new SPR chip. The RBCs-RBC A, RBC B, RBC AB, and RBC O were passed over the immobilized surface of the antibodies for analyzing blood types. The result of the SPR curve shifted left and equaled to that of the new SPR chip, and the obtained SPR images from the used/new SPR chip were similar. The SPR signal obtained from the reused SPR chip for blood typing was correctly grouped in the same way with the new SPR chip. Thus, this method is feasible to regenerate the surface of the SPR chip for its prolonged reuse.

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การนำแผ่นเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่โดยวิธียูวี-โอโซน สำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพ
ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน

ของ

นท ศานติคีตา

ได้รับการอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษา

.....ประธาน

(อาจารย์ ดร. โชคชัย พุทธรักษา)

(อาจารย์ ดร. นงลักษณ์ หวงกำแพง)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. โชคชัย พุทธรักษา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อาริยา เอี่ยมบุญ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ภูณิศรา ลิมนนทกุล)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงได้ดี เนื่องจากการสนับสนุน การให้คำปรึกษา และการดูแลเอาใจใส่จากอาจารย์ ดร.โชคชัย พุทธิรักษา อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์และกรรมการสอบ ผู้จุดประกายเริ่มต้นความคิดในหัวข้อวิจัยและความช่วยเหลือในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในงานปริญญานิพนธ์นี้ และ ผศ.ดร. เติมศักดิ์ ศรีศิริรินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในความกรุณาให้ใช้ห้องทดลอง ณ ศูนย์นาโนเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ตลอดจนข้อเสนอแนะ และความเอาใจใส่อย่างดี ซึ่งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ที่มีค่าอย่างมาก

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. นงลักษณ์ หวงกำแหง ที่ได้เสียสละมาเป็นประธานกรรมการในการสอบปริญญานิพนธ์และความช่วยเหลือในการทดลอง ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ภูนิศรา ลิ้มนนทกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารียา เอี่ยมบุญ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. วาสุเทพ หลวงทิพย์ สำหรับคำแนะนำในการวิเคราะห์ผลการทดลอง ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร. สิริสา ยอดมงคล นายชินวุธ พิพัฒน์ภานุกุล นางสาวนิตา ตั้งเก้าสกุล และสมาชิกทุกคนในกลุ่มงานวิจัยนาโนเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความช่วยเหลือต่างๆ ความรู้ในการใช้งานเครื่อง SPR และคำแนะนำซึ่งทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำหรับเครื่อง SPR และขอขอบคุณธนาคารเลือด โรงพยาบาลรามาธิบดี สำหรับตัวอย่างเลือดในการทดลอง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับทุนในงานวิจัยและทุนสำหรับการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษาระดับชาติ และนานาชาติ ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุดท้าย ขอขอบคุณมารดาบุญธรรม อาจารย์เครือวัลย์ จันทร์สมวงษ์ ผู้เป็นที่รักอย่างยิ่ง ผู้คอยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนเสมอมา

นท ศานติคีตา

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญ.....	1
ความมุ่งหมายในงานวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
การทำความสะอาดพื้นผิวด้วยยูวี-โอโซน.....	4
ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor).....	9
SPR ไบโอเซนเซอร์ (SPR Biosensor).....	11
SPR แบบภาพ (SPR Imaging).....	15
รูปแบบการตรวจวัด (detection platform).....	18
การวัดมุมสัมผัส (contact angle).....	21
กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope).....	24
สเปกโตรสโคปีค อีลิปโซเมทรี (Spectroscopic Ellipsometry).....	26
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	28
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
สถานที่ในการดำเนินงานวิจัย.....	32
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	32
การปรับปรุงพื้นผิวแผ่น SPR ด้วยคาร์บอกซีเมทิลเลท เดกซ์ทราน.....	33
การเตรียม anti-A, anti-B และตัวอย่างเลือด.....	34
การทำความสะอาดพื้นผิวด้วยยูวี-โอโซน.....	36
การวิเคราะห์ความสะอาดของพื้นผิว.....	37

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	
การวิเคราะห์พื้นผิว SPR ที่ถูกทำความสะอาดด้วยเทคนิค SPR.....	39
ค่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับทำความสะอาดด้วยยูวี-ไอโซน.....	40
การวิเคราะห์ลักษณะเส้นโค้ง SPR ระหว่างแผ่น SPR ใหม่กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดด้วยวิธียูวีไอ-โซนด้วยการทดสอบ โคโรโมโกรอฟ-สเมอ์นอฟ.....	42
การวิเคราะห์พื้นผิวแผ่น SPR ด้วยเทคนิคการวัดมุมสัมผัส.....	43
การวิเคราะห์พื้นผิวแผ่น SPR ด้วยเทคนิคอีลิปโซเมทรี.....	45
การวิเคราะห์พื้นผิวแผ่น SPR ด้วยเครื่องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม.....	46
การทดสอบการใช้งานโดยการตรวจจำแนกหมู่เลือด	47
การตรึง anti-A และ anti-B บนพื้นผิว CMD.....	47
การตรวจจำแนกหมู่เลือด.....	50
การทดสอบจำนวนครั้งการนำกลับมาใช้ใหม่ของแผ่น SPR โดยการตรวจจำแนกหมู่เลือด.....	52
5 สรุปผลการทดลอง.....	55
บรรณานุกรม.....	56
ภาคผนวก.....	60
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	69

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลการทดลองของ J.R. VIG แสดงประสิทธิภาพ ในการทำความสะอาดพื้นผิวที่เงาต่าง ๆ.....	5
2 แสดงผลของความยาวคลื่นหลักของแสงยูวี ที่มีผลต่อกระบวนการทำความสะอาดพื้นผิว	6
3 Chemical-bond energy ในหน่วยกิโลจูลต่อโมล (kJ/mol).....	8



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 กระบวนการการทำความสะอาดพื้นผิวโดยแสงยูวี	
และเรดิคัลของออกซิเจนในกระบวนการเกิดไอโซน.....	5
2 วงจรการเกิดไอโซนและเรดิคัลของออกซิเจนในการทำความสะอาดพื้นผิว.....	7
3 กระบวนการทำความสะอาดพื้นผิวด้วยยูวี-ไอโซน.....	8
4 แผนภาพแสดงหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่ประกอบด้วย	
ส่วนของสารชีวภาพและตัวแปลงสัญญาณ	10
5 ลักษณะของคลื่นผิวพลาสมอนและ evanescent field.....	11
6 องค์ประกอบของ SPR ไบโอเซนเซอร์โดยใช้การจัดแสงแบบ	
Kretchman configuration.....	13
7 กราฟ SPR ที่วัดความเข้มแสงสะท้อนเทียบกับมุมตกกระทบ	14
8 การตั้งค่ามุมตกกระทบให้คงที่ และวัดค่าความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลง.....	15
9 การตั้งค่ามุมที่ตำแหน่งต่างๆ และวัดค่าผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อน	
ที่ค่าดัชนีหักเหต่างๆ กัน.....	16
10 SPR sensorgram สำหรับการตรวจวัดคู่สารชีวภาพด้วยเทคนิค SPR	17
11 รูปภาพแสดงสัญลักษณ์แทนสารชีวภาพต่างๆ.....	18
12 แสดงการตรวจวัดโดยตรง.....	19
13 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดแบบ sandwich assay.....	19
14 แสดงรูปแบบการตรวจวัดแบบแย่งจับ.....	20
15 แสดงรูปแบบการตรวจวัดแบบ inhibition assay.....	21
16 ลักษณะมุมสัมผัสของหยดน้ำ.....	22
17 แรงดึงผิวที่รอยต่อระหว่างของแข็งกับของเหลว ของเหลวกับอากาศ	
และของแข็งกับอากาศ.....	23
18 องค์ประกอบหลักของกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม.....	24
19 แสดงระนาบตกกระทบซึ่งประกอบไปด้วยแอมพลิฟายด์ของสนามไฟฟ้า	
ที่เคลื่อนที่เข้าและตั้งฉากกับพื้นผิวตัวอย่าง.....	26

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
20 กระบวนการทำความสะอาดพื้นผิวโดยวิธี Liquid-UVPO.....	29
21 การเตรียมพื้นผิว CMD.....	34
22 การตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิว CMD.....	35
23 พื้นผิว CMD หลังจากการตรึงแอนติบอดี.....	35
24 Schematic ของการตรวจจำแนกหมู่เลือด.....	36
25 การทำความสะอาดพื้นผิว CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือดด้วยยูวี-โอโซน.....	37
26 บริเวณที่ทำการตรวจวัด (ROI) บนพื้นผิวแผ่น SPR	38
27 การเปรียบเทียบลักษณะเส้นโค้ง SPR ระหว่างแผ่น SPR ใหม่ แผ่น SPR ที่ใช้งานแล้ว และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด.....	40
28 ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นโค้ง SPR ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อน ต่ำสุดเทียบกับเวลาในการทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน และภาพ SPR ทำการเปรียบเทียบความเข้มแสงของแสงบนพื้นผิว SPR ที่ใช้งานแล้ว แผ่น SPR ที่ถูก ทำความสะอาด และแผ่น SPR ใหม่.....	41
29 เส้นโค้ง SPR บนพื้นผิวแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด ด้วยยูวี-โอโซน.....	42
30 ขนาดมุมสัมผัสของหยดน้ำบนพื้นผิว SPR.....	44
31 การวัดสมบัติเชิงแสงด้วยเทคนิคอิลลิปโซเมทรี.....	45
32 ภาพ AFM แบบ 2 มิติ line profile และแบบ 3 มิติบนพื้นผิวแผ่น SPR.....	47
33 Sensogram SPR ของการตรึง anti-A และ anti-B บนพื้นผิว CMD แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด.....	49
34 สัญญาณ SPR จากการตรึง anti-A และ anti-B เปรียบเทียบระหว่าง แผ่น SPR ใหม่ กับ แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด.....	49
35 Sensogram SPR จากการตรวจจำแนกหมู่เลือด เปรียบเทียบระหว่าง แผ่น SPR ใหม่ กับ แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด.....	51
36 สัญญาณ SPR จากการตรวจวัดหมู่เลือดเปรียบเทียบระหว่าง แผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด.....	52

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
37 เปรียบเทียบสัญญาณ SPR จากการตรึง anti-A และ anti-B โดยการใส่แผ่น SPR ซ้ำ จำนวน 4 รอบ.....	53
38 สัญญาณ SPR จากการตรวจจำแนกหมู่เลือดเปรียบเทียบระหว่าง การนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ในแต่ละครั้ง	54
39 เปรียบเทียบลักษณะเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดของแผ่นที่ 1.....	61
40 เปรียบเทียบลักษณะเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดของแผ่นที่ 2.....	61
41 เปรียบเทียบลักษณะเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดของแผ่นที่ 3.....	62
42 เปรียบเทียบลักษณะเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดของแผ่นที่ 4.....	62
43 เปรียบเทียบลักษณะเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดของแผ่นที่ 5.....	63
44 ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นโค้ง SPR ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อน ต่ำสุดเทียบกับเวลาในการทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน ของแผ่นที่ 1.....	63
45 ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นโค้ง SPR ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อน ต่ำสุดเทียบกับเวลาในการทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน ของแผ่นที่ 2.....	64
46 ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นโค้ง SPR ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อน ต่ำสุดเทียบกับเวลาในการทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน ของแผ่นที่ 3.....	64
47 ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นโค้ง SPR ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อน ต่ำสุดเทียบกับเวลาในการทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน ของแผ่นที่ 4.....	65
48 ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นโค้ง SPR ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อน ต่ำสุดเทียบกับเวลาในการทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน ของแผ่นที่ 5.....	65
49 ภาพ AFM ของแผ่น SPR ใหม่ ขนาดภาพ $2 \times 2 \mu\text{m}^2$	66
50 ภาพ AFM ของแผ่น SPR ใหม่ ขนาดภาพ $1 \times 1 \mu\text{m}^2$	66

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
51 ภาพ AFM ของแผ่น SPR ที่ต้องการนำกลับมาใช้ใหม่หลังทำความสะอาด ด้วยยูวี-โอโซน ขนาดภาพ $2 \times 2 \mu\text{m}^2$	67
52 ภาพ AFM ของแผ่น SPR ที่ต้องการนำกลับมาใช้ใหม่หลังทำความสะอาด ด้วยยูวี-โอโซน ขนาดภาพ $1 \times 1 \mu\text{m}^2$	67
53 ภาพ AFM ของแผ่น SPR ที่ถูกปรับปรุงด้วย CMD ขนาดภาพ $2 \times 2 \mu\text{m}^2$	68
54 ภาพ AFM ของแผ่น SPR ที่ถูกปรับปรุงด้วย CMD ขนาดภาพ $1 \times 1 \mu\text{m}^2$	68



บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

การตรวจวัดสารชีวภาพด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน เรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ และถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการวิเคราะห์สารชีวภาพซึ่งมีการแสดงผลตามเวลาจริง (real-time monitoring) ยกตัวอย่างเช่น การตรวจวัดโรค, การวิเคราะห์ทางคลินิก, ความปลอดภัยด้านอาหาร และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Reddy; et al. 2012: 47-72); (Li; Liu; & Lin. 2012: 1549-1554); (Myszka; & Rich. 2000: 310-317); (Li. et al. 2015: 570-576) เทคนิค SPR เป็นเทคนิคเชิงแสงที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีหักเห ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดการเข้าคู่กันของสารชีวภาพได้ หรือนำมาประยุกต์ใช้เป็นไบโอเซนเซอร์เชิงแสง

ส่วนประกอบสำคัญในการตรวจวัดสารชีวภาพด้วยเทคนิค SPR คือแผ่น SPR (SPR chip) ที่ประกอบด้วยชั้นผิวทองหนาประมาณ 50 นาโนเมตรถูกเคลือบบนกระจก BK7 โดยแผ่น SPR จะถูกปรับปรุงสภาพพื้นผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับสารชีวภาพด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น self-assembled monolayer (SAM) หรือ คาร์บอกซิเมทิลเลท เดกซ์ทราน (CMD) (Sara; et al. 2016: 510-516); (Azzam; et al. 2009:387-391) ก่อนที่พื้นผิวทองจะถูกนำไปตรึงด้วยสารชีวภาพ ตัวอย่างเช่น การตรึงแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจวัดแอนติเจน หลังจากทำการตรวจวัดพื้นผิว SPR สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยการชะล้างแอนติเจนออกจากพื้นผิวเพื่อทำการตรวจวัดแอนติเจนอื่นๆ ได้โดยการใช้กรดอ่อน เบสอ่อน หรือสารอัลคาไลน์ เนื่องจากพันธะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน แรวันเดอร์วาลส์ และแรงไฟฟ้าสถิต ซึ่งไม่เหนียวแน่นเท่ากับพันธะแบบโควาเลนต์จึงสามารถชะล้างแอนติเจนออกได้ อย่างไรก็ตามการชะล้างพื้นผิวด้วยลักษณะนี้มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการจับกันของสารชีวภาพลดลง และสามารถทำการตรวจวัดซ้ำได้จำกัด นั่นคือสามารถทำการตรวจวัดสารตัวอย่างได้เฉพาะสารตัวอย่างประเภทเดิมเท่านั้น ดังนั้นวิธีการทำความสะอาดแผ่น SPR โดยการชะล้างชั้นสารชีวภาพและของชั้นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากพื้นผิวจึงได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ ยืดอายุการใช้งาน และเป็นการลดต้นทุนในการวิจัย

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้นำเสนอวิธีในการชะล้างแผ่น SPR เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ (Sandeep. 2012: 23-25) โดยใช้สารละลาย piranha (concentrated H_2SO_4 และ 30% $\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$ v/v) เพื่อชะล้างพื้นผิว 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) การใช้เทคนิค UV-Photooxidation เพื่อชะล้างพื้นผิว SAM (6-mercapto-1-hexanol) (Blake; & Raj. 2012: 1335–1341) อีกทั้งการใช้สารละลายไฮโดรคลอริกพร้อมกับออกซิเจนพลาสมา เพื่อชะล้างพื้นผิว APTES (Bolon; & Kunz. 1972: 109-111) เพื่อใช้ในการตรวจวัด Human Fetuin A อย่างไรก็ตามงานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่ จะทำการพัฒนาวิธีการชะล้างแผ่น SPR ที่เป็นพื้นผิว SAM และพื้นผิว APTES แต่ยังไม่มีการนำเสนอในการชะล้างพื้นผิว CMD

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อพัฒนาวิธีการชะล้างแผ่น SPR ที่เป็นพื้นผิว CMD ที่ถูกใช้ในการตรวจจำแนกหมู่เลือด โดยแผ่น SPR ที่ใช้งานแล้วจะถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน เพื่อชะล้างชั้น CMD แอนติบอดีและตัวอย่างเลือดออกจากแผ่น SPR และทำการวิเคราะห์ความสะอาดของพื้นผิวด้วยการวัดเส้นโค้ง SPR การบันทึกภาพ SPR การวัดมุมสัมผัส การวัดสมบัติเชิงแสงโดยอิลิปโซเมทรี และการวัดสภาพพื้นผิวโดยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม หลังจากนั้นแผ่น SPR จะถูกนำกลับไปเตรียมพื้นผิว CMD อีกครั้ง และทำการทดสอบการใช้งานโดยการตรวจจำแนกหมู่เลือด

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. พัฒนาการชะล้างพื้นผิว CMD โดยใช้วิธีทำความสะอาดแบบยูวี-โอโซน เพื่อนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่
2. เพื่อทำการวิเคราะห์ความสะอาดพื้นผิวของแผ่น SPR โดยเทคนิคการวัดเส้นโค้ง SPR การบันทึกภาพ SPR การวัดมุมสัมผัส การวัดสมบัติเชิงแสงโดยอิลิปโซเมทรี และการวัดสภาพพื้นผิวโดยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม
3. เพื่อศึกษาการนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ ด้วยการตรวจจำแนกหมู่เลือด

ความสำคัญของงานวิจัย

เนื่องจากแผ่น SPR ที่ใช้ในการตรวจวัดสารชีวภาพมีราคาสูง ดังนั้นการพัฒนาริการชะล้างพื้นผิว CMD ด้วยยูวี-โอโซนจะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลองอย่างมาก และเป็นการพัฒนาวิธีชะล้างพื้นผิว ซึ่งจากเดิมชะล้างได้เฉพาะสารตัวอย่างที่สร้างพันธะกับสารชีวภาพบนพื้นผิว แต่ในงานวิจัยนี้สามารถที่จะชะล้างได้ทั้งพื้นผิวที่ประกอบด้วยพื้นผิว CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือด เพื่อนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างคุ้มค่า

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำความสะอาดแผ่น SPR ที่ถูกใช้งานแล้วด้วยยูวี-โอโซน
2. วิเคราะห์ความสะอาดพื้นผิวแผ่น SPR หลังจากทำความสะอาดด้วย การวัดเส้นโค้ง SPR การบันทึกภาพ SPR การวัดมุมสัมผัส การวัดสมบัติเชิงแสงโดยอิลิปโซเมทรี และการวัดสภาพพื้นผิวโดยกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม
3. ศึกษาการนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ ด้วยการตรวจวัดจำแนกหมู่เลือด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทำให้ได้พัฒนาวิธีในการทำมาความสะอาดแผ่น SPR ที่ถูกปรับปรุงพื้นผิวด้วย CMD เพื่อนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ และสามารถประยุกต์ใช้ได้กับการทำความสะอาดพื้นผิวประเภทอื่นๆ อีกทั้งจะช่วยลดต้นทุนในงานวิจัยได้เป็นอย่างมาก



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทำความสะอาดพื้นผิวด้วยยูวี-โอโซน

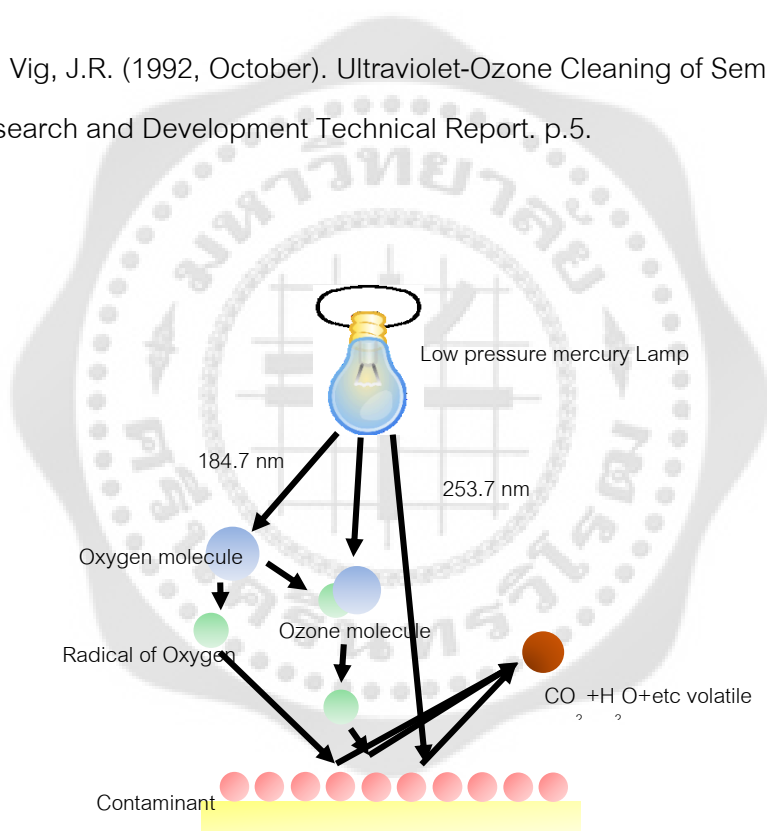
รังสียูวี (Ultraviolet radiation, UV) หรือเรียกว่ารังสีเหนือม่วง เป็นช่วงหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าแสงที่มองเห็น แต่ยาวกว่ารังสีเอกซ์มีความยาวคลื่นในช่วง 100-400 นาโนเมตรและมีความถี่อยู่ในช่วง 10^{15} - 10^{17} เฮิร์ตซ์ จำแนกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1. UVA หรือ Black light อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 315-400 นาโนเมตร 2. UVB หรือ Sunburn radiation อยู่ในช่วงความยาว 280-315 นาโนเมตร และ 3. UVC หรือ Germicidal radiation อยู่ในช่วงความยาว 100-280 นาโนเมตร รังสียูวีถูกนำมาใช้สำหรับการนำมาทำความสะอาดพื้นผิวงาน เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากพื้นผิวงาน ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ในปี ค.ศ. 1972 Bolon, D.A. และ Kunz, C.O. (Bolon; & Kunz.1972: 109-111) ได้นำเสนอการใช้รังสี ยูวีสำหรับสลายพันธะของพอลิเมอร์บนพื้นผิวควอตซ์ด้วยกระบวนการโฟโตไลซิส (photolysis) ต่อมา Vig J.R. ได้ใช้ยูวี-โอโซนในการทำความสะอาดพื้นผิว (Vig. 1984: 1027-1034) สิ่งที่น่าสนใจสำหรับงานของ Vig J.R. คือ การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการกำจัดสิ่งปนเปื้อนบนพื้นผิวโดยใช้แสงยูวีเพียงอย่างเดียวกับการใช้ทั้งแสงยูวีกับโอโซน ดังตารางที่ 1 เห็นได้ว่าการใช้แสงยูวีที่ประกอบด้วยความยาวคลื่น 253.7 และ 184.9 นาโนเมตรร่วมกับเรดิคัลของออกซิเจนในกระบวนการเกิดโอโซนได้ผลดีที่สุดในการชะล้างสิ่งปนเปื้อนออกจากพื้นผิว

กระบวนการทำความสะอาดพื้นผิวด้วยเทคนิคยูวี-โอโซน ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ คือ 1. สลายพันธะของสารอินทรีย์ซึ่งปนเปื้อนอยู่บนพื้นผิวโดยตรงด้วยแสงยูวี เนื่องจากแสงยูวีมีความยาวคลื่นสั้น ความถี่สูงจึงทำให้มีพลังงานสูงถึง 3-12 อิเล็กตรอนโวลต์ ซึ่งสามารถสลายพันธะของสิ่งปนเปื้อนได้ และ 2. การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) โดยเรดิคัลของออกซิเจนจะทำปฏิกิริยากับสิ่งปนเปื้อนบนพื้นผิว เกิดเป็นสารประกอบประเภท volatile ดังภาพประกอบ 1 แสงยูวีจะถูกปล่อยจากหลอดปรอทความดันต่ำ ที่มีความยาวคลื่นเป็น 187.9 นาโนเมตร และ 253.7 นาโนเมตร โดยมีผลต่อกระบวนการทำความสะอาดพื้นผิว ดังตารางที่ 2

ตาราง 1 ผลการทดลองของ J.R. Vig แสดงประสิทธิภาพ ในการทำความสะอาดพื้นผิวที่เงื่อนไขต่างๆ

Exposure type	Time to reach clean
Black lighth	No cleaning
Ozone (no UV)	10 h
253.7 nm (no Ozone)	1 h
253.7 nm + Ozone	90 s
253.7 nm + 184.9 nm +Ozone	20 s

ที่มา: Vig, J.R. (1992, October). Ultraviolet-Ozone Cleaning of Semiconductor Surfaces. Research and Development Technical Report. p.5.



ภาพประกอบ 1 กระบวนการทำความสะอาดพื้นผิวโดยแสงยูวี และเรดิคัลของออกซิเจนในกระบวนการเกิดโอโซน

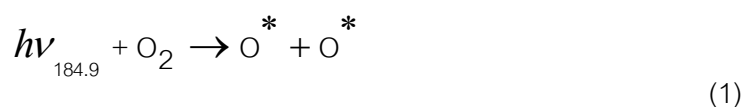
ที่มา: https://chem.uiowa.edu/sites/chem.uiowa.edu/files/people/shaw/ScarlettHow%20to%20UV-OZONE%20Sep_15th.pdf.

ตาราง 2 แสดงผลของความยาวคลื่นหลักของแสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีผลต่อกระบวนการทำความสะอาดพื้นผิว

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ผลของความยาวคลื่น
184.9	• ถูกดูดซับโดยโมเลกุลของออกซิเจนและสารอินทรีย์ • ทำให้เกิดอะตอมของออกซิเจนและโอโซน • สลายพันธะโมเลกุลของสิ่งปนเปื้อน
253.7	• ถูกดูดซับโดยโมเลกุลของสารอินทรีย์และโอโซนแต่ไม่ถูกดูดซับโดยโมเลกุลของออกซิเจน • สลายพันธะของโอโซน • สลายพันธะโมเลกุลของสิ่งปนเปื้อน

ที่มา : Vig, J.R. (1992, October). Ultraviolet-Ozone Cleaning of Semiconductor Surfaces. Research and Development Technical Report. p.6.

ภาพประกอบ 2 ความยาวคลื่นที่ 184.9 นาโนเมตร มีพลังงานสูงจึงสามารถเข้าไปทำลายพันธะของโมเลกุลออกซิเจนให้แยกออกจากกัน เป็น (O^*) เรดิคัลของออกซิเจน 2 อะตอม ดังสมการที่ 1



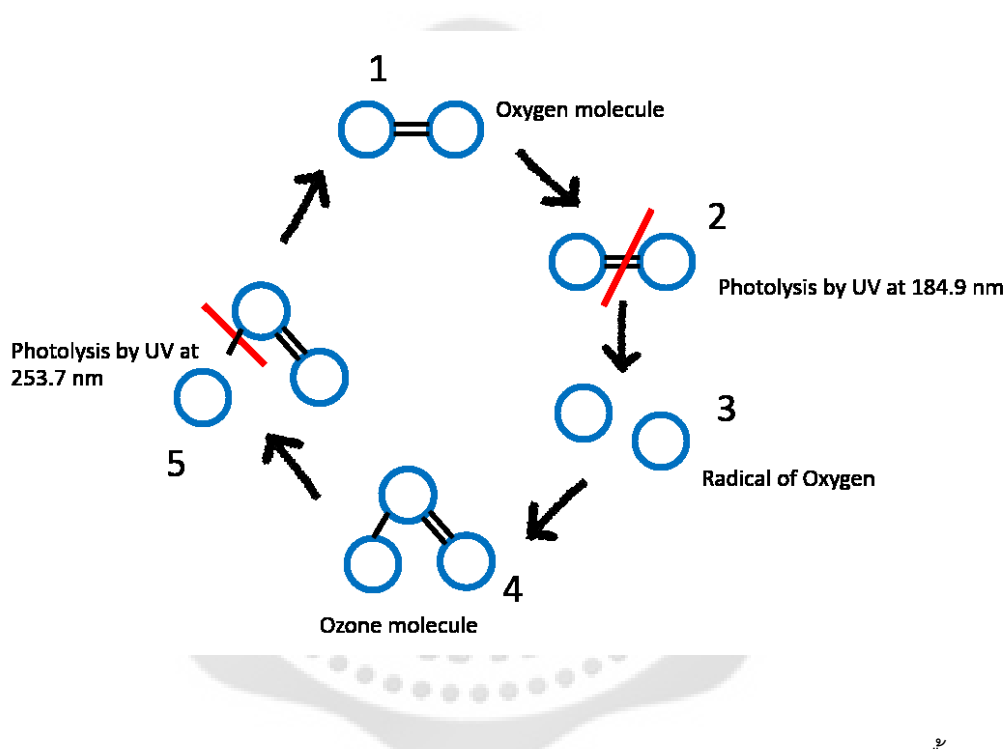
เมื่อ $h\nu_{184.9}$ คือพลังงานของคลื่นที่มีความคลื่น 184.9 นาโนเมตร และเรดิคัลของออกซิเจน 2 อะตอมหนึ่งจะรวมกับโมเลกุลของออกซิเจนเกิดเป็นโอโซน (O_3) ดังสมการที่ 2



จากนั้นโมเลกุลของโอโซนจะดูดซับแสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร เกิดเป็นอะตอมเรดิคัลของออกซิเจนอีกครั้งและทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสิ่งปนเปื้อนบนพื้นผิว ดังสมการที่ 3



เมื่อ $h\nu_{253.7}$ คือพลังงานของคลื่นที่มีความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร



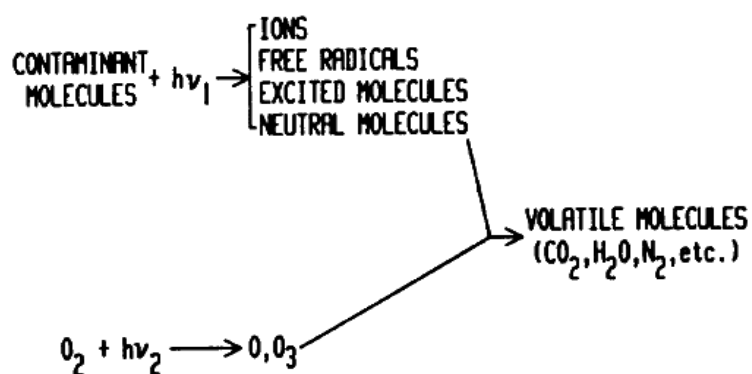
ภาพประกอบ 2 วงจรการเกิดโอโซนและเรดิคัลของออกซิเจนในการทำผาความสะอาดพื้นผิว

พลังงานจากแสงยูวีของความยาวคลื่นที่ 184.9 และ 253.7 นาโนเมตรมีพลังงานเป็น 647 และ 470 กิโลจูลต่อโมลตามลำดับ (Hazama; & Hachioji. 1987: 3) ซึ่งมีพลังงานมากกว่าพลังงานยึดเหนี่ยวพันธะของสิ่งปนเปื้อนที่เป็นสารประกอบประเภทสารอินทรีย์ ดังตาราง 3 ดังนั้นพลังงานจากแสงยูวีจึงสามารถทำลายพันธะของสิ่งปนเปื้อนบนพื้นผิวได้ หลังจากนั้นสิ่งปนเปื้อนที่ถูกสับสตัด้วยยูวี-โอโซน จะรวมกับเรดิคัลของออกซิเจนกลายเป็นสารละลายประเภท CO_2 , H_2O , N , O_2 และอื่นๆ ดังภาพประกอบ 3

ตาราง 3 พลังงานพันธะเคมีของโมเลกุลต่างๆ

Bond	Bond energy (KJ/mol)	Bond	Bond energy (KJ/mol)
O – O	138.9	C = C	607.0
O = O	490.4	C $\equiv$ C	828.0
O – H	462.8	C = O	724.0
C – C	347.7	C – Cl	328.4
C – H	413.4	H – F	563.2
C – N	291.6	C – F	441.0
C $\equiv$ N	791.0	H – Cl	431.8
C - O	351.5	N - H	309.8

ที่มา: Hazama, C.; & Hachioji, S. (1987). Ultraviolet-Ozone Surface Treatment. Threebond Technical News. 17: 1-10.



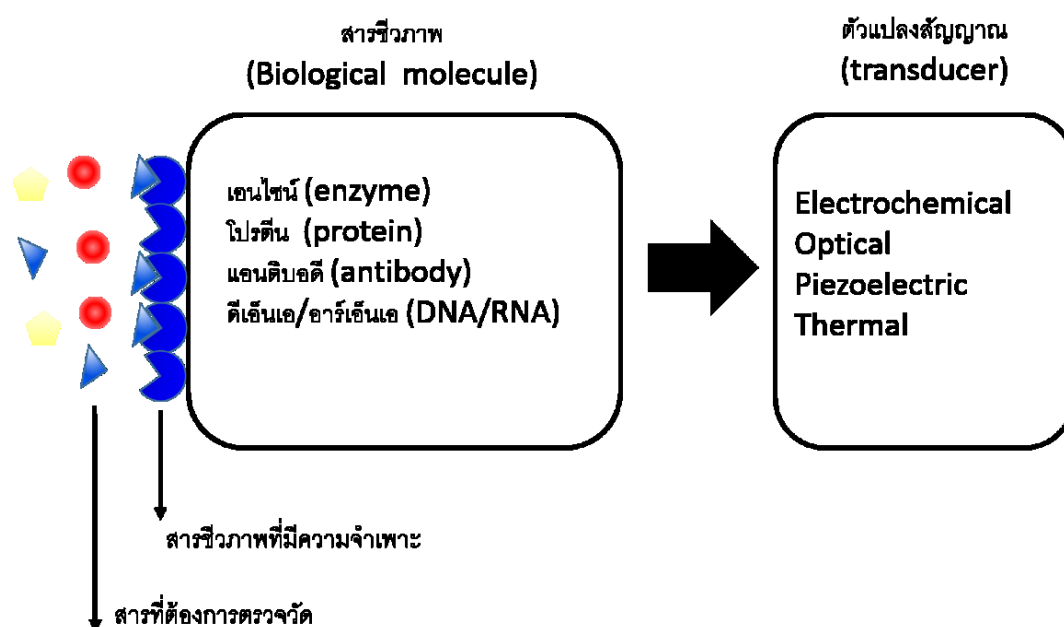
ภาพประกอบ 3 กระบวนการทำความสะอาดพื้นผิวด้วยยูวี-โอโซน (V_1 คือความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร และ V_2 คือความยาวคลื่น 184.9 นาโนเมตร)

ที่มา: Vig, J.R. (1992, October). Ultraviolet-Ozone Cleaning of Semiconductor Surfaces. Research and Development Technical Report. p.14.

ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor)

ไบโอเซนเซอร์เป็นเครื่องมือหรืออุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการตรวจวัด และสามารถทำการตรวจวัดได้หลากหลายชนิด เช่น ฮอร์โมน แบคทีเรีย เอนไซม์ แอนติบอดี กรดนิวคลีอิก ดีเอ็นเอ เป็นต้น ไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วยสองส่วนที่สำคัญคือ ส่วนของสารชีวภาพ (biological substance) และทรานสดิวเซอร์ (transducer) หรือตัวแปลงสัญญาณ (Nakamura; & Karubi. 2003: 446-468); (Paddle. 1996: 1079-1113) โดยสารชีวภาพ ต้องมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาได้อย่างเฉพาะเจาะจงกับสารตัวอย่างที่ต้องการนำมาวิเคราะห์ (Specificity) เมื่อสารชีวภาพ ทำปฏิกิริยาต่อสารที่ต้องการตรวจวัดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือทางเคมี เช่น เกิดอิเล็กตรอน เกิดการเปลี่ยนแปลงทางความต้านทานไฟฟ้าหรือสมบัติเชิงแสง ตัวแปลงสัญญาณจะทำหน้าที่ตรวจวัดความเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นสัญญาณที่สามารถตรวจวัดได้ เช่น แปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้า แสง ความถี่หรือความร้อน ดังภาพประกอบ 4 ตัวอย่างของทรานสดิวเซอร์ ได้แก่ 1. โพอเทนชิโอเมตริก ทรานสดิวเซอร์ (potentiometric transducer) ทำหน้าที่วัดความหนาแน่นของประจุที่ใช้เป็นสัญญาณ ชี้นำที่สะสมบนผิวหน้าอิเล็กโทรดที่มีกระบวนการคัดเลือกไอออน หรือก๊าซที่ต้องการวัด ตัวอย่าง ทรานสดิวเซอร์ประเภทนี้ เช่น พีเอชอิเล็กโทรดที่มีชั้นเยื่อที่เป็นแก้ว (glass membrane) คัดเลือกเฉพาะโปรตอนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่อิเล็กโทรดใช้งานเมื่อเทียบกับ อิเล็กโทรดอ้างอิง โดยที่ศักย์ไฟฟ้าสัมพันธ์กับความเข้มข้น ของไอออนในสถานะสมดุล 2. แอมเพโร เมตริก ทรานสดิวเซอร์ (amperometric transducer) อาศัยกระแสอิเล็กโทรดที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณ ชี้นำโดยการวัดในรูปของกระแสไฟฟ้า โดยแหล่งที่มาของกระแสไฟฟ้าเป็นผล มาจากการถ่ายทอด อิเล็กตรอนจากสารตัวอย่างเข้าสู่อิเล็กโทรด เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน โดยการเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์ ขนาดของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณของสารตัวอย่าง 3. ออปติคัล ทรานสดิวเซอร์ (Optical transducer) ทำงานโดยอาศัยสมบัติของแสง คือ การดูดกลืนแสง หรือการ สะท้อนของแสง เป็นต้น 4. เพียโซอิเล็กทริก คริสตัล ทรานสดิวเซอร์ (piezoelectric crystal transducer) อาศัยสมบัติที่เป็นเพียโซอิเล็กทริกซิตี (piezoelectricity) ของผลึก กล่าวคือ เมื่อมีแรงกล มากระทำต่อผลึก ทำให้เกิดอิเล็กทริกไดโพล (electric dipole) เป็นผลทำให้เกิดความต่างศักย์หรือไดโพลโมเมนต์ (dipole moment) ในทางกลับกันเมื่อให้พลังงานไฟฟ้าแก่วัสดุที่มีสมบัติเป็นเพียโซอิเล็กทริก วัสดุนั้นก็สามารถเปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าเป็นพลังงานกลได้เช่นกัน ตัวอย่างของผลึกที่เป็นเพียโซอิเล็กทริก เช่น เซรามิกพอลิเมอร์บางชนิด และควอตซ์ เป็นต้น เมื่อนำสารชีวภาพที่มีความเฉพาะเจาะจง กับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาเคลือบบนผิวหน้าของเพียโซอิเล็กทริก คริสตัล ปฏิกิริยาระหว่าง สารชีวภาพกับ สารตัวอย่าง ที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมวลทำให้ความถี่เปลี่ยนแปลงไป

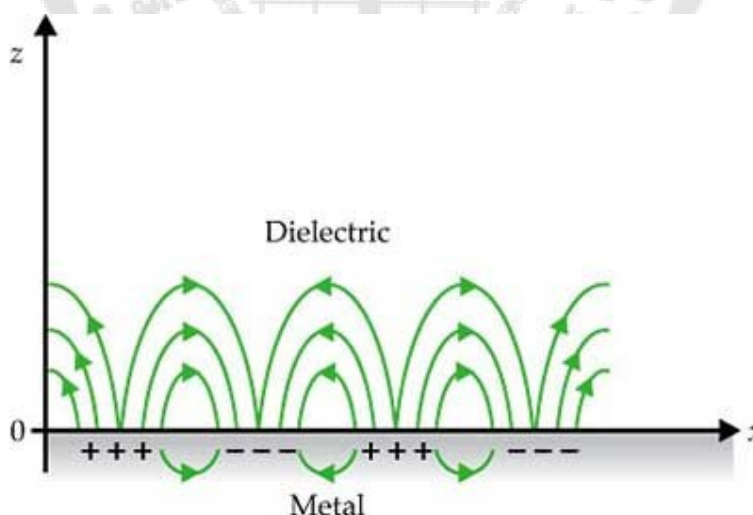
จากหลักการนี้จึงนำเอาเฟียโซอิเล็กทริก คริสตัล มาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารได้



ภาพประกอบ 4 แผนภาพแสดงหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่ประกอบด้วยส่วนของสารชีวภาพ และตัวแปลงสัญญาณ (ดัดแปลงจาก Nakamura; & Karubi. 2003: 446-468)

SPR ไบโอสเซนเซอร์ (SPR Biosensor)

เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนเรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) เป็นไบโอสเซนเซอร์เชิงแสง (optical biosensor) ที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเห (refractive-index) บนพื้นผิวโลหะ (Puttharugsa, C. 2014: 168-186) ซึ่งมีการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดสารชีวภาพต่างๆ โดยมีข้อได้เปรียบคือเป็นเทคโนโลยีที่ไม่ต้องการโมเลกุลติดฉลาก (label-free) และสามารถติดตามการตรวจวัดได้ตลอดเวลา (real-time monitoring) เทคนิค SPR จะอาศัยคลื่นผิวพลาสมอน (surface plasmon) ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหของสารตัวกลางบนพื้นผิวเซนเซอร์ ซึ่งนำมาสู่การประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัดการเข้าคู่กันของสารชีวภาพ คลื่นผิวพลาสมอนเป็นคลื่นที่สั้นอย่างพร้อมเพรียงของประจุที่บริเวณพื้นผิวโลหะ ลักษณะเฉพาะของคลื่นผิวพลาสมอน คือ แอมพลิจูดของสนามไฟฟ้ามีค่าสูงสุดที่ชั้นรอยต่อระหว่างผิวโลหะและชั้นไดอิเล็กทริก (dielectric layer) และมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วแบบเอกซ์โพเนนเชียลเมื่ออยู่ห่างจากผิวโลหะ โดยมีระยะยั้งผล (penetration depth) ประมาณ 200-300 นาโนเมตร ซึ่งจะเรียกสนามไฟฟ้านี้ว่า evanescent field นอกจากนี้คลื่นผิวพลาสมอนสามารถเคลื่อนที่ไปตามผิวรอยต่อระหว่างชั้นไดอิเล็กทริก และชั้นโลหะ (propagation length) (Ho; Lam; & Wu. 2002:3534-3540) ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 ลักษณะของคลื่นผิวพลาสมอนและ evanescent field

ที่มา: <http://www.millersville.edu/physics/experiments/087/index.php>.

การกระตุ้นคลื่นผิวพลาสมอนสามารถทำได้โดยใช้แสงในการกระตุ้น ซึ่งมีวิธีการจัดแสงแบบ “Kretschmann configuration” (Kretschmann, 1971: 313-324) ดังภาพประกอบ 6 (ก) โดยให้แสงจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) ยิงผ่านปริซึม และตกกระทบกับฟิล์มบางของโลหะซึ่งเคลือบอยู่บนปริซึม และแสงจะสะท้อนเข้าสู่ตัวตรวจวัดแสง (detector) โดยฟิล์มบางของโลหะที่สามารถเกิดปรากฏการณ์ SPR ได้คือ ทอง เงิน และโครเมียม แต่ที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ ทอง เนื่องจากมีความเสถียรสูง และเกิดปฏิกิริยาออกไซด์ได้ยาก โดยที่ความหนาของชั้นฟิล์มบางของทองโดยทั่วไปจะมีค่าประมาณ 50 นาโนเมตร เงื่อนไขการเกิดปรากฏการณ์ SPR คือ ค่าเวฟเวกเตอร์ของแสง ตกกระทบในแนวขนานกับพื้นผิวโลหะ (k_x) ดังสมการที่ 4 ต้องมีขนาดเท่ากับเวฟเวกเตอร์ของคลื่นผิวพลาสมอน (k_{sp}) ดังสมการที่ 5

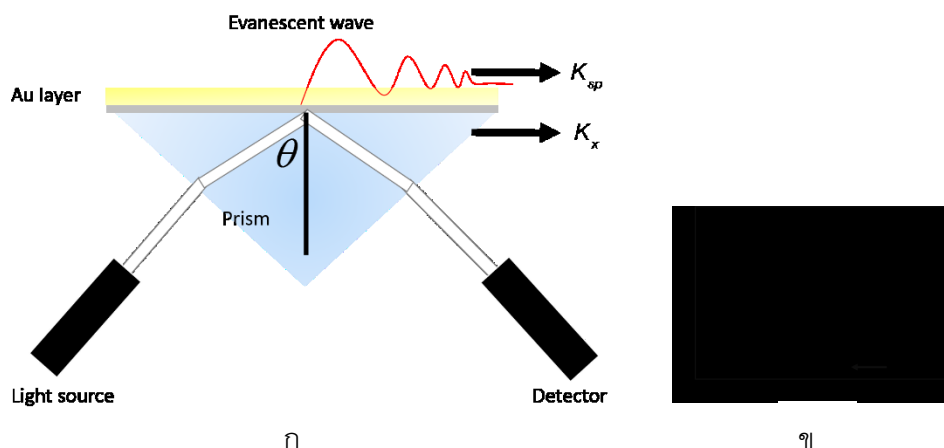
$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin \theta \quad (4)$$

$$k_{sp} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad (5)$$

เมื่อเกิดปรากฏการณ์ SPR นั่นคือ จะได้

$$\left(\frac{2\pi}{\lambda} \right) n_p \sin \theta = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad (6)$$

เมื่อ ϵ_M และ ϵ_D คือค่า dielectric permittivity ของชั้นโลหะและชั้นสารไดอิเล็กทริก ตามลำดับ λ คือความยาวคลื่นของแสงตกกระทบ n_p คือค่าดัชนีหักเหของปริซึม θ เป็นมุมตกกระทบของแสง k_0 คือ free space wave vector เนื่องจากคลื่นผิวพลาสมอนมีทิศทางขนานกับระนาบการเคลื่อนที่ของคลื่น และมีทิศทางสนามไฟฟ้าในแนวตั้งฉากกับระนาบตกกระทบ ซึ่งมีทิศทางโพลาไรเซชัน (polarization) เป็นแบบ “P” ดังนั้นแสงตกกระทบที่มีทิศทางโพลาไรเซชันแบบ “P” หรือ transverse magnetic wave ซึ่งมีทิศทางของสนามไฟฟ้าที่ตั้งฉากกับพื้นผิวที่สามารถกระตุ้นคลื่นผิวพลาสมอนได้



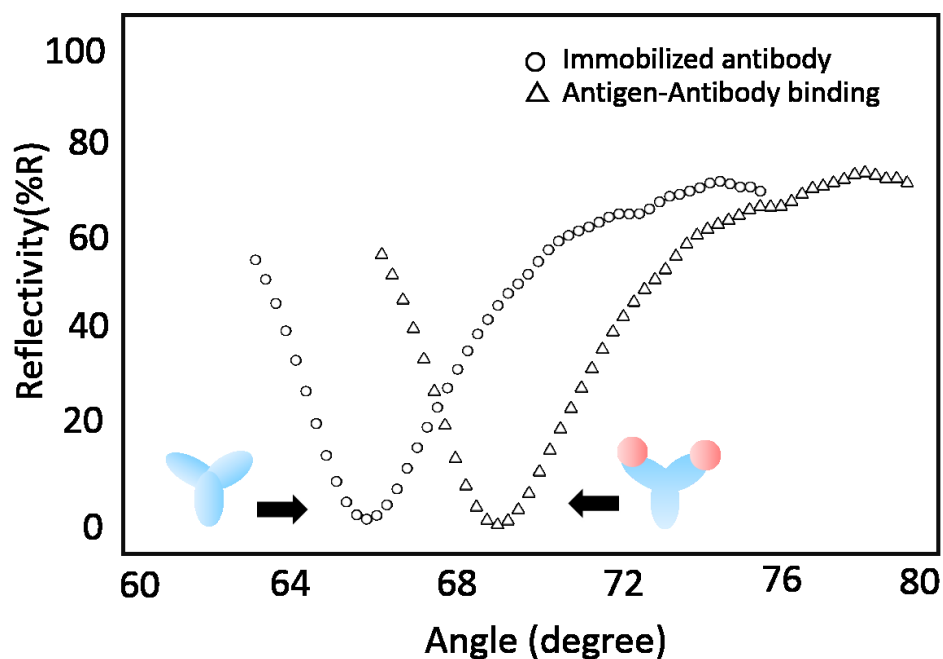
ภาพประกอบ 6 (ก) องค์ประกอบของ SPR ไปโอเซนเซอร์โดยใช้การจัดแสงแบบ Kretschman configuration (ข) ตำแหน่งมุม SPR

จากสมการที่ 6 เมื่อเกิดปรากฏการณ์ SPR ค่าเวฟเวกเตอร์ทั้งสองมีค่าเท่ากัน ส่งผลให้มีการสูญเสียพลังงานหรือโมเมนตัมของแสงตกกระทบ และทำให้ความเข้มของแสงสะท้อนจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว ณ ตำแหน่งมุมที่ทำให้ความเข้มของแสงสะท้อนต่ำสุดจะเรียกว่า “มุม SPR (θ_{SPR})” ภาพประกอบ 6 (ข)

$$\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)n_p \sin \theta_{SPR} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad (7)$$

จากสมการที่ 7 เมื่อค่าความยาวคลื่น ดัชนีหักเหของปริซึม และค่า dielectric permittivity ของโลหะ เป็นค่าคงตัว และ $\epsilon^2 = n$ เมื่อ n คือค่าดัชนีหักเหเชิงซ้อน จะได้ $\theta_{SPR} \propto n$ เมื่อพิจารณาผลต่างของมุม SPR จะได้ $\Delta\theta_{SPR} \propto \Delta n$ แสดงให้เห็นว่ามุม SPR แปรผันตรงกับค่าดัชนีหักเหของสารตัวอย่างที่อยู่บนพื้นผิวทอง ในกรณีที่นำเทคนิค SPR มาใช้ตรวจวัดคู่สารชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่น ระบบแอนติเจนแอนติบอดี ดังภาพประกอบ 7 โดยทำการตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิวทอง (immobilized antibody) และเมื่อมีการเข้าคู่กันระหว่างแอนติเจนแอนติบอดี (antibody antigen complex) ส่งผลให้มุม SPR เพิ่มขึ้น (กราฟ SPR เลื่อนไปทางขวา) เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวเซนเซอร์ โดยทั่วไปมุม SPR จะแปรผันตามปริมาณของสารชีวภาพที่อยู่บนพื้นผิว

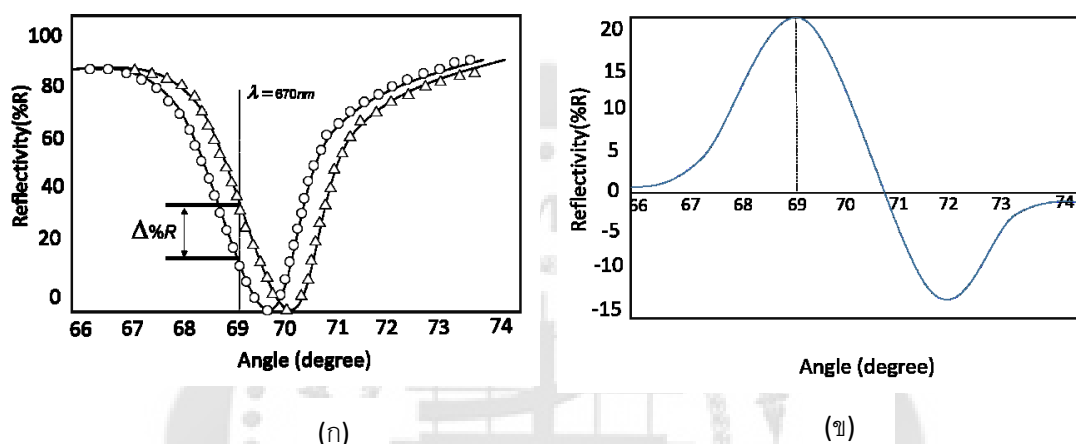
เซนเซอร์หรือตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด ส่วนผลต่างของมุม SPR ($\Delta\theta_{SPR}$) บ่งบอกถึงปริมาณของสารที่ต้องการตรวจวัดที่สามารถตรวจวัดได้



ภาพประกอบ 7 กราฟ SPR ที่วัดความเข้มแสงสะท้อนเทียบกับมุมตกกระทบ โดยที่กราฟวงกลมแทนเส้นโค้ง SPR หลังจากตรึงแอนติบอดีลงบนพื้นผิว และกราฟสามเหลี่ยมแทนเส้นโค้ง SPR หลังจากแอนติบอดีจับกันอย่างเฉพาะเจาะจงกับแอนติเจน

SPR แบบภาพ (SPR Image)

เทคนิค SPR แบบภาพจะใช้พื้นฐานของเทคนิค SPR โดยที่เทคนิคนี้จะวัดค่าความเข้มแสงสะท้อนโดยใช้กล้อง CCD (Huang; & Chen. 2006: 664-648) เมื่อทำการตั้งค่ามุมตกกระทบและความยาวคลื่นที่ค่าๆ หนึ่ง ข้อดีของเทคนิค SPR แบบภาพคือ มีความไวสูง สามารถเห็นพื้นผิวเซนเซอร์ได้ตลอดเวลา และสามารถวัดปรากฏการณ์ SPR ได้พร้อมกันหลายตำแหน่งบนพื้นผิวเซนเซอร์ในเวลาเดียวกัน แต่มีข้อจำกัดเรื่องช่วงของการวัด (dynamic range)



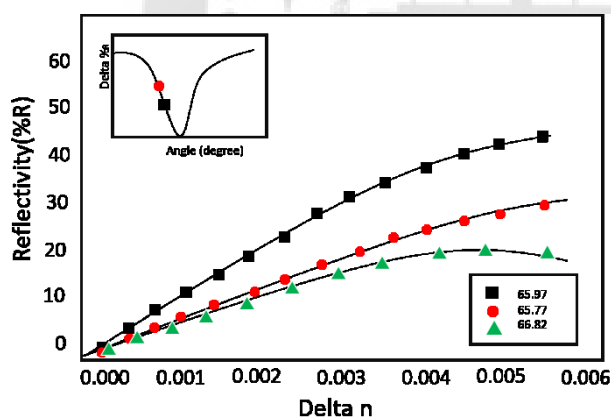
ภาพประกอบ 8 (ก) การตั้งค่ามุมตกกระทบให้คงที่ และวัดค่าความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลง เมื่อ

$n = 1.330$ และ $n = 1.333$ (ข) แสดงผลต่างของกราฟ SPR ที่มีค่าดัชนีหักเห $n = 1.330$ และ $n = 1.333$ โดยที่มุม 69.08 องศา จะให้ค่าผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อน ($\Delta\%R$) มากที่สุด (ดัดแปลงจาก: Smith; & Corn. 2003: 320A-332A)

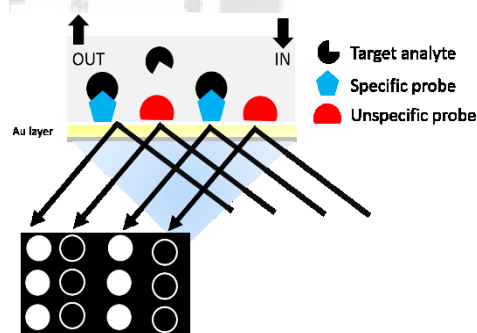
จากภาพประกอบ 8 (ก) แสดงกราฟ SPR ที่มีค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวเซนเซอร์ที่ต่างกัน คือ $n = 1.330$ และ $n = 1.333$ เมื่อตั้งค่ามุมตกกระทบของแสงความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร ที่มุม 69.08 องศา เมื่อค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวเซนเซอร์เป็น $n = 1.330$ ดังภาพประกอบ 8 (ก) (กราฟวงกลม) ค่าความเข้มแสง (%R) ที่วัดได้เป็น 20.95 %R เมื่อค่าดัชนีหักเหเปลี่ยนแปลงไปเป็น $n = 1.333$ ภาพประกอบ 8 (ก) (กราฟสามเหลี่ยม) กราฟ SPR เลื่อนมาทางขวามือ และค่าความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 39.11 %R เมื่อคำนวณผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อน ($\Delta\%R$) มีค่าประมาณ 18 %R จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหเพียงเล็กน้อยบนพื้นผิวเซนเซอร์สามารถตรวจวัดได้จากผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อน การหาค่ามุมที่ให้ผลต่างของความเข้มแสงมากที่สุดหาได้จาก

การนำกราฟ SPR ที่มีค่าดัชนีหักเหที่ต่างกันนำมาลบกัน ดังภาพประกอบ 8 (ข) ซึ่งมุมที่ให้ค่าผลต่างมากที่สุดจะอยู่ทางซ้ายมือของกราฟ SPR เนื่องจากลักษณะอสมมาตรของ กราฟ SPR นั้นเอง จะเห็นว่าที่ตำแหน่งมุมอื่นๆ จะให้ผลต่างของความเข้มแสงสะท้อนที่ลดต่ำลงส่งผลให้ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหน้อยลง ดังนั้นการตั้งค่ามุมตกกระทบของแสงจึงมีความสำคัญสำหรับเทคนิค SPR แบบภาพ

ข้อจำกัดของ SPR แบบภาพคือช่วงการวัดที่มีจำกัด ดังภาพประกอบ 9 (ก) จะเห็นว่าที่มุมที่ให้ค่าผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อนมากที่สุดหรือมุมที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหมากที่สุดจะมีช่วงการวัด $\Delta\%R$ ประมาณ 30% ถ้าค่าดัชนีหักเหมีการเปลี่ยนแปลงมาก การเปลี่ยนแปลงของ $\Delta\%R$ จะเปลี่ยนแปลงไม่เป็นเชิงเส้น และถ้าตั้งมุมที่ตำแหน่งอื่นๆ จะทำให้ความไวของการตรวจวัดต่ำลง และช่วงการวัดต่ำลงตามไปด้วย ภาพประกอบ 9 (ข) แสดงองค์ประกอบของ SPR แบบภาพ และข้อดีของเทคนิคนี้คือสามารถตรวจวัดสารที่สนใจได้หลายตัวพร้อมๆ กัน โดยมีรายงานสำหรับการใช้ SPR แบบภาพในการตรวจวัดสารชีวภาพต่างๆ มากกว่า 1,000 จุด พร้อมกันบนพื้นผิวเซนเซอร์ (Campbell; & Kim. 2007: 2380-2392)



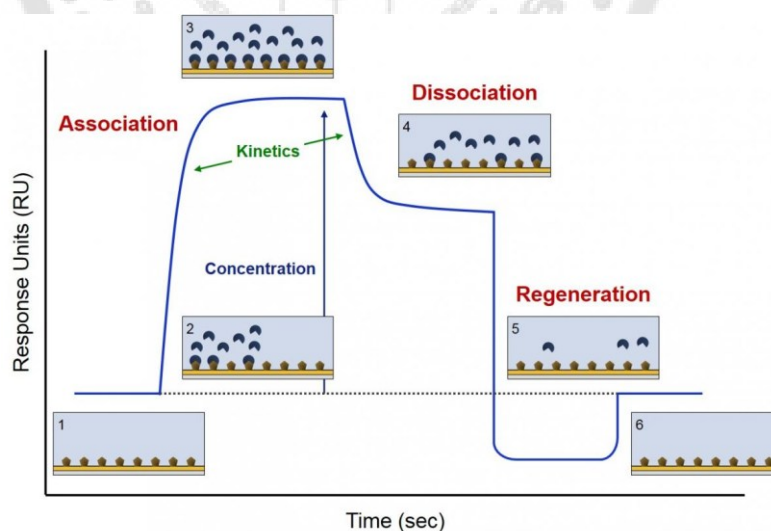
(ก)



(ข)

ภาพประกอบ 9 (ก) การตั้งค่ามุมที่ตำแหน่งต่างๆ และวัดค่าผลต่างของความเข้มของแสงสะท้อนที่ค่าดัชนีหักเหต่างๆ กัน (ข) องค์ประกอบของ SPR แบบภาพที่มี CCD เป็นตัวตรวจวัดความเข้มแสงของตำแหน่งที่สนใจ (region of interest, ROI) (ดัดแปลงจาก Scarno; et al. 2010: 957-966)

สัญญาณ SPR สามารถติดตามการตรวจวัดได้ตลอดเวลา ซึ่งเป็นการวัดตำแหน่งมุม SPR เทียบกับเวลา (ในกรณีของ SPR แบบภาพ จะวัด $\Delta\%R$ เทียบกับเวลา) ซึ่งกราฟลักษณะนี้จะเรียกว่า “SPR sensorgram” ดังภาพประกอบ 10 โดยใช้คู่สารชีวภาพที่มีความจำเพาะเป็นระบบทดสอบ แอนติบอดี (รูปตัวห้าเหลี่ยม) ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ เมื่อระบบมีแอนติเจน (รูปวงกลมเล็ก) ผ่านมายังพื้นผิวเซนเซอร์ ทำให้ค่าดัชนีหักเหของระบบเพิ่มขึ้น และทำให้สัญญาณ SPR เพิ่มขึ้น ช่วงนี้เรียกว่า association ซึ่งเป็นช่วงที่คู่แอนติเจนและแอนติบอดีเข้ามาใกล้กันและจับกันแบบจำเพาะ ลักษณะความชันของกราฟช่วงนี้จะแสดงถึงความเร็วของการจับกันของคู่สารชีวภาพ จนกระทั่งถึงจุดสมดุล หลังจากนั้น แอนติเจนที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดีหรือจับกันไม่แรงพอจะไหลออกจากระบบ ทำให้ค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวลดลงและทำให้สัญญาณ SPR ลดลง ช่วงนี้เรียกว่า dissociation ข้อมูลในช่วง association และ dissociation สามารถนำมาคำนวณหาค่า affinity ที่แสดงถึงความแรงของการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี ปริมาณแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดี วัดจากตำแหน่งของช่วง dissociation ถึง baseline นอกจากนี้ยังสามารถชะล้างแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์ โดยใช้สารละลายที่เหมาะสมเพื่อทำการตรวจวัดแอนติเจนชนิดอื่นๆ ช่วงนี้เรียกว่า regeneration และทำให้สัญญาณ SPR กลับมาเท่าที่ตำแหน่ง baseline ตอนเริ่มต้น ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของเทคนิค SPR ที่สามารถนำพื้นผิวเซนเซอร์กลับมาใช้ใหม่ได้

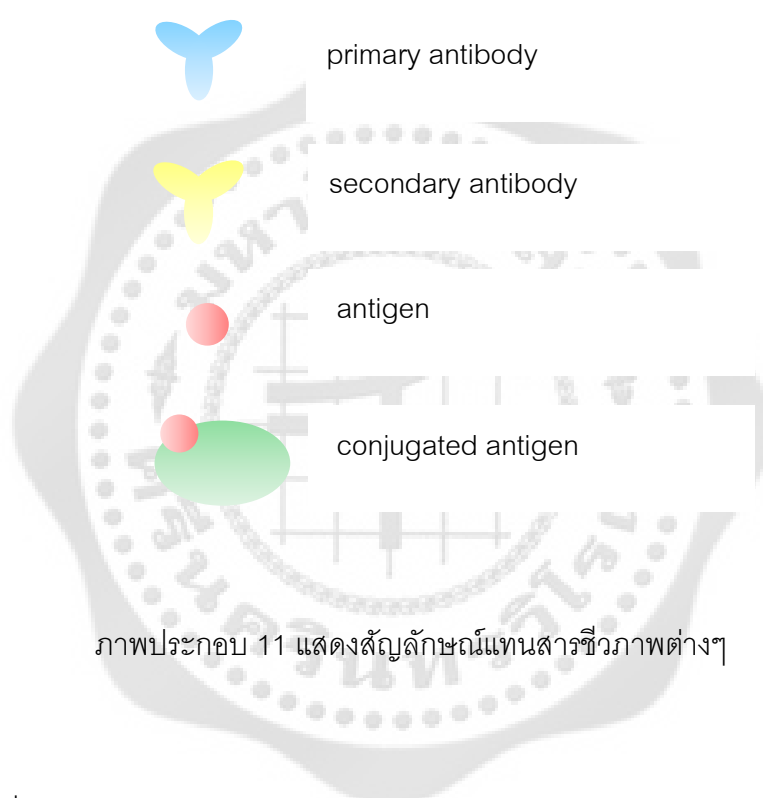


ภาพประกอบ 10 SPR sensorgram สำหรับการตรวจวัดคู่สารชีวภาพ ด้วยเทคนิค SPR

ที่มา: <http://pubs.acs.org/subscribe/archive/mdd/v04/i02/figures/arbery-fig2.gif>

รูปแบบการตรวจวัด (detection platform) (Homola. 2006: 184-186)

การเลือกรูปแบบการตรวจวัดต่างๆ ให้เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพโดยใช้เทคนิค SPR จะต้องคำนึงถึงขนาดหรือมวลโมเลกุลของสารตัวอย่าง ความไวของเครื่องมือ และการนำไปประยุกต์ใช้กับสารชีวภาพแบบต่างๆ ภาพประกอบ 11 แสดงสารชีวภาพในระบบของแอนติบอดีและแอนติเจน ซึ่งเป็นสารชีวภาพตัวอย่างสำหรับรูปแบบในการตรวจวัดสารชีวภาพโดยใช้เทคนิค SPR

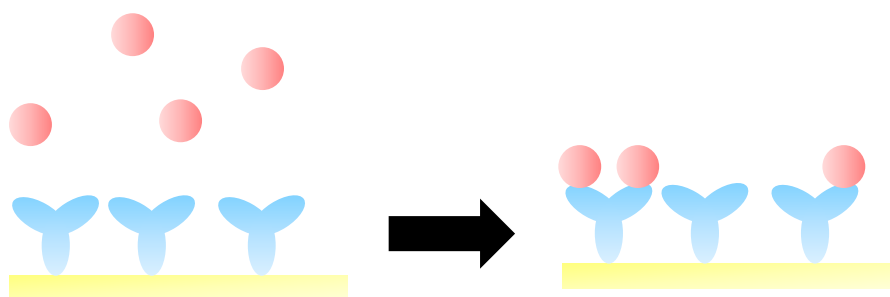


ภาพประกอบ 11 แสดงสัญลักษณ์แทนสารชีวภาพต่างๆ

โดยทั่วไปแล้วรูปแบบการตรวจวัดสารชีวภาพด้วยเทคนิค SPR สามารถจำแนกได้เป็น 4 รูปแบบดังนี้ คือ

การตรวจวัดโดยตรง (direct detection)

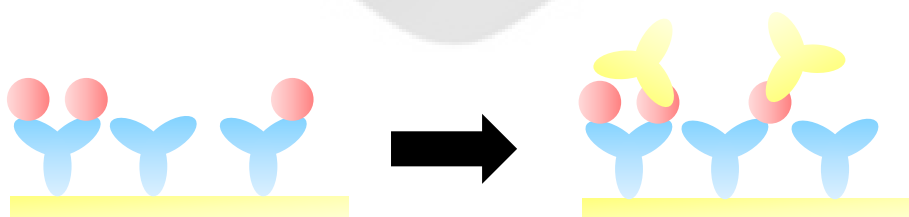
การสร้างพื้นผิวเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัดโดยตรง ทำโดยการตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์และตรวจวัดแอนติเจน ดังภาพประกอบ 12 ในกรณีนี้สัญญาณ SPR จะแปรผันตามความเข้มข้นของแอนติเจนในสารตัวอย่างรูปแบบการตรวจวัดแบบนี้เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่หรือขนาดกลาง เพราะว่าสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวเซนเซอร์ได้น้อย หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง



ภาพประกอบ 12 แสดงการตรวจวัดโดยตรง

Sandwich assay

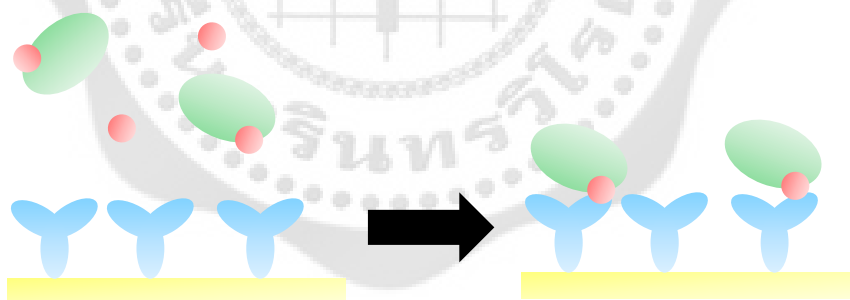
รูปแบบการตรวจวัด sandwich assay จะประกอบด้วยสองขั้นตอน ดังภาพประกอบ 13 โดยขั้นตอนแรก แอนติบอดี (primary antibody) จะถูกตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดแอนติเจน ซึ่งเป็นรูปแบบการตรวจวัดโดยตรงนั่นเอง ขั้นตอนที่ 2 ทำการผ่านแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody, ส่วนใหญ่จะเลือกใช้เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี) และแอนติบอดีตัวที่สองจะจับกับแอนติเจนที่อยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ ซึ่งรูปแบบการตรวจวัดนี้จะเป็นการเพิ่มความไว (sensitivity) ของสัญญาณ SPR โดยสัญญาณ SPR จะแปรผันตามปริมาณของแอนติเจนที่อยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ และความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่สอง นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มความจำเพาะ (selectivity) ของระบบการตรวจวัด เนื่องจากแอนติบอดีตัวที่สองจะต้องมีความจำเพาะกับแอนติเจนเท่านั้น



ภาพประกอบ 13 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดแบบ sandwich assay

Competitive assay

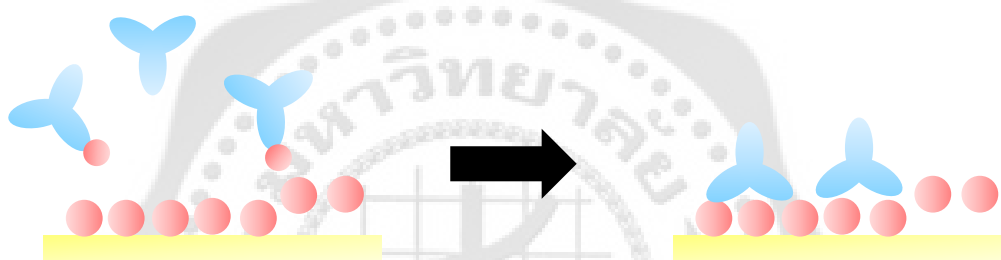
การตรวจวัดในรูปแบบ competitive assay จะใช้สำหรับการตรวจวัดสารชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กที่ไม่สามารถตรวจวัดได้โดยใช้รูปแบบการตรวจวัดโดยตรง หรือการตรวจวัดแบบ sandwich assay ในรูปแบบการตรวจวัดนี้จะใช้หลักการแย่งกันจับของแอนติเจนที่ติดฉลาก (conjugated antigen) และแอนติเจนอิสระ (free antigen) กับแอนติบอดี บนพื้นผิวเซนเซอร์ โดยแอนติเจนจะถูกติดฉลากกับสารชีวภาพที่มีขนาดใหญ่กว่า เช่น bovine serum albumin (BSA) หรือโปรตีนเคซีน (casein) ในขั้นตอนการตรวจวัดแอนติเจนอิสระและแอนติเจนที่ติดฉลากจะผสมกันก่อน โดยใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยความเข้มข้นคงที่ เมื่อผ่านแอนติเจนทั้งสองแบบไปบนพื้นผิวเซนเซอร์ แอนติเจนทั้งสองจะแย่งกันจับกับแอนติบอดี ดังภาพประกอบ 14 และสัญญาณ SPR ที่ได้จะแปรผันแบบผกผันกับความเข้มข้นของแอนติเจนอิสระ นั่นคือ ถ้ามีปริมาณของแอนติเจนอิสระมาก (มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก) ในสารตัวอย่างจะทำให้แอนติเจนอิสระจับกับแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์ได้มากกว่าแอนติเจนที่ติดฉลากจึงส่งผลให้ได้สัญญาณ SPR น้อยลง ในทางตรงกันข้ามถ้าปริมาณของแอนติเจนอิสระน้อย จะทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากจับกับแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์ได้มากกว่า และทำให้ได้สัญญาณ SPR มากกว่า (ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ติดฉลากคงที่)



ภาพประกอบ 14 แสดงรูปแบบการตรวจวัดแบบแย่งจับ

Inhibition assay

การตรวจวัดแบบ Inhibition assay ดังภาพประกอบ 15 โดยสารชีวภาพที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (แอนติเจน) จะถูกผสมก่อนกับแอนติบอดีที่จะจับกับแอนติเจนเป้าหมาย ต่อจากนั้นทำการผ่านสารชีวภาพที่ผสมไปบนพื้นผิวเซนเซอร์ที่มีแอนติเจนถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวเซนเซอร์ และแอนติบอดี ที่ไม่ได้ทำอันตรกิริยากับแอนติเจนจะจับกับแอนติเจนที่ถูกตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์ ส่วนแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนตอนต้นไม่สามารถจับกับแอนติเจนที่ถูกตรึงบนพื้นผิวเซนเซอร์ได้ ส่งผลให้สัญญาณ SPR ที่ได้แปรผันแบบผกผันกับปริมาณของสารชีวภาพที่ต้องการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับการตรวจวัดแบบ competitive assay

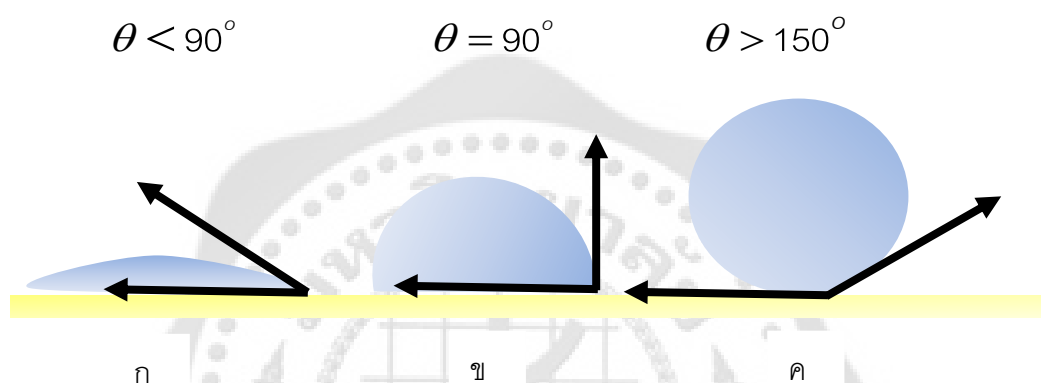


ภาพประกอบ 15 แสดงรูปแบบการตรวจวัดแบบ inhibition assay

การวัดมุมสัมผัส (contact angle measurement)

การวัดมุมสัมผัสของพื้นผิวสามารถทำได้โดยการหยดของเหลวบนพื้นผิวที่ต้องการตรวจวัด ซึ่งของเหลวจะทำมุมกับพื้นผิว เรียกว่า มุมสัมผัส (contact angle) ค่ามุมสัมผัสจะบอกถึงการกระจายตัวของของเหลวบนพื้นผิว คือความสามารถของของเหลวในการรักษาน้ำสัมผัสกับพื้นผิว มุมสัมผัสที่น้อยกว่า 90 องศา โดยทั่วไปจะหมายถึง ภาวะการกระจายตัวของของเหลวบนพื้นผิวอยู่ในระดับดีมาก และของเหลวจะกระจายออกไปเป็นบริเวณกว้าง มุมสัมผัสที่มากกว่า 90 องศา โดยทั่วไปจะหมายถึง ภาวะการกระจายตัวของของเหลวบนพื้นผิวอยู่ในระดับไม่ดี และของเหลวจะสัมผัสกับพื้นผิวของเหลวเพียงเล็กน้อย และจะก่อตัวเป็นทรงหยดน้ำค้าง

สำหรับกรณีถ้าของเหลวนั้นเป็นน้ำ พื้นผิวที่มีการกระจายตัวได้ดีจะถูก เรียกว่า ไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic) ดังภาพประกอบ 16 (ก) และพื้นผิวที่มีการกระจายตัวไม่ดีจะถูกเรียกว่าไฮโดร-โฟบิก (Hydrophobic) ดังภาพประกอบ 16 (ข) พื้นผิวที่มีการกระจายตัวไม่ดีอย่างยิ่งยวด (Superhydrophobic) จะให้มุมสัมผัสที่มากกว่า 150 องศา ทำให้มีน้ำสัมผัสระหว่างของเหลวและของแข็งน้อยมากๆ ซึ่งกรณีนี้บางครั้งถูกเรียกว่า "Lotus effect" หรือ "ปรากฏการณ์ใบบัว " ดังภาพประกอบ 16 (ค)



ภาพประกอบ 16 ลักษณะมุมสัมผัสของหยดน้ำ (ก) พื้นผิวมีความชอบน้ำ (ข) พื้นผิวมีความชอบน้ำน้อย (ค) พื้นผิวมีความไม่ชอบน้ำ (ดัดแปลงจาก: Yuehua Y; & Randall Lee T. 2013: p.4)

ลักษณะมุมสัมผัสของหยดน้ำที่แตกต่างกันเป็นผลมาจาก แรงตึงผิว (surface tension) คือ แรงยึดเหนี่ยวที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของแข็งกับของเหลว ของเหลวกับอากาศ และของแข็งกับอากาศ ดังภาพประกอบ 17 เมื่อพิจารณาแรงที่เกิดขึ้นภายในของเหลว ในแต่ละโมเลกุลจะเกิดแรงที่ดึงกันในทุกทิศทางกับโมเลกุลใกล้เคียง ส่งผลให้ผลลัพธ์ของแรงเป็นศูนย์อยู่ในสภาวะสมดุล แต่เมื่อพิจารณาที่ผิวรอยต่อระหว่างของเหลวและของแข็งจะเกิดความไม่สมดุลของแรง คือการเกิดพลังงานอิสระที่ผิวของของเหลว เรียกว่าพลังงานอิสระพื้นผิว (surface free energy) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการของยัง (Young's equation) (Young, 1805: 65) ดังสมการที่ 8

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{SL} \cos \theta \quad (8)$$

เมื่อ γ_{SV} , γ_{LV} และ γ_{SL} คือ พลังงานอิสระที่ผิวรอยต่อของ ของแข็ง/ไอ, ของเหลว/ไอ และ ของแข็ง/ของเหลว

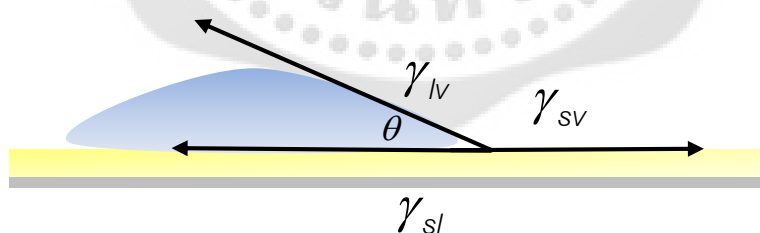
Complete wetting เกิดขึ้นเมื่อ $\theta = 0$ โดยปกติของเหลว ใดๆ จะแพร่กระจายได้บนพื้นผิวได้ เมื่อค่า surface energy ของตัวของเหลวนั้นมีค่าต่ำกว่า solid surface energy และ spontaneous wetting เกิดเพื่อของเหลวนั้นมีค่า surface tension ที่มากกว่าค่าวิกฤต สำหรับค่าความตึงผิวนั้น หาได้จากสมการของ Owens-Wendt ดังสมการที่ 9

$$\gamma(1 + \cos \theta) = 2(\sqrt{\gamma_l^d \gamma_s^d} + \sqrt{\gamma_l^p \gamma_s^p}) \quad (9)$$

โดยที่ γ_l คือ surface tension ของ liquid

γ^d และ γ^p คือ dispersion และ polar component ค่าที่ต้องการทราบ คือ γ_l^d และ γ_l^p

ในกรณีที่มีการหยดของเหลวลงบนพื้นผิวนั้นจะมีสองแรงหลักที่มีผลต่อการหยดของของเหลว คือ แรงระหว่างพื้นผิวที่มีต่อหยดของเหลว (γ_{SL}) ซึ่งจะเป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการกระจายตัวออก (spreading) ของของเหลวบนพื้นผิว และการกระจายตัวของหยดของเหลวบนพื้นผิวนั้นก็เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างหยดของของเหลว และไอ γ_{LV} ที่มีผลทำให้ค่าของ surface energy ระหว่างของเหลวและไรมีค่าเพิ่มขึ้น

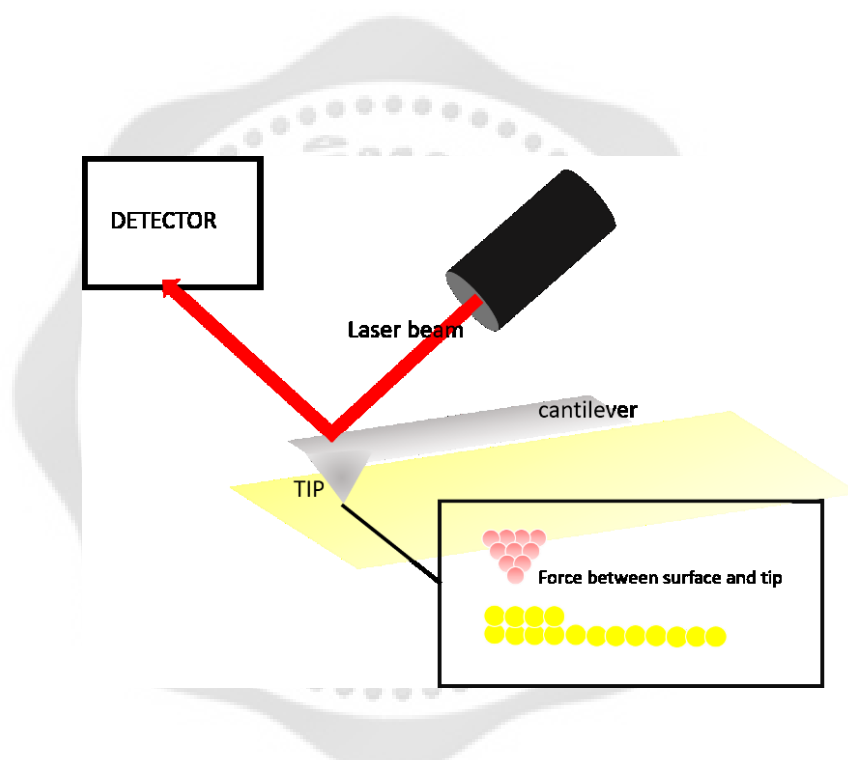


ภาพประกอบ 17 แรงตึงผิวที่รอยต่อระหว่างของแข็งกับของเหลว ของเหลวกับอากาศ

และของแข็งกับอากาศ

กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope, AFM)

กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (จุฑพร วุฒิกนกกาญจน์; ม.ป.ป. 1-9) เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ในการพิจารณาสภาพพื้นผิวของวัสดุประเภทต่างๆ ได้ โดยมีหลักการพื้นฐาน คือ การใช้เข็มตรวจวัดขนาดเล็ก (probe tip) ที่ทำมาจากวัสดุ silicon nitride (Si_3N_4) เคลื่อนที่สแกน (Scanning) ไปทั่วบริเวณต่างๆ ของผิววัสดุ โดยการควบคุมของตัว Piezoelectric Scanner ซึ่งสภาพผิวของวัสดุที่แตกต่างกันไป จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับเข็มตรวจวัด (Probe Tip) แตกต่างกันไป (ตัวคานที่เข็มเกาะติดอยู่จะโค้งงอ (Bending) เกิดขึ้น ซึ่งสามารถถูกตรวจวัดได้โดย photodetector ดังภาพประกอบ 18 จึงทำให้ได้ภาพที่ออกมาสอดคล้องตามสภาพพื้นผิวในแต่ละบริเวณ



ภาพประกอบ 18 องค์ประกอบหลักของกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (AFM)

สิ่งที่ทำให้คานที่มีเข็มเกาะอยู่เกิดการโค้งงอขึ้นก็คือ แรงกระทำระหว่างอะตอม ซึ่งอาจจะ เป็นแรงดึงดูด หรือแรงผลักก็ได้ขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างเข็มปลายแหลม (Tip) ดังนั้น เทคนิค AFM จึงสามารถใช้ทำการศึกษได้หลายวิธี อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะเป็นการใช้ AFM ในวิธีใด แรงกระทำ ที่เกิดขึ้น ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพพื้นผิวชิ้นงาน และทำให้ได้ภาพที่สอดคล้องกับสภาพผิว ของวัสดุเช่นกัน โดยที่ AFM มี 3 รูปแบบ (Mode) ที่สำคัญ คือ

1. Contact mode เป็นการวัดสภาพพื้นผิวชิ้นงาน โดยการขยับให้เข็มไทดัล (Slide) ไปบนผิวงานซึ่งจะทำให้มีแรงผลักระหว่างเข็มกับผิวงานจะอยู่ใกล้กันมาก (ประมาณ 1-2 Angstrom) ซึ่งแรงผลักระหว่างเข็มกับผิวงานนี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามรูปทรงผิวงาน ซึ่งจะทำให้มีการโค้งงอของคาน (Cantilever) ที่มีเข็มยึดเกาะอยู่ปลาย โดยมีความยาวของการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องเป็นไปตามลักษณะรูปทรงของผิวงาน

อย่างไรก็ตาม เทคนิคแบบ Contact Mode นี้จะมีข้อเสีย คือ ในการที่จะลากให้เข็มตรวจวัดเคลื่อนที่ไทดัลเข้าไปยังบริเวณต่างๆ บนผิวงาน อาจจะทำให้เกิดตำหนิ หรือสภาพพื้นผิววัสดุที่ต่างไปจากสภาพเดิมที่แท้จริง (Artifact) และความเสียหายเกิดขึ้นแก่ผิวงานได้ ยกตัวอย่างเช่น ภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ ที่ซึ่งมีอากาศและความชื้นในอากาศ จะเกิดหยดน้ำหรือสิ่งสกปรกติดอยู่บนผิวงาน ซึ่งเมื่อเกิดการเคลื่อนที่สแกนของเข็มวัดไปสัมผัสกับผิวที่มีชั้นบางๆ ของหยดน้ำที่มีสิ่งสกปรกติดอยู่จะทำให้มีแรงดึง (แรงไฟฟ้าสถิต และแรงตึงผิว) ดึงให้ตัวคานที่มีเข็มยึดเกาะอยู่ปลายเคลื่อนที่ ลงมาสัมผัสกับชั้นดังกล่าว ทำให้ผลต่อค่าแรงระหว่างเข็มกับผิวงานที่เกิดขึ้นโดยรวมเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังทำให้ผิวงานถูกทำลาย เช่น การฉีกขาดจากการลากเข็มไปบนผิวงาน

2. Non-Contact mode เทคนิคแบบ Non-Contact mode ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการทำลายผิวงาน โดยในที่นี้ตัวเข็มปลายแหลมจะถูกยกขึ้นมาให้มีระยะห่างเหนือผิวงานสูงมากขึ้น คือประมาณ 10-100 Angstrom จึงไม่มีปัญหาเรื่องการทำลายโครงสร้างผิวงาน โดยในกรณีนี้ แรงกระทำระหว่างตัวคานที่มีเข็มปลายแหลมยึดเกาะอยู่กับผิวงานจะเป็นลักษณะแรงดึงดูด ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามรูปทรงของสภาพผิวงานเช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตาม วิธีนี้จะมีข้อจำกัดที่เกี่ยวกับความละเอียดของภาพที่เกิดขึ้น นั่นคือ แรงดึงดูดประเภท Van der Waals ที่เกิดขึ้นระหว่าง tip กับ พื้นผิว ในกรณีนี้จะเป็นแรงที่อ่อนกว่าเมื่อเทียบกับแรงผลักระหว่างเข็มกับผิวงานที่เกิดขึ้นในกรณีของ Contact Mode (ปกติอยู่ที่ประมาณ 10^{-12} N) ดังนั้นสัญญาณการเปลี่ยนแปลงจึงอาจจะไว (Sensitive) ต่อสิ่งแปลกปลอมที่อยู่บนผิวงาน อย่างเช่นหยดน้ำที่เกาะอยู่บนผิว

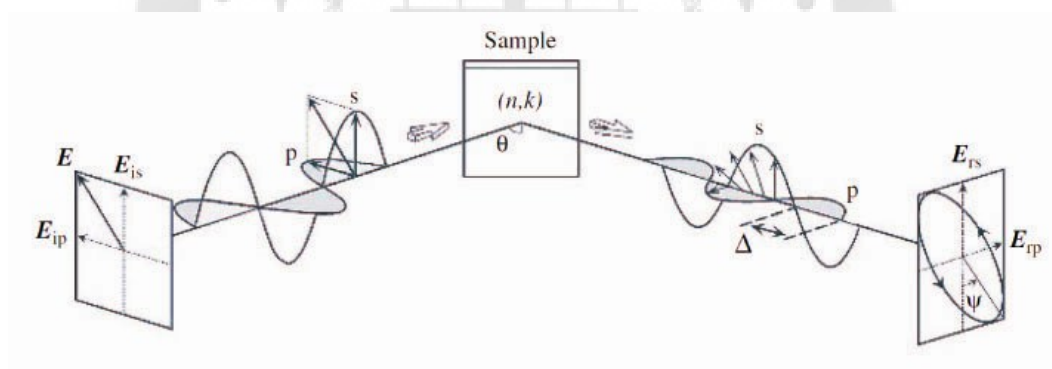
3. Tapping Mode เป็นเทคนิคที่รวมเอาลักษณะของการวัดทั้งในแบบของ Contact mode และ Non-Contact mode เข้าด้วยกัน กล่าวคือ ยังคงให้มีการสัมผัสกันระหว่างเข็มกับผิวงานในระยะที่ใกล้กันมาก เหมือนกับกรณีของ Contact Mode เพื่อให้เกิดภาพที่ชัดเจน ในขณะเดียวกัน ก็ยังมีการสั่นหรือขยับเข็มปลายแหลมให้เคลื่อนที่ขึ้นลงไปพร้อมๆ กับการเคลื่อนที่สแกนไปยังบริเวณต่างๆ บนผิวงาน ดังนั้น จึงเป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาการลากไทดัลเข็มปลายแหลม ซึ่งจะทำให้เกิดการทำลายสภาพผิวงานได้ ดังที่เคยเป็นปัญหาใน Contact Mode

สเปกโตรสโคปิก อีลิปโซเมทรี (Spectroscopic Ellipsometry)

สเปกโตร สโคปิกอีลิปโซเมทรี (โรสลีนา ยูโซะ. 2554: 17-18) เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดการเปลี่ยนแปลงโพลาไรเซชันของแสงสะท้อนออกจากผิววัสดุ โดยผลการวัดจะอยู่ในรูปของการเปลี่ยนแปลงเฟสของแสงตกกระทบกับแสงสะท้อน ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเฟสของคลื่นในแนว p และ s โดยนิยามการเปลี่ยนแปลงเฟสของคลื่นก่อนและหลังการสะท้อนของคลื่นในแนว p และ s ว่า Δ ดังสมการที่ 10

$$\Delta = \delta_p - \delta_r \quad (10)$$

เมื่อ δ_p คือเฟสของคลื่นในแนว p ก่อนการสะท้อนที่ผิวรอยต่อของตัวกลาง
 δ_r คือเฟสของคลื่นในแนว p และ s หลังการสะท้อนที่ผิวรอยต่อของตัวกลาง
 โดย Δ มีค่าอยู่ในช่วง -180° ถึง $+180^\circ$ หรือ 0° ถึง 360°



ภาพประกอบ 19 แสดงระนาบตกกระทบซึ่งประกอบไปด้วยแอมพลิจูดของสนามไฟฟ้าที่เคลื่อนที่เข้าและตั้งฉากกับพื้นผิวดังตัวอย่าง โดยมีแอมพลิจูดของสนามไฟฟ้าในแนวขนาน (E_p) และสนามไฟฟ้าในแนวตั้งฉาก (E_s) กับระนาบตกกระทบ

ที่มา: http://www.kristoflodewijks.be/?page_id=262

เมื่อพิจารณาสัมประสิทธิ์แอมพลิจูดการสะท้อนของคลื่นจากสมการเฟรสเนล ดังสมการที่ 11 และสมการที่ 12

$$\tilde{r}_p = \frac{\tilde{E}_{rp}}{\tilde{E}_{ip}} \quad (11)$$

$$\tilde{r}_s = \frac{\tilde{E}_{rs}}{\tilde{E}_{is}} \quad (12)$$

เมื่อ r_p คือสัมประสิทธิ์การสะท้อนในแนวขนานกับระนาบตกกระทบ
 r_s คือสัมประสิทธิ์การสะท้อนในแนวตั้งฉากกับระนาบตกกระทบ

โดยสัมประสิทธิ์การสะท้อนทั้งหมดของคลื่นในแนว p และ s สามารถอธิบายในรูปของอัตราส่วนแอมพลิจูดของแสงที่สะท้อนในแนวขนานกับระนาบตกกระทบต่อแอมพลิจูดของแสงที่สะท้อนในแนวตั้งฉากกับระนาบตกกระทบว่าเป็นปริมาณ psi ดังสมการที่ 13

$$\tan \varphi = \frac{|\tilde{r}_p|}{|\tilde{r}_s|} \quad (13)$$

โดย φ อยู่ในรูปของมุม $\tan$ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0° ถึง 90°

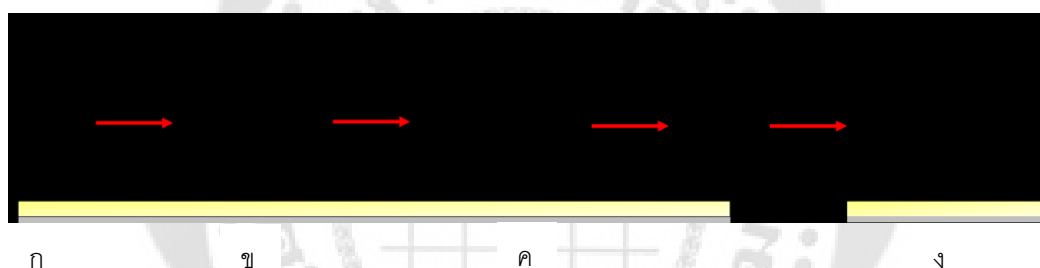
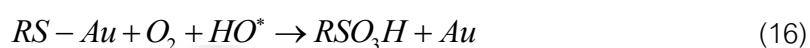
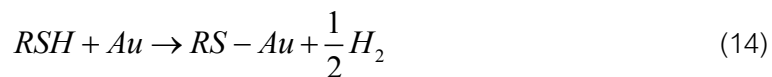
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปี พ.ศ. 2535 (ค.ศ.1992) Vig, J.R. (Vig. 1992: 1-39) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของการทำความสะอาดพื้นผิวด้วยยูวี-โอโซน โดยศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการทำความสะอาดสิ่งปนเปื้อนบนพื้นผิว คือ ความยาวคลื่นจากหลอดยูวีที่มีความยาวคลื่น 184.9 และ 253.7 นาโนเมตร และปฏิกิริยาออกซิเดชันของเรดิคัลของอะตอมออกซิเจน Vig, J.R. ได้ออกแบบการทดลองโดยมีตัวอย่างที่มีพอลิเมอร์เคลือบอยู่ 2 ตัวอย่าง แยกกันอยู่ 2 กล้อง โดยที่กล้องที่ 1 สิ่งปนเปื้อนบนพื้นผิวจะถูกทำความสะอาดด้วยพลังงานจากความยาวคลื่นที่ 184.9 และ 253.7 นาโนเมตร และถูกออกซิเดชันโดยเรดิคัลของอะตอมออกซิเจนพร้อมกัน และกล้องที่ 2 เป็นการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการทำความสะอาดสิ่งปนเปื้อนบนพื้นผิว ดังนี้ คือ 1. ผลของปฏิกิริยาออกซิเดชันจากอะตอมของออกซิเจนที่มีผลต่อการทำความสะอาดพื้นผิวเพียงอย่างเดียว 2. ผลของความยาวคลื่นที่ 253.7 นาโนเมตร ที่มีผลต่อการทำความสะอาดพื้นผิวเพียงอย่างเดียว และ 3. ผลของความยาวคลื่นที่ 253.7 นาโนเมตร และการถูกออกซิเดชันโดยเรดิคัลของอะตอมออกซิเจน ผลการทดลองปรากฏว่า ตัวอย่างที่ถูกทำความสะอาดด้วยแสงยูวีที่มีความยาวคลื่น ทั้ง 253.7 และ 184.9 นาโนเมตรถูกทำความสะอาดได้ดีที่สุด

ปี พ.ศ. 2555 (ค.ศ. 2012) Vashist, S.K. (Vashit. 2012: 23-25) ได้ทำการชะล้างพื้นผิว SPR ที่ถูกปรับปรุงสภาพพื้นผิวด้วย (3-Aminopropyl)-triethoxysilane (APTES) โดยใช้สารละลาย piranha ซึ่งเตรียมได้จากสารละลายกรดซัลฟิวริกกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($\text{H}_2\text{SO}_4/30\%\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1, \text{v/v}$) ในการทำความสะอาดพื้นผิวเป็นเวลา 15 นาที หลังจากทำความสะอาดพื้นผิว SPR จะถูกนำมาปรับปรุงสภาพพื้นผิวด้วย APTES อีกครั้งก่อนที่จะถูกทดสอบการใช้งานด้วยการตรึง Human Fetuin A (HFA) จากผลการทดลอง พื้นผิวที่ผ่านการทำความสะอาดถูกวิเคราะห์เทียบกับพื้นผิวใหม่โดยวิธี Rutherford back scattering (RBS) พบว่า จำนวนโมเลกุลต่อตารางเซนติเมตรของ APTES มีค่าใกล้เคียงกันมาก และพื้นผิวที่ถูกทำความสะอาดสามารถจะนำมาตรึง HFA ได้มากถึง 30 รอบ

ปี พ.ศ. 2555 (ค.ศ. 2012) Blake N Johnson and Raj Mutharasan (Johnson; & Mutharasan. 2012: 1335-1341) ได้ใช้การทำความสะอาดพื้นผิวแบบ liquid-UVPO ในการชะล้าง SAM Formation ที่ถูกใช้ในการปรับปรุงสภาพพื้นผิวทอง ดังภาพประกอบ 20 (ก) แผ่นทองที่ถูกเคลือบด้วยชั้น SAM ดังสมการที่ 14 จะถูกแช่อยู่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และนำเข้าเครื่องทำความสะอาดพื้นผิวด้วยแสงยูวี แสงยูวีจะทำลายพันธะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กลายเป็นเรดิคัลของไฮดรอกซิล ($\text{OH}^\cdot$) ดังภาพประกอบ 20 (ข) ดังสมการที่ 15 เรดิคัลของไฮดรอกซิลจะเข้า

ทำปฏิกิริยากับพันธะ RS-Au ดังภาพประกอบ 20 (ค) ดังสมการที่ 16 ทำให้ชั้น SAM หลุดออกจากพื้นผิวทอง ดังภาพประกอบ 20 (ง)



ภาพประกอบ 20 กระบวนการทำความสะอาดพื้นผิวโดยวิธี Liquid-UVPO (ก) หมู่ไทออลของ SAM ถูกตรึงบนพื้นผิวทอง (ข) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แตกตัวเป็นเรดิคัลของไฮดรอกซิล 2 อะตอม เมื่อสัมผัสแสงยูวี (ค) ไฮดรอกซิลเรดิคัลทำปฏิกิริยากับไทออล ทำให้ไทออล ถูกออกซิไดซ์เป็นซัลเฟอริกออกไซด์ (ง) พื้นผิวทองเปล้าหลังถูกทำความสะอาด

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ การปรับปรุงสภาพพื้นผิวแผ่น SPR การตรึงแอนติบอดีและตรวจจำแนกหมู่เลือด การทำความสะอาดพื้นผิวด้วยยูวี-โอโซน และการวิเคราะห์พื้นผิวแผ่น SPR ด้วยเทคนิคต่างๆ

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

1. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$) ของบริษัท BIO basic Inc.
2. Absolute ethanol 99.9 % ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ของบริษัท RCL Labscan Limited
3. น้ำปราศจากไอออน (deionized water, maximum resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ที่ 25°C) จากหน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (Central Instrument Facility; CIF)
4. Sulfuric acid (H_2SO_4) ของบริษัท RCL Labscan Limited
5. Hydrogen peroxide (H_2O_2) ของบริษัท RCL Labscan Limited
6. ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas)
7. 11-Mercapto-1-undecanol 97 % (11-MUD; $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{OS}$) ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
8. Sodium hydroxide (NaOH) ของบริษัท Ajax finechem , Australia
9. Diethylene glycol dimethyl ether; ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$)₂O ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
10. Epichlorohydrin 99%; $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$ ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
11. Carboxymethylate Dextran T500; $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ ของบริษัท Pharmacosmos A/S, Denmark
12. Bromoacetic acid; $\text{C}_2\text{H}_3\text{BrO}_2$ ของบริษัท Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
13. N-Hydroxysuccinimide, NHS Research Organics, Ohio, USA

14. N-ethyl-N-(3-diethyl-aminopropyl) carbodiimide, EDC Research Organics, Ohio, USA
15. Ethanolamine pH 5.0 ของบริษัท Research Organics, Ohio, USA
16. Index matching gel, refractive index 1.72 ของบริษัท Cargille Labs, West Chester USA
17. Flow Cell 7 Channel
 - 17.1 Polydimethylsiloxane (PDMS)
 - 17.2 Silicone elastomer curing agent ของบริษัท Dow Coming Corporation, Midland, USA
 - 17.3 Mold For Flow Cell
18. Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4
 - 18.1 Sodium chloride (NaCl)
 - 18.2 Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)
 - 18.3 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
 - 18.4 Potassium chloride (KCl)
19. Sodium acetate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) pH 5.0 ของบริษัท Ajax Finechem, Australia.
20. anti- A และ anti-B จาก สภากาชาดไทย (National Blood Centre Thai Red Cross Society).
21. Blood sample จาก ธนาคารเลือด โรงพยาบาลรามาธิบดี (The blood bank at Ramathibodi Hospital), Thailand.
22. SPR chip ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว (ชั้นทองเคลือบบนกระจก BK7 หนา 50 นาโนเมตร) ของบริษัท Ssens, Netherlands
23. Plasma cleaner PDC-32 G ของบริษัท National direct network Co.,Ltd.
24. Centrifuge TGW 16 ของบริษัท Yingtai Instrument.
25. UVO cleaner ของบริษัท Jelight company Inc., USA.
26. เครื่อง Surface Plasmon Resonance Imaging (iSPR) ผลิตโดย NECTEC ติดตั้ง ณ ศูนย์นาโนเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

27. เครื่อง Spectroscopic Ellipsometry (SE) ของบริษัท J. A. Woollam ติดตั้ง ณ ห้องปฏิบัติการฟิล์มบาง หน่วยงานวิจัยอิเล็กทรอนิกส์ ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์ และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC)

28. กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (Atomic Force Microscopy, AFM) ของบริษัท Nanomizer รุ่น SPA400 SII ประเทศญี่ปุ่น ติดตั้ง ณ ห้องปฏิบัติการ ศูนย์นาโนเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล (Nanotechnology Center, Mahidol University)

สถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

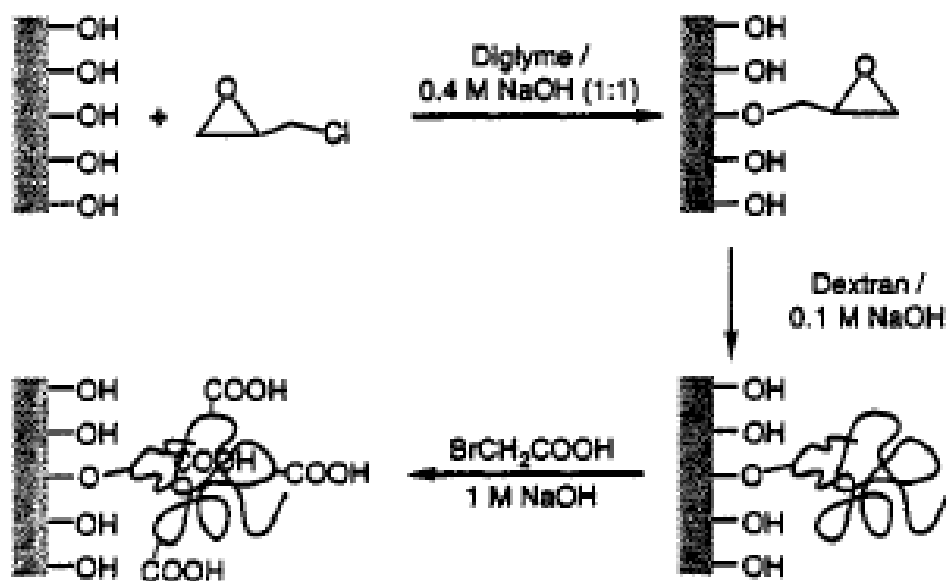
1. ห้อง 1604 ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2. ศูนย์นาโนเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล (Nanotechnology Center, Mahidol University)
3. ห้องปฏิบัติการฟิล์มบาง หน่วยงานวิจัยอิเล็กทรอนิกส์ ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์ และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC)



ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การปรับปรุงพื้นผิวแผ่น SPR ด้วยคาร์บอกซีเมทิลเลท เดกซ์ทราน

การเตรียมพื้นผิวด้วยคาร์บอกซีเมทิลเลท เดกซ์ทราน (Carboxymethylate Dextran, CMD) สามารถเตรียมได้ตามงานก่อนหน้า (Lofas.1995: 829-834) แผ่น SPR จะถูกทำความสะอาดโดยแช่ในสารละลาย piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, 70:30) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน และเอทานอลเพื่อชะล้างสารละลายที่ตกค้างออกจากพื้นผิว เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนให้แห้ง และนำเข้าเครื่องยูวี-โอโซนเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำแผ่น SPR ไปแช่ในสารละลาย 11-MUD ความเข้มข้น 5 mM. (11-MUD 5 mM ละลายในสารละลายเอทานอล : น้ำปราศจากไอออน, 80:20 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เสร็จแล้วล้างด้วยเอทานอลเพื่อชะล้างแอลเคนไทออล (alkanethiol) ที่ไม่จับกับพื้นผิวออกจากแผ่น SPR จากนั้นแผ่น SPR จะประกอบไปด้วยหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล (hydroxyl functional group) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นหมู่ฟังก์ชันอีพอกซี (Epoxy functional group) โดยแช่แผ่น SPR ในสารละลายอีพอกซีคลอไรด์ไฮดริน (สารละลายอีพอกซีไฮดริน 0.6 M: โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 M) บนเครื่องเขย่าสาร (shaker) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เสร็จแล้วแผ่น SPR ถูกชะล้างสารละลายส่วนเกินด้วยเอทานอล และน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำแผ่น SPR ไปแช่ในสารละลายเดกซ์ทราน (เดกซ์ทราน 0.3 g/mL ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M) บนเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 20 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สุดท้ายเดกซ์ทรานบนพื้นผิวจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอกซีเมทิลเลท เดกซ์ทราน โดยแช่แผ่น SPR ในสารละลาย กรดโบโรโมแอซิติก 0.1 M (Bromoacetic acid) กับ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 M บนเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ดังภาพประกอบ 21 แสดงขั้นตอนการปรับปรุงสภาพพื้นผิวด้วย CMD

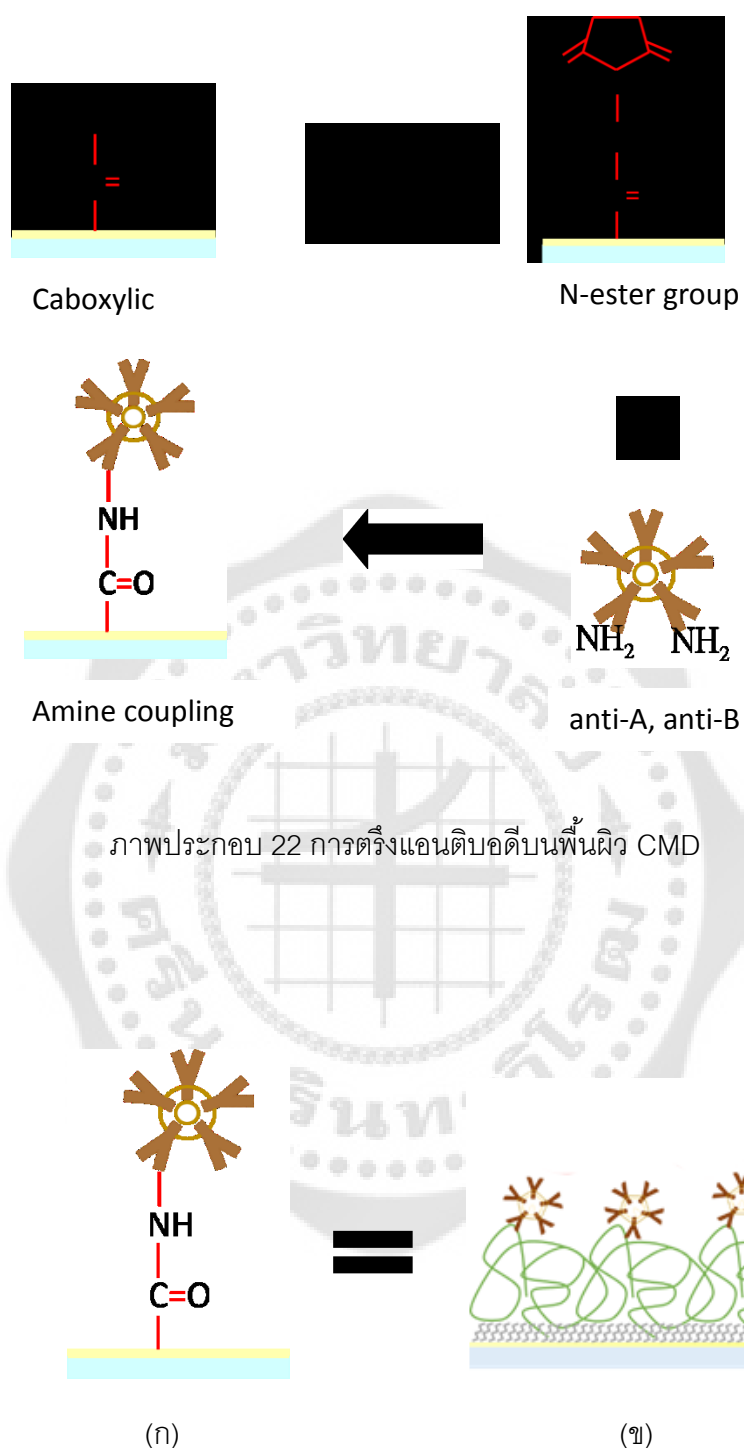


ภาพประกอบ 21 การเตรียมพื้นผิว CMD

ที่มา: Lofas, S. (1995). Dextran modified self-assembled monolayer surface for use in biointeraction analysis with surface Plasmon resonance. Pure & Appl. Chem. 67: p.831

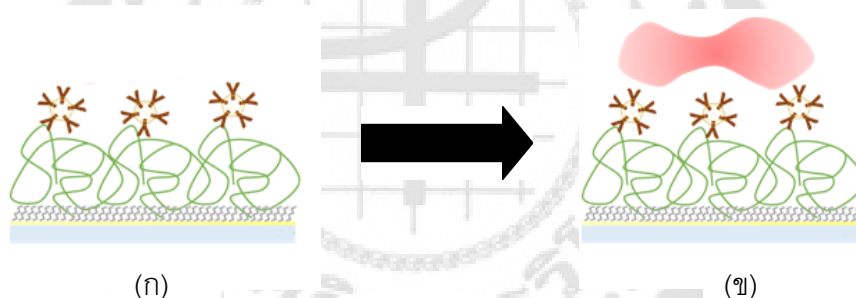
2. การตรึง anti-A และ anti-B และการตรวจจำแนกหมู่เลือด

ก่อนทำการตรึง anti-A และ anti-B พื้นผิวจะถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย EDC 0.4 M / NHS 0.1 M ผ่านพื้นผิวด้วยอัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที เพื่อเร่งปฏิกิริยาในการจับกันระหว่างพื้นผิว CMD กับแอนติบอดี โดยสารละลาย EDC/NHS จะไปเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลิกบนพื้นผิวให้เป็นหมู่เอสเทอร์ ขั้นตอนต่อมาเตรียม anti-A และ anti-B ในสารละลาย sodium acetate pH 5.0 ให้มีความเข้มข้นที่ 5 % (Cid; et al. 2006: 131-136) ในอัตราส่วน 1:20 จะถูกไหลผ่านพื้นผิวด้วยอัตราการไหล 10 ไมโครลิตรต่อนาที แอนติบอดีกับพื้นผิวจะจับกันแบบพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่เอสเทอร์กับหมู่เอมีน บริเวณที่แอนติบอดีไม่จับกับพื้นผิวจะถูกปิดกั้นด้วย Ethanolamine pH 8.5 ด้วยอัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที สุดท้ายแอนติบอดีที่ไม่จับกับพื้นผิวจะถูกชะล้างออกด้วยไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 mM ด้วยอัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที ดังภาพประกอบ 22 แสดงการตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิว CMD



ภาพประกอบ 23 พื้นผิว CMD หลังจากการตรึงแอนติบอดี (ก) พันธะระหว่างแอนติบอดีกับพื้นผิว CMD (Amine-coupling) (ข) Schematic ของแอนติบอดีพื้นผิว CMD

หลังจากตรึง anti-A, anti-B บนพื้นผิวเพื่อเตรียมทดสอบการตรวจจำแนกหมู่เลือด ตัวอย่างเลือดหมู่ เอ บี เอบี และโอ เตรียมได้จากการเจือจางความเข้มข้นด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 ให้มีความเข้มข้นที่ 5% ผ่านบนพื้นผิวด้วยอัตราการไหล 10 ไมโครลิตรต่อนาที ประมาณ 15 นาที โดยตัวอย่างเลือดจะจับกับแอนติบอดีอย่างเฉพาะเจาะจง (Specific binding) เช่น ตัวอย่างเลือด หมู่ เอ จะจับเฉพาะกับ anti-A เมื่อสัญญาณ SPR คงที่ และแอนติเจนกับแอนติบอดีจับกันจนถึงจุดอิ่มตัวแล้ว จะทำการผ่านโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 mM ด้วยอัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที เพื่อชะล้างพันธะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี หลังจากนั้นทำการผ่านตัวอย่างเลือดต่อไปจนครบ ทั้ง 4 ตัวอย่างในลักษณะเดียวกัน โดยเลือดหมู่เอบีจะถูกผ่านเป็นลำดับสุดท้ายและทำการวัดเส้นโค้ง SPR เนื่องจากต้องการความต่างที่เห็นได้ชัดเจนของความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อนต่ำสุด ระหว่างพื้นผิว SPR ใหม่กับพื้นผิวที่ถูกใช้งานแล้ว ภาพประกอบ 24 แสดงการจับกันแบบเฉพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจน (RBCs) กับแอนติบอดี

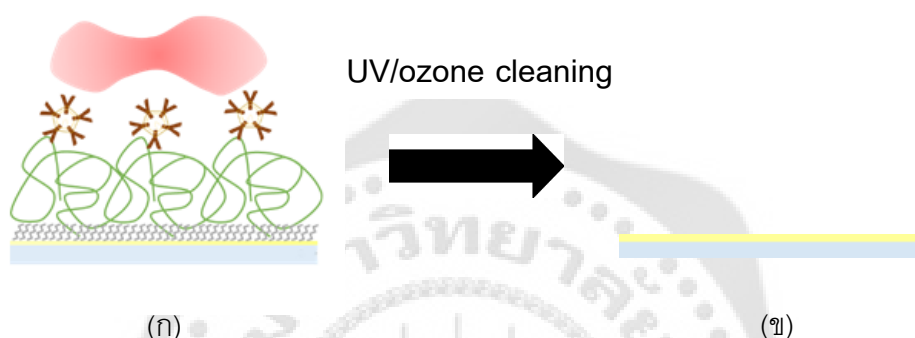


ภาพประกอบ 24 Schematic ของการตรวจวัดจำแนกหมู่เลือด (ก) พื้นผิว CMD หลังจากตรึงด้วยแอนติบอดี (ข) ตัวอย่างเลือด (RBCs) จับกับแอนติบอดี

3. การทำความสะอาดพื้นผิวด้วยยูวี-โอโซน

พื้นผิว SPR ที่ถูกใช้งานแล้ว จะถูกนำไปล้างด้วยเอทานอลและน้ำปราศจากไอออน 4-5 ครั้ง และนำไปแช่ในสารละลาย SDS 10% ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวเพื่อง่ายต่อการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่น SPR เข้าเครื่อง ยูวี-โอโซน โดยใช้เวลานานครั้งละ 10 นาทีและทำการวัดเส้นโค้ง SPR โดยการหยดน้ำปราศจากไอออนขนาดประมาณ 10 ไมโครลิตร บนพื้นผิวแผ่น SPR เมื่อทำการวัดเส้นโค้ง SPR แล้วให้นำแผ่น SPR เข้าเครื่อง

ยูวี-โอโซน อีกครั้ง เป็นเวลา อีก 10 นาที และทำตามขั้นตอนเดิมจนแผ่น SPR ถูกทำความสะอาดเป็นเวลา รวม 50 นาที ภาพประกอบที่ 25 แสดง (ก) สภาพพื้นผิวแผ่น SPR ที่ประกอบด้วยชั้น CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือด ก่อนการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน (ข) สภาพพื้นผิวแผ่น SPR หลังจากทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน ซึ่งชั้น CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือดถูกชะล้างออกจากพื้นผิว

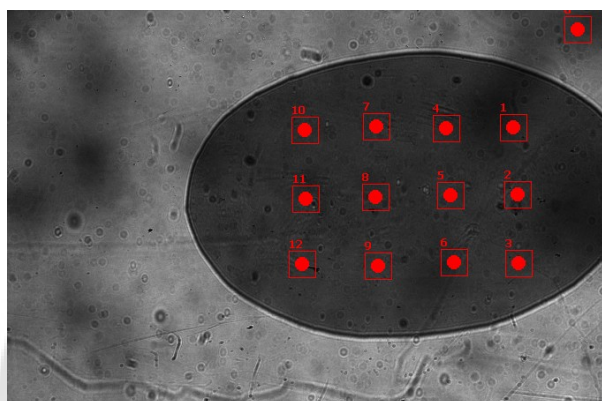


ภาพประกอบ 25 การทำความสะอาดพื้นผิว CMD แอนติบอดีและตัวอย่างเลือดด้วยยูวี-โอโซน
(ก) พื้นผิวแผ่น SPR หลังจากตรวจจำแนกหมู่เลือดซึ่งตัวอย่างเลือดถูกตรึงอยู่บนพื้นผิว (ข) พื้นผิวแผ่น SPR หลังจากทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน ซึ่งพื้นผิว CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือดถูกชะล้างออกจากพื้นผิว

4. การวิเคราะห์ความสะอาดของพื้นผิว

หลังจากแผ่น SPR ถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน นำแผ่น SPR มาวิเคราะห์ความสะอาดด้วยเทคนิคต่างๆ คือ 1. การวัดเส้นโค้ง SPR โดยหยดน้ำปราศจากไอออนขนาดประมาณ 10 ไมโครลิตรบนแผ่น SPR จากนั้นเลือกบริเวณที่ต้องการทำการตรวจวัด (region of interest, ROI) ประมาณ 9-15 ROI ดังภาพประกอบ 26 เลือกตำแหน่งมุมที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหมากที่สุด (ปกติจะอยู่ที่ $30\Delta\%R$) เพื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีหักเหระหว่างแผ่น SPR ใหม่กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด 2. การบันทึกภาพ SPR เพื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มแสงระหว่างแผ่น SPR ใหม่กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด 3. การวัดมุมสัมผัส โดยหยดน้ำปราศจากไอออนขนาดประมาณ 3 ไมโครลิตร บนแผ่น SPR ใหม่และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด ทำการวัดประมาณ 5 หยดของทุกแผ่น เพื่อเปรียบเทียบมุมสัมผัสของหยดน้ำ 4. การวัดสมบัติเชิงแสงด้วยอีลิปโซเมทรี

เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงแอมพลิจูดและเฟสของแสงระหว่างแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด และ 5. การวิเคราะห์พื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม เพื่อเปรียบเทียบสภาพพื้นผิว ระหว่างแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด



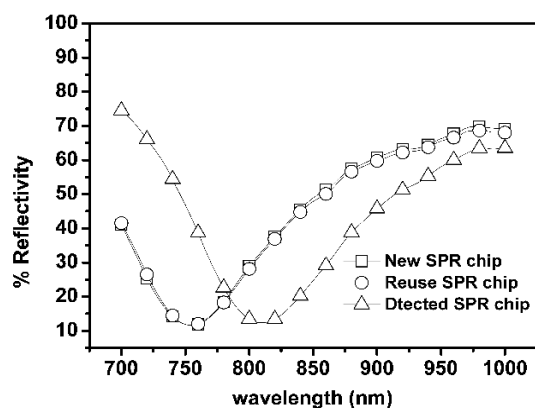
ภาพประกอบ 26 บริเวณที่ต้องการทำการตรวจวัด (ROI) บนพื้นผิวแผ่น SPR

บทที่ 4

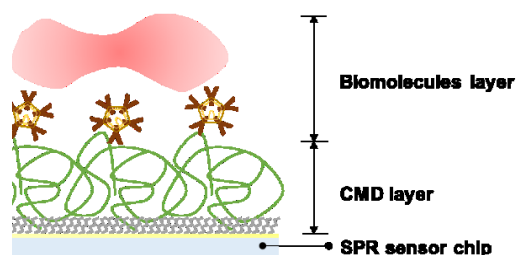
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

การวิเคราะห์พื้นผิวแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดด้วยเทคนิค SPR

แผ่น SPR ที่ใช้งานแล้วจะถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน และนำมาวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวโดยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ การวัดเส้นโค้ง SPR (SPR curve) การบันทึกภาพ SPR (SPR image) การวัดมุมสัมผัส (contact angle measurement) การวัดสมบัติเชิงแสงด้วยอีลิปโซเมทรี (Ellipsometry) และการวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม ภาพประกอบ 27 (ก) แสดงตัวอย่างของลักษณะเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR บนพื้นผิวต่างๆ ได้แก่ แผ่น SPR ใหม่, แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด และแผ่น SPR ที่ใช้งานแล้ว จากผลการทดลองพบว่าเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR ที่ใช้งานแล้วจะเลื่อนไปทางขวา หรือมีความยาวคลื่น SPR (ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อนต่ำสุด) ประมาณ 810 นาโนเมตร เนื่องจากมีชั้นของ CMD แอนติบอดีและตัวอย่างเลือดอยู่บนพื้นผิวแผ่น SPR ดังภาพประกอบ 27 (ข) เมื่อแผ่น SPR ถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน พบว่าเส้นโค้งเลื่อนกลับมาทางซ้ายมือ เนื่องจากชั้น CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือดได้หลุดหรือมีการชะล้างออกจากพื้นผิว เนื่องจากยูวี-โอโซน ประกอบด้วยความยาวคลื่นที่มีพลังงานสูงได้แก่ 184.9 และ 253.7 นาโนเมตร ซึ่งมีพลังงาน 647 กิโลจูลต่อโมล และ 472 กิโลจูลต่อโมล และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากเรดิคัลออกซิเจนกับสารชีวภาพ และชั้น CMD ในกระบวนการเกิดโอโซน ซึ่งสามารถทำลายพันธะของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสารชีวภาพบนแผ่น SPR ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นโค้ง SPR กับแผ่น SPR ใหม่ จะมีลักษณะที่เหมือนกัน และมีค่าความยาวคลื่น SPR ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 750.25 ± 0.5 นาโนเมตร และ 750.75 ± 2.0 นาโนเมตร สำหรับแผ่น SPR ใหม่ และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซนสามารถทำความสะอาดพื้นผิวของแผ่น SPR ที่ใช้งานแล้วได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์พื้นผิวด้วยเทคนิคอื่นๆ เพื่อเป็นการยืนยันว่าพื้นผิวของแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดมีคุณลักษณะที่เหมือนกันกับพื้นผิว ของแผ่น SPR ใหม่



ก



ข

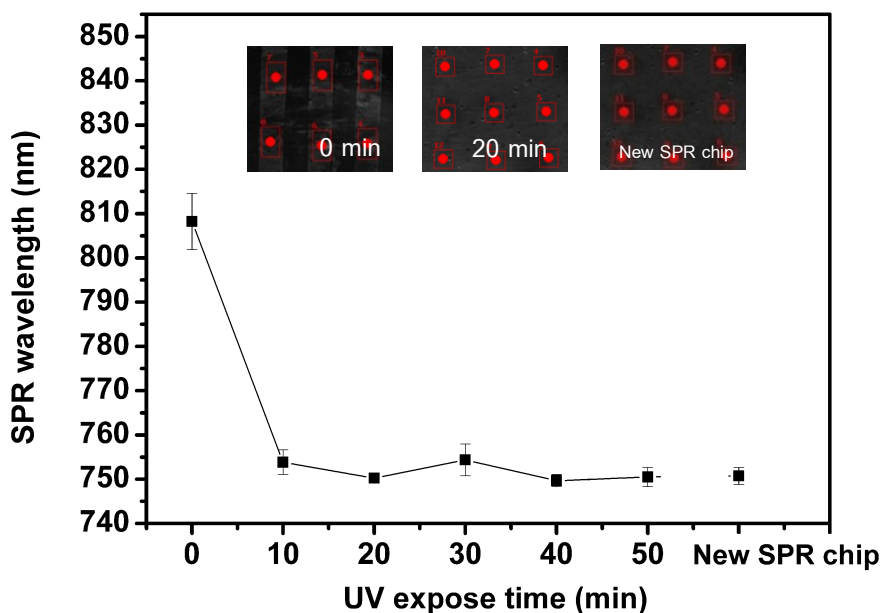
ภาพประกอบ 27 (ก) การเปรียบเทียบลักษณะเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR ใหม่ (กราฟสี่เหลี่ยม) แผ่น SPR ที่ใช้งานแล้ว (กราฟสามเหลี่ยม) และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด (กราฟวงกลม) โดยการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน (ข) ชั้น CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือดบนแผ่น SPR ที่ใช้งานแล้วในการตรวจจำแนกหมู่เลือด

ค่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน

การวิเคราะห์หาค่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน โดยนำแผ่น SPR ที่ใช้งานแล้ว นำไปแช่ในสารละลาย SDS 10% ประมาณ 24 ชั่วโมง เนื่องจากสารละลาย SDS สามารถทำให้โปรตีนบางส่วนหลุดออกจากพื้นผิวได้ (Kratz; et al. 2015: 28-35) ทำให้การทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซนสามารถทำได้ง่ายขึ้น จากนั้นนำแผ่น SPR ทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน นานครั้งละ 10 นาที เป็นเวลารวม 50 นาที ในแต่ละครั้งหลังจากการทำความสะอาดแผ่น SPR จะถูกนำไปล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนและเอทานอล จากนั้นนำไปวัดเส้นโค้ง SPR ภาพประกอบ 28 แสดงความยาวคลื่น SPR (ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อนต่ำสุด) เทียบกับเวลาในการทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน ภาพด้านบนรูปสี่เหลี่ยมแสดง ROI หรือตำแหน่งที่ทำการตรวจวัดเส้นโค้ง SPR จากผลการทดลองพบว่า ค่าความยาวคลื่น SPR จะลดลงเมื่อเวลาที่ใช้ทำความสะอาดนานขึ้นและจะมีค่าคงที่ ตั้งแต่ที่เวลาประมาณ 20 นาที โดยก่อนการทำความสะอาดแผ่น SPR ค่าความยาวคลื่น SPR มีค่าประมาณ 808.25 ± 6.34 นาโนเมตร หลังจากนำแผ่น SPR มาทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซนเป็นเวลา 20 นาที ค่าความยาวคลื่น SPR ลดลงเป็น 750.25 ± 0.46 นาโนเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับความยาวคลื่น SPR ของแผ่น SPR ใหม่ ซึ่งมีค่าเป็น 750.75 ± 1.92 นาโนเมตร พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าชั้น CMD แอนติบอดีและตัวอย่างเลือดบนแผ่น SPR ถูกชะล้างออกจากพื้นผิวทำให้ค่าดัชนีหักเหบนพื้นผิวมีค่าลดลงและมีค่าใกล้เคียงกับ

ค่าดัชนีของแผ่น SPR ใหม่ และหลังจากทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซนต่ออีกเป็นเวลา 30, 40 และ 50 นาที ความยาวคลื่น SPR ยังคงมีค่าใกล้เคียงกับแผ่น SPR ใหม่และไม่เลือนต่ำกว่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อนต่ำสุดของแผ่น SPR ใหม่ แสดงว่าไม่มีการหลุดออกของชั้นทอง

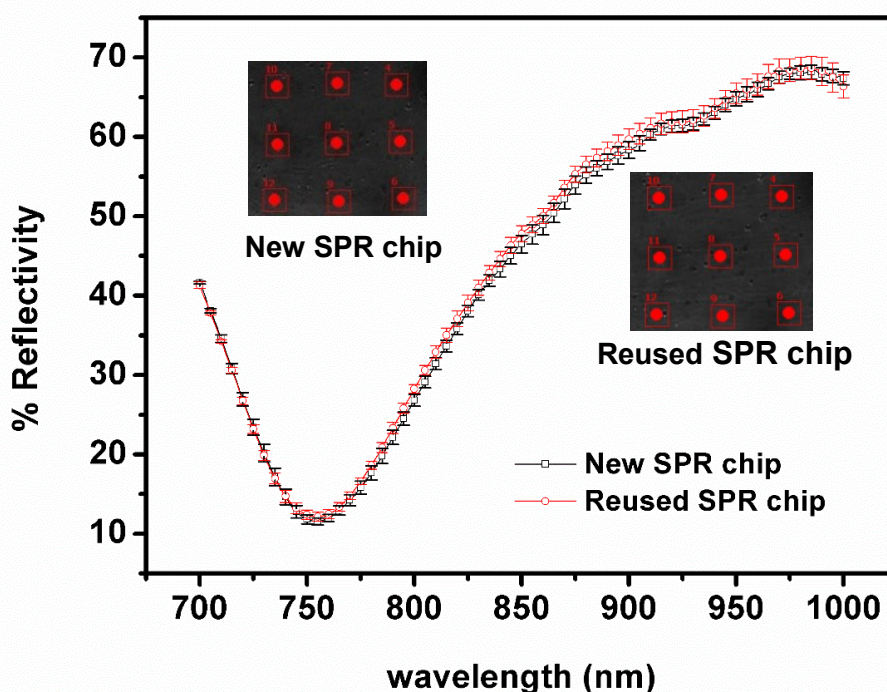
เมื่อทำการบันทึกภาพ SPR พบว่าบนพื้นผิวของแผ่น SPR ที่ใช้งานแล้ว จะสังเกตเห็นแถบของการตรึงแอนติบอดีและตัวอย่างเลือดอย่างชัดเจน แต่หลังจากนำแผ่น SPR ทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน รอยการตรึงแอนติบอดีและเม็ดเลือดแดงบนพื้นผิวได้หายไป ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเส้นโค้ง SPR



ภาพประกอบ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นโค้ง SPR ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าแสงสะท้อนต่ำสุดเทียบกับเวลาในการทำความสะอาดแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน และภาพ SPR ทำการเปรียบเทียบความเข้มของแสงบนพื้นผิวแผ่น SPR ที่ใช้งานแล้ว แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด และแผ่น SPR ใหม่

การวิเคราะห์ลักษณะเส้นโค้ง SPR ระหว่างแผ่น SPR ใหม่กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดด้วยการทดสอบโครโมโกรอฟ-สเมอรฺนอฟ

ภาพประกอบ 29 แสดงการเปรียบเทียบเส้นโค้ง SPR ของแผ่น SPR ใหม่ และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดที่เวลา 20 นาที ด้วยยูวี-ไอโซน และทำการวัดเส้นโค้ง SPR ในแต่ละ ROI เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยและพลอตเป็นเส้นโค้ง SPR พบว่าลักษณะเส้นโค้ง SPR มีลักษณะที่คล้ายกัน และซ้อนทับกันที่ความยาวคลื่น 700-825 นาโนเมตร มีค่าความคลาดเคลื่อนที่มีค่าน้อย เนื่องจากบนพื้นผิวของแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดมีค่าดัชนีหักเหที่สม่ำเสมอ สำหรับที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 825-1000 นาโนเมตร ส่วนของเส้นโค้ง SPR เริ่มไม่ทับกัน และมีค่าความคลาดเคลื่อนที่มากขึ้น เนื่องจากเป็นลักษณะเฉพาะของเทคนิค SPR นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ด้วยความต่างกันของลักษณะเส้นโค้ง SPR ด้วยวิธีทางสถิติ คือ การทดสอบโครโมโกรอฟ-สเมอรฺนอฟ พบว่า กราฟ SPR ของทั้ง 2 แผ่น ไม่มีความต่างกันทางสถิติที่ค่า P มากกว่า 99.9% จึงสรุปได้ว่าลักษณะเส้นโค้งของแผ่น SPR ใหม่กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-ไอโซนไม่มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

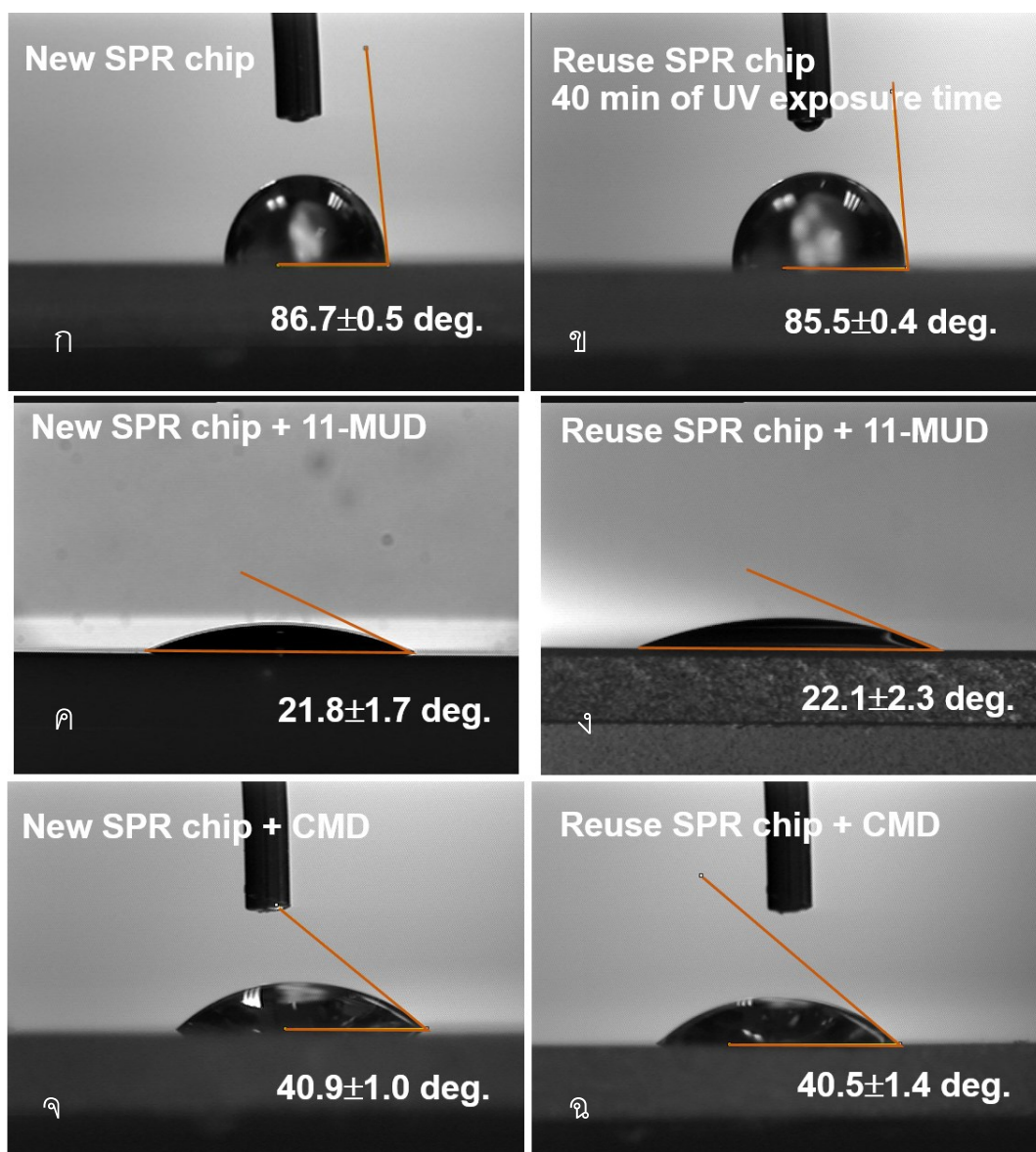


ภาพประกอบ 29 เส้นโค้ง SPR บนพื้นผิวแผ่น SPR ใหม่กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-ไอโซน

การวิเคราะห์พื้นผิวแผ่น SPR ด้วยเทคนิคการวัดมุมสัมผัส (contact angle measurement)

แผ่น SPR จะถูกนำมาวิเคราะห์พื้นผิวโดยเทคนิคการวัดมุมสัมผัส โดยหยดน้ำปราศจากไอออนขนาดประมาณ 3 ไมโครลิตร บนพื้นผิวแผ่น SPR และทำการวัดมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับพื้นผิวแผ่น SPR ภาพประกอบ 30 แสดงขนาดมุมของหยดน้ำปราศจากไอออนบนแผ่น SPR ใหม่ และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด พบว่ามีขนาดของมุมสัมผัสเป็น 86.68 ± 0.5 และ 85.53 ± 0.4 องศา ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน และมีลักษณะเป็นพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) เนื่องจากพื้นผิวทองประกอบด้วยอะตอมของธาตุทอง (Au) เพียงชนิดเดียว พันธะระหว่างอะตอมจึงเป็นพันธะไม่มีขั้ว (Non-polar bonds) เพราะอะตอมทองมีความสามารถในการดึงดูดเวเลนซ์อิเล็กตรอน (Valence Electron) เท่ากัน หรือมีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตี (Electronegativity) เท่ากัน แต่หยดน้ำปราศจากไอออนมีสมบัติความมีขั้ว เนื่องจากอะตอมของไฮโดรเจนและออกซิเจนมีความสามารถดึงดูดอิเล็กตรอนไม่เท่ากัน ดังนั้นโมเลกุลของทองและโมเลกุลของหยดน้ำจึงออกแรงผลักกันทำให้ขนาดมุมสัมผัสมีค่าสูง และในกรณีของแผ่น SPR ที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วย CMD พบว่ามีขนาดของมุมสัมผัสเป็น 40.90 ± 1.0 องศา (แผ่น SPR ใหม่) และ 40.15 ± 1.4 องศา (แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกันกับมุมสัมผัสบนพื้นผิว SAM ซึ่งเป็นลักษณะของพื้นผิวที่มีความชอบน้ำ (Hydrophilic) เนื่องจากพื้นผิว CMD ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก (Carboxylic group) ซึ่งเป็นโมเลกุลมีขั้ว ดังนั้นอันตรกิริยาระหว่างพื้นผิว CMD กับหยดน้ำจึงออกแรงดูดกันทำให้ได้ค่ามุมสัมผัสที่มีค่าน้อย

จากผลการวัดมุมสัมผัสเปรียบเทียบระหว่างแผ่น SPR ใหม่และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด แสดงว่ายูวี-โอโซนสามารถชะล้างชั้น CMD แอนติบอดีและตัวอย่างเลือดออกจากพื้นผิวแผ่น SPR ได้ และสามารถนำมาปรับปรุงพื้นผิวด้วย CMD ได้

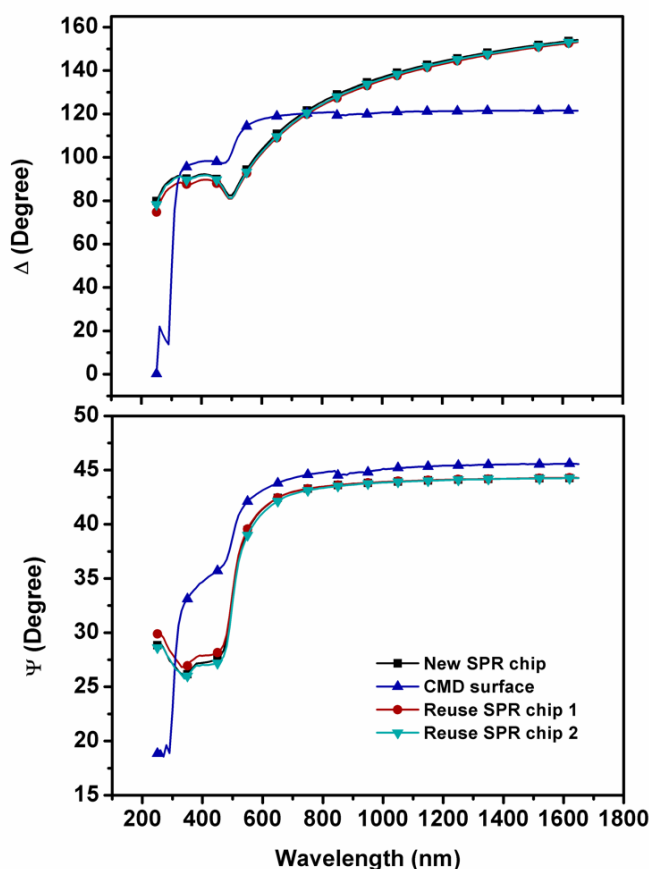


ภาพประกอบ 30 ขนาดมุมสัมผัสของหยดน้ำบนพื้นผิวแผ่น SPR (ก) แผ่น SPR ใหม่ (ข) แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด (ค) แผ่น SPR ใหม่ ที่ถูกปรับปรุงด้วย 11 MUD (ง) แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด ที่ถูกทำความสะอาด ที่ถูกปรับปรุงด้วย 11 MUD (จ) แผ่น SPR ใหม่ ที่ถูกปรับปรุงด้วย CMD และ (ฉ) แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด ที่ถูกปรับปรุงด้วย CMD

การวิเคราะห์พื้นผิวแผ่น SPR ด้วยเทคนิคอีลิปโซเมทรี (Ellipsometry)

หลังจากแผ่น SPR ถูกทำความสะอาด แผ่น SPR จะถูกนำมาวิเคราะห์ความสะอาดของพื้นผิวโดยการวัดสมบัติเชิงแสงด้วยอีลิปโซเมทรี ซึ่งเป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงโพลาไรซ์ของแสงที่สะท้อนออกจากพื้นผิว ผลการวัดจะอยู่ในรูปของอัตราการเปลี่ยนแปลงแอมพลิจูดของแสงสะท้อนในแนวขนานกับระนาบตกกระทบ (r_p) ต่อแอมพลิจูดของแสงในแนวตั้งฉากกับระนาบตกกระทบ (r_s) ถูกเรียกว่าค่าไซน์ (ρ) และการเปลี่ยนแปลงเฟสของแสงตกกระทบกับแสงสะท้อน เรียกว่าเดลต้า (Δ)

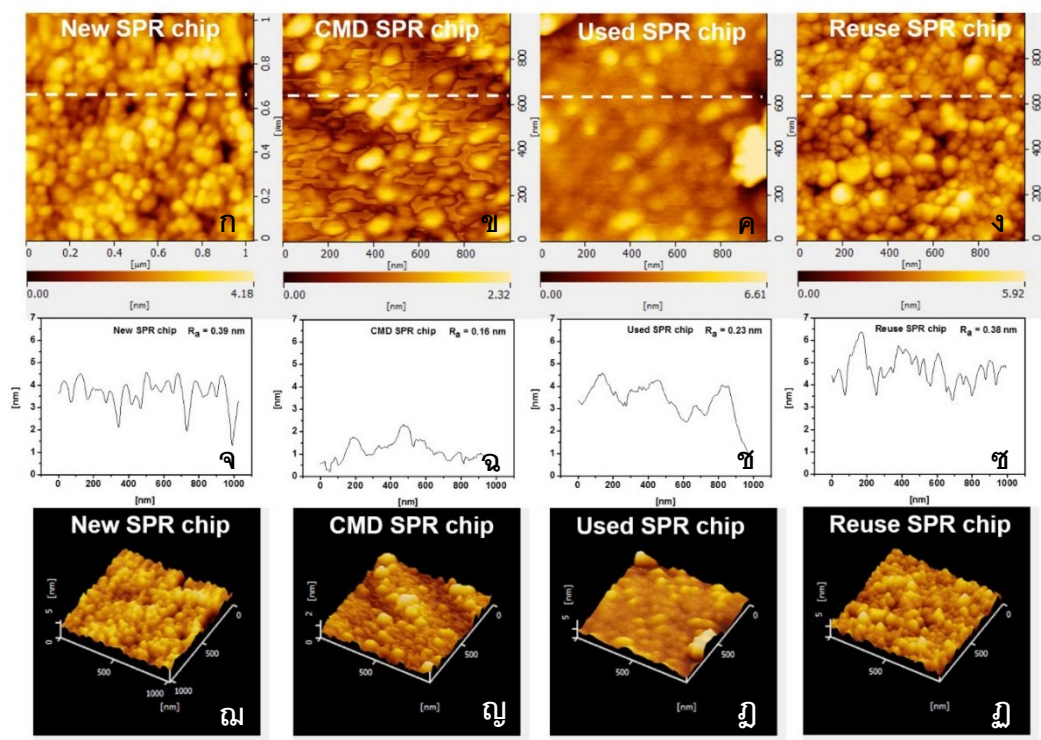
จากภาพประกอบ 31 แสดงกราฟอีลิปโซเมทรีของแผ่น SPR ใหม่ (กราฟรูปสี่เหลี่ยม) และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดทั้ง 2 แผ่น (กราฟรูปวงกลม, กราฟรูปสามเหลี่ยมชี้ลง) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกัน (ทั้งค่าเดลต้าและไซน์) และแตกต่างจากกราฟอีลิปโซเมทรีของแผ่น SPR ที่เคลือบ CMD อย่างชัดเจน (กราฟสามเหลี่ยมชี้ขึ้น)



ภาพประกอบ 31 การวัดสมบัติเชิงแสงด้วยอีลิปโซเมทรี แผ่น SPR ใหม่ (กราฟรูปสี่เหลี่ยม) แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดแผ่นที่ 1 และแผ่นที่ 2 (กราฟรูปวงกลม, กราฟรูปสามเหลี่ยมชี้ลง) และแผ่น SPR ที่ถูกปรับปรุงสภาพพื้นผิว CMD (กราฟรูปสามเหลี่ยมชี้ขึ้น)

การวิเคราะห์พื้นผิวแผ่น SPR ด้วยเครื่องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (AFM)

ภาพประกอบ 32 แสดงภาพ AFM บนพื้นผิวแผ่น SPR ขนาดภาพ $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ โดยแสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาเป็นแบบ 2 มิติ (ก)-(ง) แบบ line profile (จ)-(ซ) และแบบ 3 มิติ (ฅ)-(ฏ) เพื่อทำการเปรียบเทียบกัน ภาพประกอบ 32 (ก) และ (ง) จะเห็นลักษณะ grain ของทอง (Shapter. 2013: 6); (Bonyár. 2016: 2) ได้อย่างชัดเจนบนพื้นผิวแผ่น SPR ใหม่ และบนพื้นผิวแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดตามลำดับซึ่งมีลักษณะคล้ายกัน เช่นเดียวกันกับความหยาบบนพื้นผิว โดย grain size ของทองมีขนาดอยู่ในช่วง 40-70 นาโนเมตรโดยประมาณ และ line profile มีค่าอยู่ที่ 0.39 และ 0.38 นาโนเมตร ในกรณีของพื้นผิวแผ่น SPR ที่ปรับปรุงด้วย CMD จะเห็นได้ว่าไม่ปรากฏลักษณะ grain ของทอง ภาพประกอบ 32 (ข) เนื่องจากพื้นผิวแผ่น SPR ถูกเคลือบด้วยชั้น CMD และมีความหยาบบนพื้นผิวน้อยกว่าพื้นผิวประเภทอื่นๆ เนื่องจากคาร์บอนซีเมทิลเลท เดกซ์ทราน แพร่กระจายไปทั่วพื้นผิว และมีค่า line profile อยู่ที่ 0.16 นาโนเมตร สำหรับแผ่น SPR ที่ถูกใช้งานแล้ว ภาพประกอบ 32 (ค) มีความหยาบน้อยกว่าแผ่น SPR ใหม่ และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด เนื่องจากมีชั้นแอนติบอดีและสารชีวภาพบนพื้นผิว และมีค่า line profile อยู่ที่ 0.23 นาโนเมตร จากผลการวิเคราะห์พื้นผิวด้วยเทคนิค AFM สรุปได้ว่า ชั้นของ CMD แอนติบอดี และสารชีวภาพได้ถูกชะล้างออกจากพื้นผิวแผ่น SPR เนื่องจากลักษณะ grain ของทองบนพื้นผิวแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด แสดงว่าการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน ไม่ได้ทำลายชั้นทองบนแผ่น SPR



ภาพประกอบ 32 ภาพ AFM แบบ 2 มิติ line profile และแบบ 3 มิติบนพื้นผิวแผ่น SPR โดยมีขนาดภาพ $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (ก), (จ) และ (ฉ) แผ่น SPR ใหม่ (ข), (ฉ) และ (ญ) แผ่น SPR ที่ถูกปรับปรุงพื้นผิวด้วย CMD (ค), (ช) และ (ฎ) แผ่น SPR ที่ถูกใช้งานแล้ว (ง), (ซ) และ (ฏ) แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน

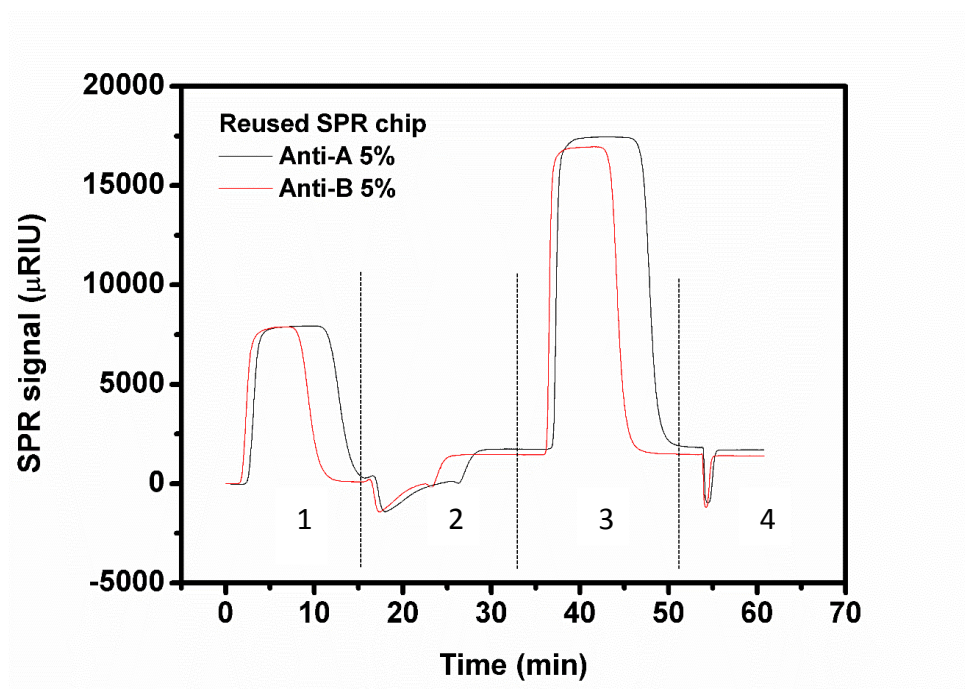
การทดสอบการใช้งานโดยการตรวจจำแนกหมู่เลือด (Blood typing detection)

1. การตรึง anti-A และ anti-B บนพื้นผิว CMD

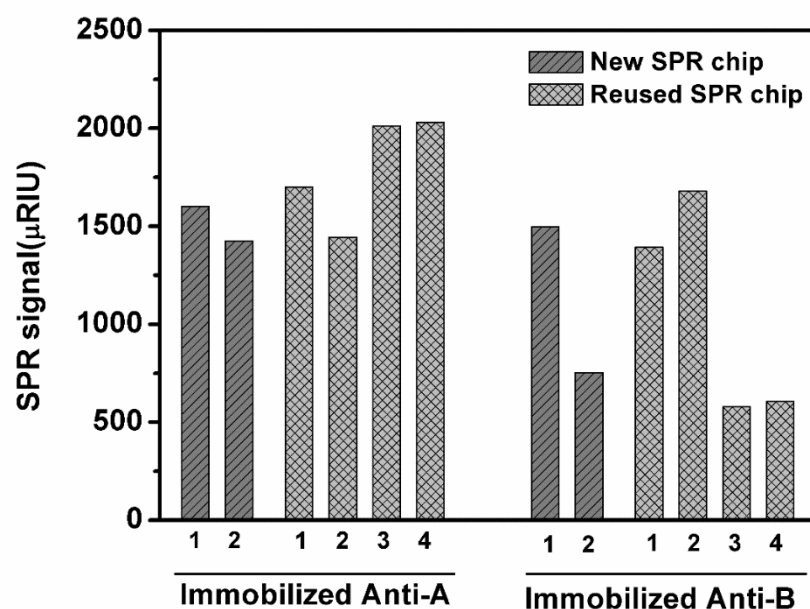
แผ่น SPR ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน จะถูกนำกลับมาเตรียมพื้นผิว CMD และนำไปทดสอบการใช้งานด้วยการตรวจจำแนกหมู่เลือด ภาพประกอบ 33 แสดง Sensogram ของสัญญาณ SPR สำหรับการตรึง anti-A และ anti-B ลงบนพื้นผิว CMD ด้วยวิธีการใช้พันธะโควาเลนต์ โดยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนคือ 1. ขั้นตอนการกระตุ้นพื้นผิว (activation) ขั้นตอนนี้จะทำการผ่านสารละลาย EDC/NHS ไปบนพื้นผิวเซนเซอร์ จะสังเกตได้ว่าสัญญาณ SPR เพิ่มขึ้นในขณะที่สารไหลผ่านพื้นผิว CMD เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงสารละลาย PBS 7.4 เป็น EDC/NHS ทำให้ค่าดัชนีหักเหของสารมีการเปลี่ยนแปลง และสัญญาณ SPR จะลดลงจนกลับมาที่ baseline สารละลาย EDC/NHS จะทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) บนพื้นผิว CMD ให้เป็น

หมู่ N-ester เพื่อสร้างพันธะโควาเลนต์กับแอนติบอดี ขั้นตอนที่ 2. การตรึงแอนติบอดี ขั้นตอนนี้ จะทำการผ่านสาร anti-A และ anti-B บนพื้นผิว ขณะที่สารแอนติบอดีผ่านพื้นผิว สัญญาณ SPR จะลดลงเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสารละลาย และสัญญาณ SPR ค่อยๆ เพิ่มขึ้นเนื่องจาก มีแอนติบอดีไปสร้างพันธะโควาเลนต์กับพื้นผิวทำให้ดัชนีหักเหค่าเพิ่มขึ้น หลังจากสารละลาย เปลี่ยนกลับมาเป็น PBS แล้ว เส้น baseline จะคงที่ ปริมาณของแอนติบอดีที่ตรึงบนพื้นผิววัดได้จาก ความต่างของเส้น baseline หลังและก่อนทำการผ่านสารแอนติบอดี ขั้นตอนที่ 3. การปิดพื้นผิว (Blocking surface) หรือ de-activated ขั้นตอนนี้จะทำการปิดพื้นผิว CMD ที่ถูกกระตุ้น แต่ไม่มีการจับกับแอนติบอดี โดยสารละลาย Ethanolamine เพื่อป้องกันสัญญาณที่เกิดจากการจับกัน แบบไม่เฉพาะเจาะจง (Non-specific binding) ขั้นตอนที่ 4. จะทำการผ่านสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์บนพื้นผิวเซนเซอร์ เพื่อชะล้างแอนติบอดีที่ไม่ได้สร้างพันธะโควาเลนต์ออกจากพื้นผิว

ภาพประกอบ 34 แสดงสัญญาณ SPR จากการตรึง anti-A และ anti-B บนพื้นผิว CMD ของแผ่น SPR ใหม่ และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด พบว่าสัญญาณ SPR จากการตรึง anti-A ของแผ่น SPR ใหม่มีค่าประมาณ 1400-1600 μ RIU และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด มีค่าประมาณ 1400-2000 μ RIU ซึ่งค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันสำหรับสัญญาณ SPR จากการตรึง anti-B ของแผ่น SPR ใหม่ทั้ง 2 แผ่น มีค่าประมาณ 700-1500 μ RIU และแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด ทั้ง 4 แผ่น มีค่าประมาณ 500-1700 μ RIU จากผลการทดลองแสดงว่า แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด ยังสามารถใช้ตรึงแอนติบอดีได้ดี แต่มีความแตกต่างในเรื่องปริมาณในการตรึง โดยเฉพาะ anti-B อาจเนื่องมาจากความต่างของค่า pH ของสารละลายโซเดียมอะซิเตท ที่ใช้ในการลด ความเข้มข้น ของแอนติบอดีที่มีผลต่อประจุบวก เพื่อจับกับพื้นผิว CMD ซึ่งเป็นประจุลบ



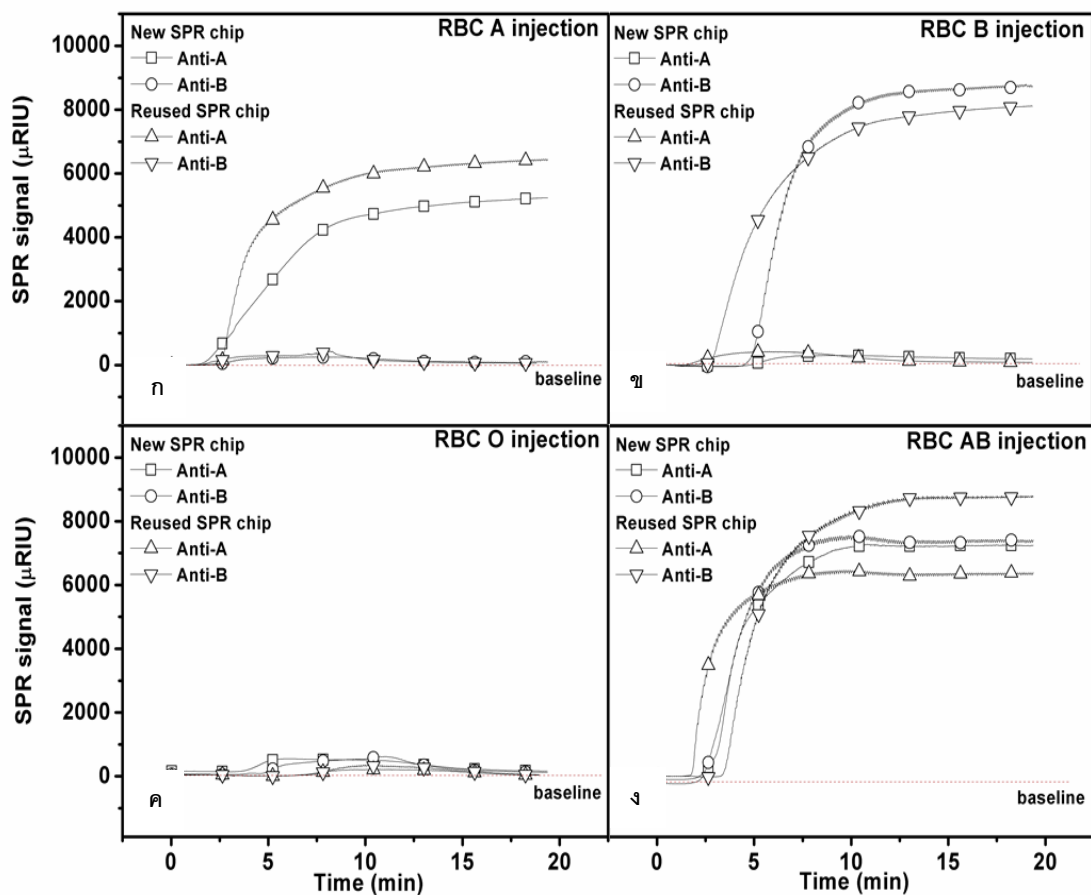
ภาพประกอบ 33 Sensogram SPR ของการตรึง anti-A และ anti-B บนพื้นผิว CMD ของ แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด มีขั้นตอนคือ (1) การกระตุ้นพื้นผิว (2) การตรึงแอนติบอดี (3) การปิดกั้นพื้นผิว และ (4) การชะล้างแอนติบอดีส่วนเกินบนพื้นผิวโดยโซเดียมไฮดรอกไซด์



ภาพประกอบ 34 สัญญาณ SPR จากการตรึง anti-A และ anti-B เปรียบเทียบระหว่าง แผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด

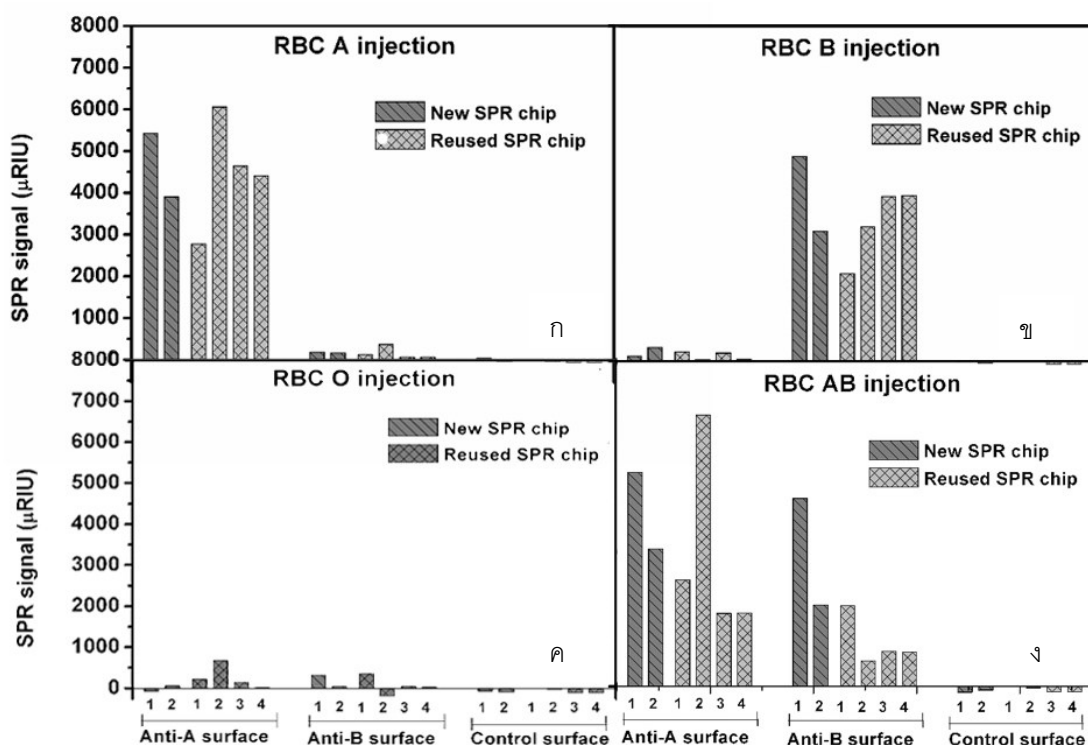
2. การตรวจวัดจำแนกหมู่เลือด (Blood typing Detection)

หลังจากพื้นผิว CMD ถูกตรึงด้วย anti-A และ anti-B ขั้นตอนต่อมาคือ การนำมาใช้ตรวจจำแนกหมู่เลือด เพื่อทดสอบการใช้งานของแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด เปรียบเทียบกับแผ่น SPR ใหม่ ซึ่งเป็นแผ่น SPR แผ่นเดียวกัน ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ ตัวอย่างเลือดหมู่ เอ บี และโอ (A-RBC, B-RBC, AB-RBC และ O-RBC) โดยตัวอย่างเลือดหมู่ เอ จะจับกับ anti-A และไม่จับกับ anti-B, ตัวอย่างเลือดบี จะไม่จับกับ anti-A แต่จับกับ anti-B ตัวอย่างเลือดหมู่ เอบี จะจับกับทั้ง anti-A และ anti-B และตัวอย่างหมู่โอ จะไม่จับกับทั้ง anti-A และ anti-B ภาพประกอบ 35 แสดง Sensogram สัญญาณ SPR โดยจะทำการผ่านสารตัวอย่างเลือดหมู่ต่างๆ บนพื้นผิวแผ่น SPR และทำการวัดสัญญาณ SPR ที่ตำแหน่งเวลาประมาณ 15-20 นาที ภาพประกอบ 35 (ก) เป็นสัญญาณ SPR ที่ได้จากการผ่านตัวอย่างเลือดหมู่ เอ บนพื้นผิวแผ่น SPR พบว่าจะมีสัญญาณ SPR เพิ่มขึ้นเฉพาะ ROI ที่มีการตรึง anti-A ไว้เท่านั้น (อยู่ในช่วงประมาณ 3,000-6,000 μ RIU) และสัญญาณ SPR เนื่องจากการจับกันแบบไม่จำเพาะจากพื้นผิวที่มีการตรึง anti-B และเซนเซอร์ควบคุม (Control sensor) ซึ่งเป็นพื้นผิวแผ่น SPR ที่ไม่มีแอนติบอดีใดๆ อยู่บนพื้นผิว โดยสัญญาณจากการจับกันแบบไม่จำเพาะ และสัญญาณควบคุมมีค่าน้อยมากสำหรับการตรวจวัดหมู่เลือดอื่นๆ คือ ตัวอย่างเลือดหมู่บี หมู่โอ และหมู่ เอบี ให้ผลการทดลองตามที่คาดไว้ จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า แผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดสามารถตรวจจำแนกหมู่เลือดได้ดี



ภาพประกอบ 35 Sensogram SPR จากการตรวจจำแนกหมู่เลือด (RBCs) เปรียบเทียบระหว่างแผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด (ก) ตัวอย่างเลือดหมู่ เอ (ข) ตัวอย่างเลือดหมู่ บี (ค) ตัวอย่างเลือดหมู่ โอ และ (ง) ตัวอย่างเลือดหมู่ เอบี

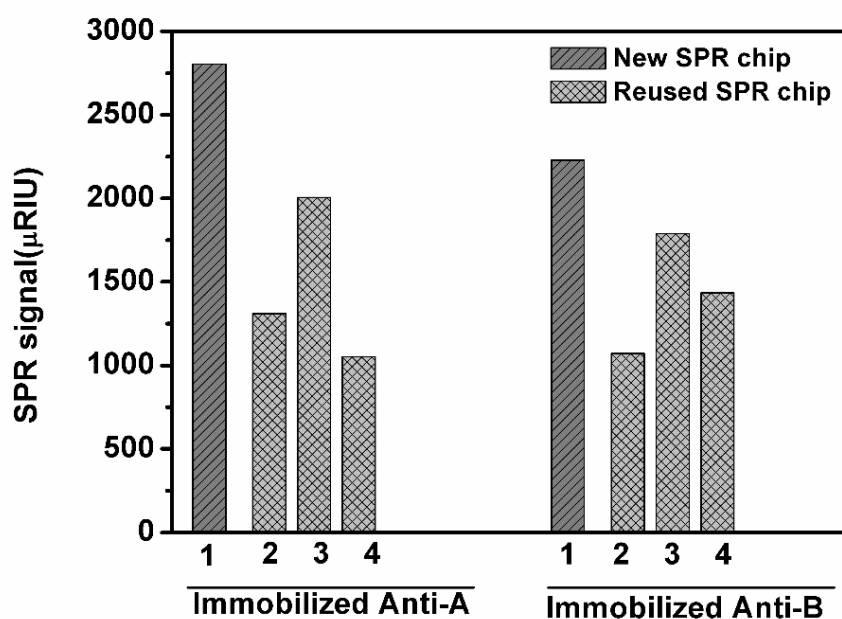
จากภาพประกอบ 36 แสดงสัญญาณ SPR ที่ได้จากการจำแนกหมู่เลือดเปรียบเทียบกันระหว่างแผ่น SPR ใหม่ (จำนวน 2 แผ่น) กับแผ่น SPR ที่นำกลับมาใช้ใหม่ (จำนวน 4 แผ่น) โดยทำการเตรียมพื้นผิว CMD ในรอบเดียวกัน ซึ่งให้ผลการทดลองตามที่คาดไว้ สัญญาณ SPR จะเพิ่มขึ้นเฉพาะที่แอนบอดีจับกับแอนติเจนอย่างเฉพาะเจาะจง แต่สัญญาณ SPR ที่มีความแตกต่างกันอยู่บ้างเนื่องจาก 1. ปริมาณของแอนติบอดีที่ตรึงบนพื้นผิวที่ไม่เท่ากันในทุกแผ่น 2. ความแตกต่างของความหนาแน่นของแอนติเจน เอ หรือ บี บนเยื่อหุ้มของเซลล์เม็ดเลือดแดงในแต่ละตัวอย่าง (Pipatpanukul. 2016: 60-69)



ภาพประกอบ 36 สัญญาณ SPR จากการตรวจจำแนกหมู่เลือดเปรียบเทียบระหว่าง แผ่น SPR ใหม่ กับแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด (ก) ตัวอย่างเลือดหมู่ เอ (ข) ตัวอย่างเลือดหมู่ บี (ค) ตัวอย่างเลือดหมู่ โอ และ (ง) ตัวอย่างเลือดหมู่ เอบี

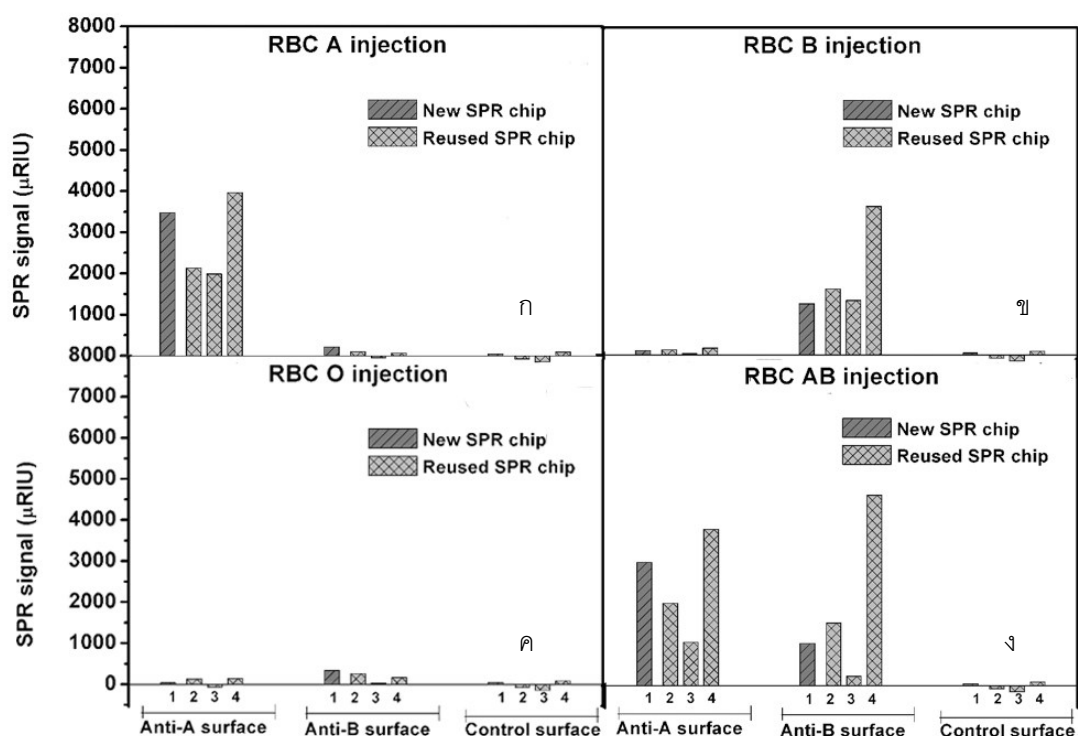
3. การทดสอบจำนวนครั้งการนำกลับมาใช้ใหม่ของแผ่น SPR โดยการตรวจจำแนกหมู่เลือด

ภาพประกอบ 37 แสดงการตรึง anti-A และ anti-B บนแผ่น SPR แผ่นเดียวกัน เพื่อต้องการตรวจสอบจำนวนครั้งในการนำกลับมาใช้ใหม่ จากผลการทดลองพบว่า การใช้ซ้ำตั้งแต่ครั้งที่ 2-4 ยังสามารถตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิว CMD ได้และมี sensogram เป็นลักษณะตามปกติของการตรึงแอนติบอดีด้วยเทคนิค SPR แต่สัญญาณ SPR ที่มีความแตกต่างกันจากการตรวจวัดครั้งแรกอาจเนื่องมาจาก 1. การเตรียมพื้นผิว CMD คนละรอบกัน 2. ความแตกต่างค่า pH ของโซเดียมอะซิเตทที่ใช้ละลายความเข้มข้นของแอนติบอดี หรือ 3. การใช้แอนติบอดีคนละชุดกัน



ภาพประกอบ 37 เปรียบเทียบสัญญาณ SPR จากการตรึง anti-A และ anti-B โดยการใช้แผ่น SPR ซ้ำจำนวน 4 รอบ

ภาพประกอบ 38 (ก)-(ง) แสดงการนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ทั้งหมดจำนวน 3 ครั้ง ในการตรวจจำแนกหมู่เลือด เอ บี เอปี และโอ พบว่า เมื่อทำการตรวจจำแนกตัวอย่างเลือดหมู่ เอ ภาพประกอบ 38 (ก) สัญญาณ SPR มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในช่องที่ตรึงเฉพาะ anti-A และสัญญาณ SPR เพิ่มขึ้นน้อยมากในช่องที่ตรึง anti-B และช่องที่เป็นสัญญาณควบคุม ในการทดลองตรวจจำแนกตัวอย่างเลือดหมู่อื่นๆ คือ ตัวอย่างเลือด บี เอปี และโอ ก็ให้ผลในลักษณะเดียวกัน คือสัญญาณ SPR จะเพิ่มขึ้นในเฉพาะช่องที่มีการจับกันแบบเฉพาะเจาะจง ความต่างของสัญญาณ SPR ที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากสัญญาณรบกวนของระบบ เช่น อุณหภูมิที่มีผลต่อความเข้มของแหล่งกำเนิดแสง ปริมาณของแอนติบอดีที่ถูกตรึงบนพื้นผิว และการเปลี่ยนตัวอย่างเลือดส่งผลทำให้ความเข้มข้นของแอนติเจนบนเม็ดเลือดมีความแตกต่างกัน เนื่องจากระยะเวลาในการทดลองนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ ในแต่ละครั้งมีการเตรียมพื้นผิวเวลายาวนาน ทำให้เม็ดเลือดแดงของตัวอย่างเลือดมีการแตกตัวจึงไม่สามารถใช้ตัวอย่างเลือดเดิมได้ จากการทดลองนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่เพื่อหาจำนวนครั้งสูงสุด พบว่า สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้มากกว่า 3 ครั้งทราบเท่าที่ชั้นผิวทองยังไม่หลุดออกจากแผ่น SPR



ภาพประกอบ 38 สัญญาณ SPR จากการตรวจจำแนกหมู่เลือดเปรียบเทียบระหว่าง การนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ในแต่ละครั้ง (ก) ตัวอย่างเลือดหมู่ เอ (ข) ตัวอย่างเลือดหมู่ บี (ค) ตัวอย่างเลือดหมู่ โอ และ (ง) ตัวอย่างเลือดหมู่ เอบี

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้นำเสนอวิธีทำความสะอาดแผ่น SPR ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารชีวภาพด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนเพื่อนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ โดยใช้วิธีทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ การวิเคราะห์พื้นผิวและการทดสอบนำแผ่น SPR กลับมาใช้ใหม่ด้วยการตรวจวัดจำแนกหมู่เลือด แผ่น SPR ใหม่หลังจากใช้งานแล้วจะถูกทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน ที่เวลารวม 50 นาที หลังจากนั้นแผ่น SPR จะถูกนำมาวิเคราะห์ความสะอาดของพื้นผิวด้วยการวัดเส้นโค้ง SPR การบันทึกภาพ SPR การวัดมุมสัมผัส การวัดสมบัติเชิงแสงด้วยอิลิปโซเมทรี และการวิเคราะห์พื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม ขั้นตอนสุดท้ายแผ่น SPR จะถูกนำมาเตรียมพื้นผิว CMD ใหม่เพื่อทดสอบการใช้งานด้วยการตรวจจำแนกหมู่เลือดอีกครั้งหนึ่ง

จากผลการทดลอง พบว่า วิธีการทำความสะอาดด้วยยูวี-โอโซน สามารถนำมาใช้ในการชะล้างชั้น CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือดออกจากพื้นผิวแผ่น SPR โดยใช้เวลาในการทำความสะอาดประมาณ 50 นาที หรือน้อยกว่า (แบ่งช่วงการทำความสะอาดครั้งละ 10 นาที และทำการล้างสิ่งตกค้างบนพื้นผิวด้วยเอทานอล และน้ำปราศจากไอออน) จากผลการวิเคราะห์พื้นผิวด้วยการวัดเส้นโค้ง SPR การบันทึกภาพ SPR การวัดมุมสัมผัส การวัดสมบัติเชิงแสงด้วยอิลิปโซเมทรี และการวิเคราะห์พื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม พบว่า ชั้น CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือดได้ถูกชะล้างออกจากพื้นผิวแผ่น SPR และลักษณะพื้นผิวแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาดมีลักษณะใกล้เคียงกับแผ่น SPR ใหม่ นอกจากนี้ยังทำการทดสอบการนำกลับมาใช้ใหม่ของแผ่น SPR ที่ถูกทำความสะอาด พบว่า สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ดี เนื่องจากสามารถนำมาตรึงแอนติบอดีและตรวจจำแนกหมู่เลือดได้ถูกต้อง ดังนั้น การทำความสะอาดพื้นผิวแผ่น SPR ด้วยยูวี-โอโซน จึงประสบความสำเร็จในการชะล้างชั้น CMD แอนติบอดี และตัวอย่างเลือดออกจากพื้นผิว เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังสามารถยืดอายุการใช้งานของแผ่น SPR ได้อย่างคุ้มค่าและลดต้นทุนในงานวิจัยได้เป็นอย่างมาก



บรรณานุกรม

- จตุพร วุฒิกนกกาญจน์. (ม.ป.ป.). Polymer Characterization and Analysis: การวิเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Atomic Force Microscopy. หน้า 1-9.
- โรสลีนา ยูโซะ. (2554). การวิเคราะห์ลักษณะฟิล์มบางโดยใช้วิธีการวัดทางแสง. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ฟิสิกส์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- Azzam, E.M.S.; et al. (2009). Fabrication of a surface plasmon resonance biosensor based on gold nanoparticles chemisorbed onto a 1,10-decanedithiol self-assembled monolayer, *Thin Solid Films* 518:387–391.
- Blake, N.J.; Raj, M. (2012). Regeneration of gold surfaces covered by adsorbed thiols and proteins using liquid-phase hydrogen peroxide-mediated UV-photooxidation. *J. Phys. Chem. C*. 117:1335–1341.
- Bolon, D.A.; & Kunz, C.O. (1972). Ultraviolet Depolymerization of Photoresist Polymer of Polymer. *Engin. Sci.* 12:109-111.
- Bonyár, A. (2016). AFM characterization of the shape of surface structures with localization factor. *Micron*. 87: 1-9.
- Campbell, C.T.; & Kim, G. (2007). SPR Microscopy and Its Applications to High-Throughput Analyses of Biomolecule Binding Event and Their Kinetics. *Biomaterials* 28(15): 2380-2392.
- Cid, J.; et al. (2006). Comparison of three microtube column agglutination system for antibody screening. DG Gel, DiaMed-ID and Ortho BioVue. *Transfus.Med.* 16: 131-136
- Hazama, C.; & Hachioji, S. (1987). Ultraviolet-Ozone Surface Treatment. *Threebond Technical News*. 17: 1-10.
- Ho, H.P.; Lam, W.W.; & Wu, S.Y. (2002). Surface Plasmon Resonance Sensor Based on The Measurement of Different Phase. *Review of Scientific Instrument*. 73 (10): 3534-3540.
- Homola, J. (2006). Surface Plasmon Resonance Based Sensor. In: Wolfbeis, O.S., Editors. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. New York. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 184-186.

- Huang, H., & Chen, Y. (2006). Label-Free Reading of Microarray-Based Protein with High Throughput Surface Plasmon Resonance Imaging. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (5): 664-648.
- Kratz, F.; et al. (2015). Cleaning of biomaterial surface: Protein removal by different solvents. *Colloids and surface B: Biointerfaces*. 128: 28-35.
- Kretschmann, E. (1971). Die Bestimmung Optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächen Plasmaschwingungen. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 241: 313-324.
- Li, S.; et al. (2015). Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRi) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs, *Appl. Surf. Sci.* 355:570-576.
- Li, Y.; Liu, X.; & Lin, Z. (2012). Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs. *Food Chem.* 132: 1549-1554.
- Lofas, S. (1995). Dextran modified self-assembled monolayer surface for use in biointeraction analysis with surface Plasmon resonance. *Pure & Appl. Chem.* 67: 829-834.
- Myszka, D.G.; & Rich, R.L. (2000). Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *Pharma. Sci. Technol.* 3:310-317.
- Nakamura, H.; & Karubi, I. (2003). Current Research Activity in Biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 377 (3): 446-468.
- Paddle, B.M. (1996). Biosensor for Chemical and Biological Agent of Defense Interest. *Biosensors and Bioelectronics*. 11 (11): 1079-1113.
- Pipatpanukul, C.; et al (2016). Microfluidic PMMA-based microarray sensor chip with imaging analysis for ABO and RhD blood group typing. *Vox Sang.* 110 (1): 60-69.
- Puttharugsa, C. (2014). Application of Surface Plasmon Resonance Technique in Biosensor. *Srinakharinwirot Science Journal*. (30): 168-186.
- Reddy, P. J.; et al. (2012). Cancer Biomarker Detection by Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Clin. Lab. Med.* 32:47-72.
- Sandeep, K.V. (2012). A method for regenerating gold surface for prolonged reuse of gold coated surface plasmon resonance chip. *Anal. Biochem.* 423:23-25.

- Sara, M.; et al. (2016). Development of a label free SPR sensor for detection of matrixmetalloproteinase-9 by antibody immobilization on carboxymethyldextran chip. *Biosens. Bioelectron.* 81:510-516.
- Scarno, S.; Mascini, M.; Turner, A.P.F.; & Minunni, M. (2010). Surface Plasmon Resonance Imaging for Affinity-Based Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 25 (5): 957-966.
- Shapter, J.G.; Logic, D. (2013). Gold Nanotube Membranes. *ResearchGate*. 1-35.
- Smith, E.A.; & Corn, R.M. (2003). Surface Plasmon Resonance Imaging as a Tool to Monitor Biomolecular Interactions in an Array Based Format. *Applied Spectroscopy* 57(11): 320A-332A.
- Vig, J.R. (1984, October 29). UV/ozone cleaning of surfaces. *J. Vac. Sci. Technol. A*. 3(3): 1027-1034.
- (1992, October). Ultraviolet-Ozone Cleaning of Semiconductor Surfaces. *Research and Development Technical Report*. 1-39.
- Young, T. (1805). Contact Angle and Wetting Properties. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 95: p.65.
- Yuehua Y.; & Randall Lee T. (2013). Contact Angle and Wetting Properties. *Surface Science Techniques*. p.4.



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายนท ศานติคีตา
วันเดือนปีเกิด	23 มิถุนายน 2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ .	บ้านเลขที่ 104 ถนนเกษตรสิน ตำบลลำพญา อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2545	ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น จาก โรงเรียนศรีวิชัยวิทยา
พ.ศ.2545	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนศรีวิชัยวิทยา
พ.ศ.2553	ระดับปริญญาตรี สาขาวิชาฟิสิกส์ จาก มหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ.2559	ระดับปริญญาโท สาขาวิชาฟิสิกส์ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ