

การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงสำหรับตรวจวัดเซลล์บิวตามอล



นายเรวัต รัตนกิจรุ่งเรือง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Optical System Development for Salbutamol Detection



Mr. Rewat Rattanakitrungeung

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงสำหรับตรวจวัดเซลล์เม็ดตามอล

โดย

นายเรวัต รัตนกิจรุ่งเรือง

สาขาวิชา

วิศวกรรมชีวเวช

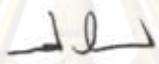
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


รองศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์

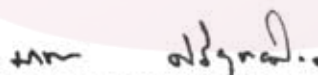
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารบัณฑิต

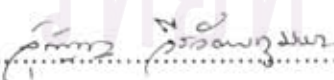

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมลมบูรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วีระวัฒนะกุ่มพะ)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(เภสัชกรหญิง ดร. วลัยลักษณ์ เมธากัทร)

ศูนย์วิทยุโทรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรวัตร์ รัตนกิจรุ่งเรือง : การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงสำหรับตรวจวัดซัลบิวตามอล.
(Optical System Development for Salbutamol Detection) อ. ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม :
รศ.ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์, 52 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงสำหรับตรวจวัดซัลบิวตามอล โดยให้หลักการอิมมูโนแอสเซย์แบบมีการแย่งที่ ระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นประกอบด้วย วงจรไฟเลี้ยง วงจรแหล่งกำเนิดแสง วงจรตรวจวัดแสง วงจรขยายสัญญาณ วงจรควบคุม และ วงจรแสดงผลทางจอภาพ ระบบวัดสามารถใช้ไฟเลี้ยงได้จากสองแหล่งจ่ายคือไฟฟ้า กระแสสลับ 220 โวลท์หรือไฟฟ้ากระแสตรง 5 โวลท์ โดยมีไดโอดเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่น เฉพาะ 450 นาโนเมตรเป็นแหล่งกำเนิดแสง และใช้โฟโตไดโอดที่สามารถวัดได้ในช่วงความ ยาวคลื่น 370-570 นาโนเมตรเป็นตัวตรวจวัดแสง ระบบวัดมีความละเอียดของการวัด สัญญาณ 1024 ระดับ มีการแสดงผลทางจอภาพและส่งสัญญาณออกไปยังคอมพิวเตอร์ ระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นมีขนาด $12 \times 12 \times 5$ เซนติเมตร³ ส่วนของช่องใส่ตัวอย่างมี ขนาด $1.2 \times 1.2 \times 4.5$ เซนติเมตร³ ปริมาตรต่ำสุดที่ใช้ในการวัดได้เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรเมื่อใช้ ติวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในการนำระบบวัดทางแสงไปประยุกต์ใช้ในการวัดซัลบิวตามอลใน บัสสภาวะสุก มีช่วงความเข้มข้นที่สามารถทำการวัดได้ 50 – 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ความเที่ยงและความแม่นยำของระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นในการวัดซัลบิวตามอลมีค่าที่ ยอมรับได้ในค่าของ %RSD และ %Bias ที่ 9% และ +11% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นมีความสามารถในการตรวจวัดซัลบิวตามอลในบัสสภาวะสุก แต่อย่างไรก็ตามควรมีการปรับปรุงเพื่อให้เหมาะสมในการนำไปใช้งานจริง

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช ลายมือชื่อนิสิต เรวัตร์ รัตนกิจรุ่งเรือง

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม มน พึ่งบุญ

##4989162720 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS : OPTICAL SYSTEM / SALBUTAMOL

REWAT RATTANAKITRUNGREUNG : OPTICAL SYSTEM DEVELOPMENT

FOR SALBUTAMOL DETECTION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF

PHENSRI THONGNOPNUA, THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. MANA

SRIYUDTHSAK, 52 pp.

This study was focused on the invention of optical system for salbutamol detection by competitive immunoassay method. Optical system composed of power supply, light source, photo detector, amplifier, controller and display. The system can be operated using AC 220V or DC 5V. Light-emitting diode at wavelength 450 nm was used as a light source and photodiode with wavelength range of 370 – 570 nm was used as a detector having 1024 levels of resolution. The size of optical system was $12 \times 12 \times 5 \text{ cm}^3$ and the sample chamber was $1.2 \times 1.2 \times 4.5 \text{ cm}^3$. Optical system requires at least 0.4 ml of samples contain in 1.5 ml cuvette. The detectable concentration range of salbutamol in swine urine is 50 – 1000 ng/ml. The precision and the accuracy of salbutamol detection by this development optical system were within the acceptable %RSD of 9% and %Bias of +11%, respectively. It is therefore indicated that this optical system is capable for salbutamol screening test in swine urine. However, the modification is still in need for practical used.

Field of Study : Biomedical Engineering.....

Academic Year : 2009.....

Student's Signature Rawat Rattanakitrungrueung

Advisor's Signature Phensri Thongnopnua

Co-Advisor's Signature Mana Sridithsak

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ คณะเภสัชศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำด้านวิชาการและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนการแก้ไขปรับปรุงงานวิจัยฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วีระพัฒนะกุมพะและเภสัชกรหญิง ดร. วลัยลักษณ์ เมธามัทที่กรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำ แก้ไขข้อผิดพลาดเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์และภาควิชาไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์และห้องปฏิบัติการไบโออิเล็กทรอนิกส์ ภาควิชาไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษาและเป็นที่กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบคุณพระคุณบิดา มารดา และน้อง ผู้อยู่เบื้องหลังที่เป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือและเป็นแรงผลักดันจนสำเร็จการศึกษา

ท้ายที่สุดบุคคลที่ข้าพเจ้าไม่ได้กล่าวถึงและได้มีส่วนร่วมในงานวิจัยของข้าพเจ้า ข้าพเจ้าขอขอบคุณบุคคลเหล่านั้นไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 ความรู้พื้นฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ชัลบิวตามอล.....	4
2.2 การวัดสารตกค้างชัลบิวตามอล.....	5
2.3 ระบบวัดทางแสง.....	9
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดสารตกค้างชัลบิวตามอลในปีสสาวะสุกร.....	11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	13
3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	13
3.1.1 สารเคมี.....	13
3.1.2 อุปกรณ์.....	14
3.1.3 เครื่องมือ.....	14
3.1.4 ตัวอย่างปีสสาวะ.....	15

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	15
3.2.1 การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสง.....	16
3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้น.....	25
3.2.3 การนำระบบวัดทางแสงไปใช้ในการวัดซัลฟิวตามอลในปัสสาวะสุกร.....	27
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผล.....	32
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	42
5.1 สรุปผล.....	42
5.2 ปัญหาและข้อเสนอแนะ.....	43
รายการอ้างอิง.....	44
ภาคผนวก.....	49
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	52

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดชัลบิวตามอล.....	12
4.1	คุณสมบัติทั่วไปของระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้น.....	32
4.2	สมการถดถอยเชิงเส้นและค่า R^2	34
4.3	สมการถดถอยเชิงเส้นและค่า R^2	36
4.4	ความเที่ยงและความแม่นยำของการวัดชัลบิวตามอลตัวอย่างในปีสสาระสุกรด้วยระบบวัดทางแสง.....	41

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้าง สูตรโมเลกุล และน้ำหนักโมเลกุลของซิลบิวตามอล.....	4
2.2	ประสิทธิภาพของ TMB ชั้นสเตรตเมื่อเปรียบเทียบกับ ABTS ชั้นสเตรต และ OPD ชั้นสเตรต (ก.) ก่อนหยุดปฏิกิริยา (ข.) หลังหยุดปฏิกิริยา	8
2.3	การเกิดอันตกิริยาของสารเคมีกับการแผ่รังสีของแสง.....	10
2.5	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การทะลุผ่านของแสง	12
3.1	แผนภาพการทำงานของของระบบวัดทางแสง.....	16
3.2	วงจรไฟฟ้าของเครื่องวัดที่ประดิษฐ์ขึ้นประกอบด้วย ก. วงจรแหล่งกำเนิดแสง ข. วงจรตรวจวัดแสง ค. วงจรขยาย ง. วงจรควบคุม และ จ. วงจรแสดงผล ทางจอภาพ.....	17
3.3	วงจรไฟเลี้ยง.....	18
3.4	กราฟความเข้มแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะ 450 นาโนเมตร.....	19
3.5	กราฟความไวที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของตัวตรวจวัดแสง.....	20
3.6	แผนผังการทำงานของระบบวัด.....	23
3.7	ภาพภายนอกของเครื่องวัดทางแสง และแฮมเบอร์สำหรับใส่ตัวอย่าง.....	24
3.8	ภาพวงจรภายในของระบบวัดทางแสง.....	25
3.9	ภาพวงจรวัดและช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง.....	25
3.10	แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด.....	27
4.1	กราฟระหว่างศักย์ไฟฟ้ากับความเข้มชั้นโพแทสเซียมไดโครเมตในช่วง 0.125 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของการวัดด้วยระบบวัดทางแสงเมื่อเปลี่ยนกำลังขยาย (Gain) และเปลี่ยนกระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง (LED current)	34

ภาพที่	หน้า
<p>4.2 กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นโพแทสเซียมไดโครเมต ในช่วงความเข้มข้น 0.063–1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของการวัดด้วยระบบวัดทางแสงเมื่อเปลี่ยนกำลังขยายและเปลี่ยนกระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง เปรียบเทียบกันผลของการวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดส.....</p>	35
<p>4.3 แผนภาพขั้นตอนการแข่งขันของแอนติบอดีในการจับกับซัลบิวตามอลตัวอย่างและซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดส.. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยระบบวัดทางแสงและเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์.....</p>	37
<p>4.4 กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดโครเมต ในช่วงความเข้มข้น 0.063 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของการวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์และการวัดด้วยระบบวัดทางแสงก่อน และหลังการปรับเทียบ.....</p>	38
<p>4.5 ปัสสาวะสุกร ในช่วงความเข้มข้น 8-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของการวัดด้วยระบบวัดทางแสง.....</p>	39
<p>4.6 กราฟระหว่างร้อยละของการจับกับความเข้มข้นซัลบิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะสุกร ในช่วงความเข้มข้น 50-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของการวัดด้วยระบบวัดทางแสง.....</p>	40

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

รายได้หลักของประเทศไทยส่วนหนึ่งมาจากการส่งออกสินค้าทางเกษตรกรรม หนึ่งในสินค้าที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมากคือเนื้อสุกร ปัจจุบันประเทศไทยเลี้ยงสุกรปีละกว่า 9 ล้านตัว [1] มีการส่งออกเนื้อสุกรเป็นอันดับที่ 8 ของโลก [2] เนื่องด้วยเนื้อสุกรที่มีสีแดงไขมันน้อยเป็นที่นิยมรับประทาน จึงทำให้ผู้ประกอบการบางรายนำสารเร่งเนื้อแดงมาผสมลงในอาหารเลี้ยงสุกร สารเร่งเนื้อแดงที่นำมาใช้เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β -agonist) ได้แก่ เคลนบูเทอรอล และซัลบิวตามอล โดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์จับกับตัวรับเบต้าทู (β_2 receptor) บริเวณผิวเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมัน ทำให้มีผลลดการสร้างไขมันและเพิ่มการสลายไขมัน [3,4] เมื่อนำไปผสมในอาหารสำหรับใช้เลี้ยงสุกรจะทำให้สุกรมีเนื้อสีแดงและไขมันน้อย การบริโภคเนื้อสุกรที่มีสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ตกค้างนั้นผลข้างเคียงที่สามารถพบได้บ่อย ได้แก่ อาการปวดศีรษะ กล้ามเนื้อสั่น กล้ามเนื้อเป็นตะคริว กระจก คัดน้ำใส อาเจียน อาการทางระบบประสาทส่วนกลาง และความผิดปกติของระบบหัวใจและหลอดเลือด [4-10] ดังนั้นทางสำนักงานคณะกรรมการอาหาร และยาจึงกำหนดให้เคลนบูเทอรอล และซัลบิวตามอลเป็นสารอันตรายที่ห้ามนำมาใช้ในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคในหลายประเทศ เช่น ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย ฮองกง และสิงคโปร์ เป็นต้น ในประเทศไทยได้มีการออกประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลงวันที่ 3 ธันวาคม 2535 ห้ามมิให้มีการนำเข้าอาหารสัตว์ทุกประเภทที่มีสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์เป็นส่วนผสมและห้ามใช้สารเคมีกลุ่มดังกล่าวทุกชนิดเป็นวัตถุดิบที่เติมในอาหารสัตว์ที่ผลิตเพื่อขาย จากนั้นในปีพ.ศ. 2538 ได้มีการประกาศกระทรวงพาณิชย์ว่าด้วยการนำสินค้าเข้ามาในราชอาณาจักร (ฉบับที่ 107) เพื่อควบคุมและตรวจสอบการนำเข้าสารเคลนบูเทอรอล [11]

แม้ว่าจะมีการออกกฎหมายห้ามนำสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์มาใช้เป็นสารเร่งเนื้อแดงแล้วก็ตาม ก็ยังคงเกิดปัญหาการลักลอบนำมาใช้ในเชิงปศุสัตว์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การส่งออก โดยในปี พ.ศ. 2541 ฮองกงตรวจพบสารซัลบิวตามอลตกค้างในเนื้อสุกรที่ส่งจากประเทศไทย ทำให้มีการประกาศ

ถอนสินค้าออกจากตลาดและกักกันการนำเข้าเนื้อสุกรจากประเทศไทย เพื่อตรวจสอบหาสารตกค้างซัลพิวตามอลก่อนอนุญาตให้นำสินค้าออกจำหน่าย ต่อมาวันที่ 14 มิถุนายน พ.ศ.2542 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ประกาศห้ามใช้สารเคมีกำจัดกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ เป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ในการผลิตอาหารสัตว์ ในปี พ.ศ. 2544 ทางฮ่องกงได้ห้ามนำเข้าเนื้อสุกรแช่แข็งจากประเทศไทยเนื่องจากตรวจพบว่า มีซัลพิวตามอลตกค้าง จึงได้มีประกาศกระทรวงพาณิชย์ลงนามเมื่อวันที่ 29 มีนาคม พ.ศ.2545 และประกาศในพระราชกิจจานุเบกษาในวันที่ 5 เมษายน 2545 เพื่อให้เป็นมาตรการเข้มงวดในการนำเข้าสารซัลพิวตามอล แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังคงพบปัญหาการลักลอบใช้สารซัลพิวตามอลในสุกร ซึ่งยังตรวจพบซัลพิวตามอลตกค้างในสุกรชำแหละ [12 - 15]

การตรวจสอบการมีสารตกค้างซัลพิวตามอลมักดำเนินการเป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกซึ่งเป็นการตรวจคัด (Screening test) มักใช้ชุดตรวจวัดสำเร็จรูปซึ่งเป็นหลักการของเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์ (Immunoassay) และทำการตรวจยืนยัน (Confirmation test) ด้วย Gas-chromatography–Mass spectrometry (GC-MS) [4, 16] ในการตรวจคัดด้วยเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์โดยใช้ชุดตรวจวัดสำเร็จรูปนั้น ชุดตรวจสอบที่ใช้จะต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีค่าใช้จ่ายต่อครั้งของการตรวจค่อนข้างสูง อีกทั้งผลที่ได้จากการตรวจจะเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ หากต้องการข้อมูลเชิงปริมาณจะต้องทำการอ่านผลด้วยเครื่องอ่านซึ่งมีขนาดใหญ่และมีราคาสูง ทำให้การตรวจคัดมีการดำเนินการไม่ครอบคลุม

ระบบวัดทางแสง (Optical system) ด้วยหลักการการดูดกลืนแสง จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการอ่านค่าสารตกค้างซัลพิวตามอลจากการตรวจคัดด้วยหลักการอิมมูโนแอสเซย์ เนื่องจากเป็นการตรวจวัดในเชิงปริมาณ มีประสิทธิภาพในการวัดดี มีขนาดเล็ก และต้นทุนในการผลิตต่ำ [17 - 22] เพื่อนำไปใช้ในการตรวจคัดซัลพิวตามอลตกค้างได้อย่างทั่วถึง โดยเน้นการวัดซัลพิวตามอลในปัสสาวะสุกร ก่อนนำไปชำแหละเพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีสารซัลพิวตามอลตกค้างในตัวสุกรที่จะถูกนำไปบริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงด้วยหลักการการดูดกลืนแสงสำหรับวัดซัลบิวตามอล

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

- 1) ได้ระบบวัดทางแสงสำหรับตรวจวัดซัลบิวตามอล ที่มีขนาดเล็ก ต้นทุนในการผลิตต่ำ มีประสิทธิภาพในการวัดที่ใกล้เคียงกับเครื่องวัดมาตรฐาน
- 2) สามารถนำระบบวัดทางแสง และผลการวิจัยไปพัฒนาวิธีในการวัดสารซัลบิวตามอลในปัสสาวะ รวมทั้งสามารถนำไปพัฒนาวิธีในการวัดสารตกค้างชนิดอื่นได้ต่อไป



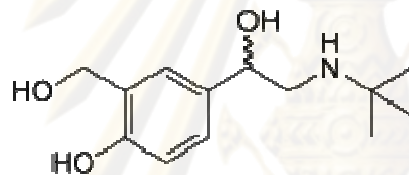
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ความรู้พื้นฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ซัลบิวตามอล

ซัลบิวตามอล (Salbutamol) 2-(hydroxymethyl)-4-[1-hydroxy-2-(tert-butylamino) ethyl] phenol เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ [5] มีชื่อพ้องว่าแอลบิวเทอร์อล (Albuterol) ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกสีขาว ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองซีดใสในสารละลายเมทานอล มีจุดหลอมเหลวที่ 157-158 องศาเซลเซียส โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.1



Formula $C_{13}H_{21}NO_3$
Molecular Weight 239.311

รูปที่ 2.1 โครงสร้าง สูตรโมเลกุล และน้ำหนักโมเลกุลของซัลบิวตามอล [5, 9]

ซัลบิวตามอลมีฤทธิ์ขยายหลอดลม ใช้เป็นยาบรรเทาอาการหลอดลมหดรัดเกร็งเฉียบพลัน (Acute bronchospasm) และโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) โดยการออกฤทธิ์ต่อตัวรับเบต้าทูที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดลม ซัลบิวตามอลมีหลายรูปแบบ เช่น ซัลบิวตามอลในรูปแบบยาพ่นคอ (ขนาดการบริหารยาไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อครั้ง จำนวน 3-4 ครั้งต่อวัน) ซึ่งยาสามารถออกฤทธิ์ได้ภายใน 5-15 นาทีหลังจากการบริหารยา และฤทธิ์คงอยู่นาน 2-5 ชั่วโมง ซัลบิวตามอลในรูปแบบยาเม็ด (ขนาดบริหารยา 32 มิลลิกรัมต่อวัน) โดยยาออกฤทธิ์ได้ภายใน 30 นาทีหลังจากรับประทานยา และฤทธิ์คงอยู่ภายใน 4-6 ชั่วโมง

การกำจัดซัลบิวตามอลออกจากร่างกาย ซัลบิวตามอลจะถูกเมแทบอลิซึมที่ผนังลำไส้เล็กและตับเป็นหลัก ซัลบิวตามอลและเมแทบอลิท์ ถูกขับถ่ายออกทางปัสสาวะและอุจจาระ โดยประมาณ

50-76% ของขนาดยาที่ใช้จะถูกขับออกทางปัสสาวะภายใน 72 ชั่วโมงในรูปของเมแทบอลิท์ และอีกประมาณ 4% จะถูกขับออกทางอุจจาระ

การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าซัลบิวตามอลสามารถผ่านเข้าสิ่งกั้นสมองกับเลือด (Blood-brain barrier) ต่อมไพเนียล (Pineal) และต่อมใต้สมอง นอกจากนี้ยังสามารถส่งผ่านรกของหนูที่ตั้งครรภ์ไปยังตัวอ่อนในครรภ์ได้ [6]

การนำซัลบิวตามอลมาใช้เป็นสารเร่งเนื้อแดงในการเลี้ยงสุกร จะใช้ในขนาดที่สูงกว่าที่ใช้ในการรักษา 5-10 เท่า จึงมีโอกาสของการตกค้างของซัลบิวตามอลในสุกร ขณะเดียวกันสุกรที่ได้รับสารเร่งเนื้อแดงในขนาดสูงนี้ มักมีอาการกระตุก อาจถึงขั้นชัก สำหรับผู้ที่รับประทานเนื้อหรือเครื่องในของสุกรที่มีซัลบิวตามอลตกค้าง จะเกิดอาการคล้ายกับรับประทานซัลบิวตามอลเกินขนาด คือมีอาการเด่นของหัวใจไม่ปกติ ใจสั่น ปวดหัวใจ ความดันโลหิตสูง ไข้ขึ้น หนาวสั่น คลื่นไส้ อาเจียน ม่านตาขยาย เกิดอาการชัก และอาจมีอาการถึงขั้นโคมาได้ [4, 6, 7, 14, 15]

2.2 การวัดสารตกค้างซัลบิวตามอล

การวัดสารตกค้างของซัลบิวตามอลในงานวิจัยนี้ ได้นำแอนติบอดีมาใช้เป็นตัวจับจำเพาะกับซัลบิวตามอล โดยแอนติบอดีเป็นไกลโคโปรตีนที่เกิดจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อใช้ในการจับกับแอนติเจนซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิต แอนติเจนอาจเรียกว่าอิมมูโนเจน (Immunogen) ซึ่งอิมมูโนเจนสามารถเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดี และยังสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นด้วย [23] แอนติเจนมีโครงสร้างจำเพาะที่เรียกว่าอีพิโทป (Epitope) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติบอดีหนึ่ง ๆ ในแอนติเจนหนึ่งตัวอาจมีได้หลายอีพิโทปและอาจทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติบอดีได้หลายชนิด [24]

แอนติบอดีพบมากสุดในซีรัมกลุ่มโปรตีนที่เป็นแกมมาโกลบูลิน (Gamma globulin) เรียกว่าอิมมูโนโกลบูลิน (Immuno globulin, Ig) ซึ่งมีอยู่ 5 ชนิด คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ในแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกัน โดย IgG เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีมากที่สุด ประมาณ 70-75% ของอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด ในการวิเคราะห์ด้วยหลักการอิมมูโนมักใช้ IgG เป็นแอนติบอดีด้วยสาเหตุดังนี้ คือเมื่อเหนี่ยวนำด้วยอิมมูโนเจน IgG เป็นแอนติบอดีที่เกิดขึ้นได้ในปริมาณมาก มีเสถียรภาพดีระหว่างกระบวนการแยกหรือทำให้บริสุทธิ์ สามารถทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อจับคู่กับสารอื่นได้ โดยสูญเสีย

ตำแหน่งการจับเพียงเล็กน้อย [23] แอนติบอดีมีลักษณะคล้ายรูปตัววาย (Y) ส่วนด้านบนทั้งสองข้างของรูปตัววายเรียกว่า Fab (Fragment antigen binding) เป็นส่วนที่ทำหน้าที่จับกับอีพิโทปของแอนติเจน และเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic part) ส่วนฐานเรียกว่า Fc (Fragment crystallizable) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic part) ตรงปลายด้านนี้มีหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group; -COOH) ซึ่งจะถูกใช้ในกระบวนการตรึง (Immobilization) แอนติบอดีลงบนเฟสของแข็ง [20]

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของแอนติเจนกับแอนติบอดี (Antigen-Antibody complex) โดยปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี [24,25,26] ได้แก่

- คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของแอนติเจนและแอนติบอดี มีผลต่อแรงยึดเหนี่ยวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี
- โครงสร้างที่เหมาะสมระหว่างอีพิโทปบนแอนติเจนกับส่วนจับ (Binding site) ของแอนติบอดี จะมีผลต่อความเร็ว และความแรงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี
- อัตราส่วนของแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยอัตราส่วนหรือความเข้มข้นที่ใช้มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา หากมีแอนติเจนมากเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่ดี และหากมีแอนติบอดีมากเกินไปก็ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่ดีเช่นกัน การใช้อัตราส่วนของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม หรืออาจกล่าวได้ว่าแอนติเจนจับกับแอนติบอดีได้หมดพอดีจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุด
- การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความร้อนที่มากเกินไปอาจทำให้โครงสร้างของแอนติเจนเปลี่ยนแปลงไป และอาจเกิดการสลายตัวได้

นอกจากแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติเจนที่เป็นตัวเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันแล้ว ยังสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนอื่นที่ไม่ใช่แอนติเจนที่เหนี่ยวนำให้สร้างแอนติเจนได้อีกด้วย การทำปฏิกิริยานี้เรียกว่าการเกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross reactivity) ซึ่งสามารถเกิดได้เมื่อแอนติเจนอื่นและแอนติเจนที่เหนี่ยวนำมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันมาก [27]

จากการที่แอนติบอดีมีความจำเพาะในการจับกับแอนติเจน ดังนั้นจึงสามารถนำแอนติบอดีมาใช้งานในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ได้ตามอลได้ [20] ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้หลักการของเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์แบบไม่เป็นเนื้อเดียวในการวิเคราะห์เซลล์ตามอลในตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ทางอ้อม (Indirect method) โดยเป็นการวิเคราะห์ที่ตัวติดฉลาก ซึ่งใช้เป็นเครื่องบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาของเซลล์

ตามอลกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซัลบิวตามอล รูปแบบของการวิเคราะห์แบ่งเป็น แบบไม่มีการแย่งที่ (Non-Competitive immunoassay) และแบบมีการแย่งที่ (Competitive immunoassay)

- อิมมูโนแอสเซย์แบบไม่มีการแย่งที่

เป็นการเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ ระหว่างซัลบิวตามอลที่ติดฉลากกับแอนติบอดีที่มากเกินไป ค่าการวิเคราะห์แปรตามปริมาณซัลบิวตามอลที่ติดฉลาก โดยหากมีปริมาณซัลบิวตามอลที่ติดฉลากมาก แอนติบอดีก็จะจับซัลบิวตามอลที่ติดฉลากได้มาก วิธีวิเคราะห์ในลักษณะนี้อาจเรียกรวมการวิเคราะห์ที่รีเอเจนต์มากเกินไป (Excess-reagent assay) หรือการวิเคราะห์ที่วัดอิมมูน (Immunometric assay) ในทางปฏิบัติการทำปฏิกิริยามักมีเฟสของแข็งเพื่อใช้เป็นฐานเกาะของแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยา

- อิมมูโนแอสเซย์แบบมีการแย่งที่

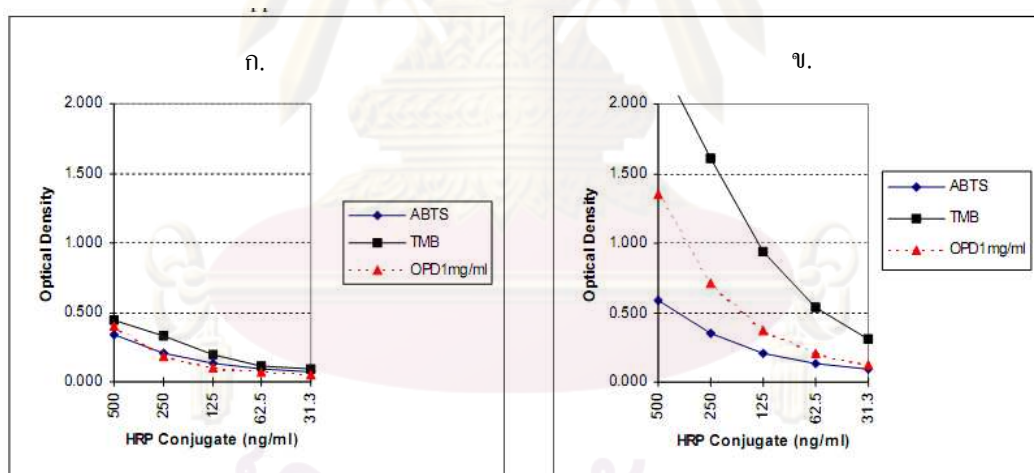
เป็นการวิเคราะห์ที่มีการแย่งกันระหว่างซัลบิวตามอลที่ต้องการวิเคราะห์กับซัลบิวตามอลที่ติดฉลากในการทำปฏิกิริยาจับกับแอนติบอดีในขั้นตอนการวิเคราะห์ ทั้งซัลบิวตามอลที่ติดฉลากและแอนติบอดีถูกกำหนดปริมาณคงที่ไว้ การเปลี่ยนแปลงใดๆที่เกิดขึ้นในผลของการวิเคราะห์เกิดจากผลของปริมาณซัลบิวตามอลในตัวอย่าง โดยถ้าในตัวอย่างมีปริมาณซัลบิวตามอลอยู่น้อย มีผลให้การจับของซัลบิวตามอลที่ติดฉลากกับแอนติบอดีมีมาก หรือหากไม่มีซัลบิวตามอลในตัวอย่างเลย ผลการวิเคราะห์จะเป็นการวิเคราะห์ที่ตัวติดฉลากทั้งหมด นั่นคือ ค่าการวิเคราะห์ตัวติดฉลากแปรผกผันกับปริมาณซัลบิวตามอลในตัวอย่าง วิธีวิเคราะห์ในลักษณะนี้อาจเรียกรวมการวิเคราะห์ที่จำกัดรีเอเจนต์ (Limited reagent assay) โดยรีเอเจนต์ในที่นี้ ได้แก่ ซัลบิวตามอลที่ติดฉลาก และแอนติบอดี

เนื่องจากตัวติดฉลากมีสมบัติในการทำปฏิกิริยาได้เหมือนกัน ไม่ว่าจะเมื่ออยู่ในรูปอิสระหรือเมื่ออยู่ในรูปสารประกอบในการจับกับแอนติบอดี จึงจำเป็นต้องมีการแยกตัวติดฉลากในรูปอิสระออกจากในรูปสารประกอบก่อนทำการวิเคราะห์ตัวติดฉลาก เทคนิคอิมมูโนแอสเซย์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้คือ เทคนิค ELISA[®] (Enzyme linked immunosorbent assay) ซึ่งใช้การติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยเทคนิคนี้ใช้ผิวในหลุมของพอลิสไตรีนพลาสติกใสเป็นเฟสของแข็งในการตรึงแอนติบอดี การทำปฏิกิริยาใด ๆ เป็นการเติมสารละลายลงในหลุม อาศัยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาที่เหมาะสม แล้วเทสารละลายในหลุมทิ้ง และเติมสารละลายลงไปล้างส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาก่อนทำปฏิกิริยาขั้นต่อไป ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการใช้ซับสเตรตเพื่อให้ได้สารมีสี ซึ่งสามารถนำไปอ่าน

ค่าด้วยเครื่องมือเพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป จากหลักการดังกล่าวนี้จึงมีการแบ่งเทคนิค ELISA ตามการติดฉลากของเอนไซม์เป็น 2 รูปแบบ คือ

- Direct ELISA เป็นเทคนิคติดฉลากเอนไซม์ไว้กับสารตัวอย่าง หรือกับแอนติบอดีของสารตัวอย่าง
- Indirect ELISA เป็นเทคนิคติดฉลากเอนไซม์ไว้กับแอนติบอดีตัวที่สอง ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยแอนติบอดีตัวแรก [23]

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) เป็นซับสเตรตเนื่องจากมีประสิทธิภาพหลังการหยุดปฏิกิริยาที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ABTS) และ OPD (o-Phenylenediamine, OPD) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 TMB มีค่าการดูดกลืนแสงก่อนทำการหยุดปฏิกิริยาที่ 620 นาโนเมตร และมีค่าการดูดกลืนแสงหลังหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกที่ 450 นาโนเมตร [28]



รูปที่ 2.2 ประสิทธิภาพของ TMB ซับสเตรตเมื่อเปรียบเทียบกับ ABTS ซับสเตรต และ OPD ซับสเตรต (ก.) ก่อนหยุดปฏิกิริยา (ข.) หลังหยุดปฏิกิริยา [28]

2.3 ระบบวัดทางแสง

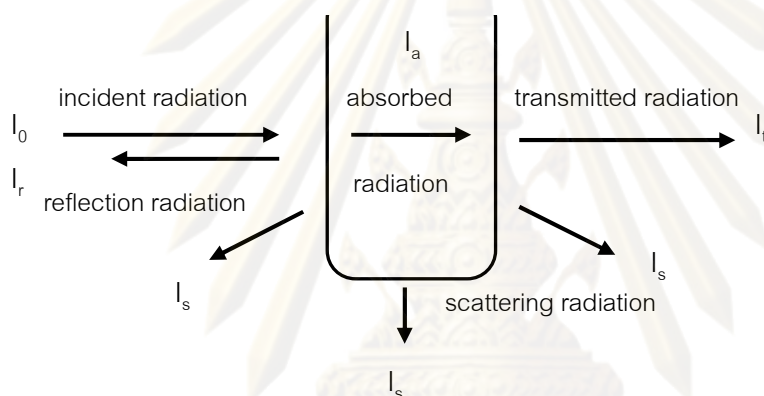
ระบบวัดทางแสงประกอบด้วยส่วนของทรานสดิวเซอร์ (Transducer) และส่วนควบคุม โดยทรานสดิวเซอร์เป็นสิ่งประดิษฐ์จะแปลงปริมาณทางฟิสิกส์ให้เป็นปริมาณทางไฟฟ้า

ในการนำทรานสดิวเซอร์ไปใช้ในการวัด เพื่อที่จะได้ผลการวัดที่ถูกต้องและไม่เกิดอุปสรรคในการวัด ดังนั้นทรานสดิวเซอร์ควรมีคุณสมบัติที่สำคัญ เช่น

- ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) หมายถึง ความสามารถในการเลือกหรือจำเพาะในการวัด เพราะทรานสดิวเซอร์ควรจะต้องตอบสนองกับสิ่งที่เป็นเป้าหมายในการวัดเท่านั้น
- ความไวในการวัด (Sensitivity) หมายถึง ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งที่เป็นเป้าหมายในการวัด ซึ่งหากทรานสดิวเซอร์มีความไวในการวัดสูงก็จะทำให้มีความละเอียดในการวัดที่ดีตามมาด้วย
- ช่วงของการวัด (Range) ทรานสดิวเซอร์ควรมีช่วงของการวัดที่กว้างในช่วงปริมาณที่เราสนใจ โดยทั่วไปพิสัยของการวัดยิ่งกว้างก็จะทำให้สามารถใช้งานได้กว้างขวาง ในบางกรณีจะใช้คำว่า ช่วงที่สามารถวัดได้ (Dynamic range) กล่าวคือ ในทรานสดิวเซอร์บางชนิดจะมีช่วงของการวัดที่กว้างมากตั้งแต่ปริมาณต่ำๆ ถึงสูงมากๆ โดยทั่วไปความไวในการวัดนั้นจะดีเฉพาะปริมาณบริเวณกลางๆ และความไวจะต่ำลงที่ปริมาณต่ำและสูงมากๆ ในกรณีเช่นนี้จะใช้คำว่า พิสัยเชิงจลน์แสดงในช่วงเฉพาะปริมาณบริเวณกลางๆ เท่านั้น
- ความเที่ยง (Precision) หรือความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) หมายถึง เมื่อปริมาณของเป้าหมายไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทรานสดิวเซอร์ควรมีความสามารถในการวัดโดยที่ให้ค่าเดิมและไม่มีการกระจายของข้อมูลมาก
- ความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึง ทรานสดิวเซอร์ควรจะให้ผลการวัดที่ตรงกับค่าจริงของสิ่งที่ทำการวัด ความแม่นยำเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้อง [20]

ทรานสดิวเซอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นทรานสดิวเซอร์สำหรับวัดแสงโดยใช้หลักการทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) เพื่อใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาชีวเคมีระหว่างสารชีวภาพกับซัลโฟบิวตามอล ให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสีของซับสเตรตจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA®

การวัดโดยใช้หลักการทางสเปกโทรสโกปีจะทำการวัดการดูดกลืนแสงที่เกิดจากสีของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ หลักการของการวัด กล่าวคือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่คงที่และต่อเนื่อง (Incident radiation, I_0) จะส่องผ่านหลอดหรือคิวเวต ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงที่ขึ้นกับความเข้มข้นของตัวอย่าง (Absorbed radiation, I_a) แสงที่ไม่ถูกดูดกลืนจะทะลุผ่านออกมา (Transmitted radiation, I_t) นอกจากนี้แสงบางส่วนเกิดการสะท้อน (Reflection radiation, I_r) และบางส่วนเกิดการกระเจิง (Scattering radiation, I_s) [29] ดังแสดงในรูปที่ 2.3 แต่แสงจากการสะท้อนและการกระเจิงโดยทั่วไปมีค่าน้อยมาก จึงสามารถละเลยได้ ดังนั้นความเข้มแสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะเท่ากับความเข้มแสงที่ถูกดูดกลืนและความเข้มแสงที่ทะลุผ่าน



รูปที่ 2.3 การเกิดอันตกิริยาของสารเคมีกับการแผ่รังสีของแสง [29]

จากกฎของ Lambert-Beer การดูดกลืนแสง (Absorbance, A) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (Concentration, C) ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่าง (Length, l) และสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (Absorbivity, ϵ) ดังสมการที่ 2.1 การวัดการดูดกลืนแสงนั้นในบางกรณีก็สามารถที่จะทำการวัดการทะลุผ่านของแสง (Transmission, T) แทน เนื่องจากการดูดกลืนแสงและการทะลุผ่านของแสงในสารตัวอย่างจะแปรผกผันกัน โดยในทางปฏิบัติการดูดกลืนแสงหาได้จากอัตราส่วนระหว่างความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงกับความเข้มแสงที่ทะลุผ่าน โดยในที่นี้ความเข้มแสงที่ทะลุผ่านจะเท่ากับความเข้มแสงที่วัดได้ขณะที่มีเซลล์ตามอลในสารละลายตัวอย่าง (I_{solution}) และความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงจะเท่ากับความเข้มแสงที่วัดขณะที่มีตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (I_{solvent}) ดังแสดงในสมการที่ 2.2

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad (2.1)$$

$$\log \frac{A}{c} = -\log \frac{A}{c} = -\log \frac{A}{c} = -\log \frac{A}{c} = -\log T \quad (2.2)$$

การวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยหลักการทางสเปกโทรสโกปี ในกรณีที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เพียงสารเดียว อาจใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างมีการดูดกลืนแสงมากที่สุด เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (Blank) นำค่าที่วัดได้มาสร้างเส้นกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย เลือกพิสัยที่มีคุณสมบัติเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน จากนั้นเมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ก็จะสามารถหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน [20, 29, 30, 31]

ระบบวัดทางแสงมีข้อดีคือ สามารถตัดสัญญาณรบกวนทางไฟฟ้า เช่น สัญญาณรบกวนที่ความถี่ 50 เฮิร์ตซ์ของไฟฟ้ากระแสสลับ 220 โวลต์ได้ เนื่องจากไม่ได้วัดสัญญาณไฟฟ้าโดยตรง ง่ายต่อการเข้าใจและจัดการ มีความแม่นยำและความไวในการวัดสูง เครื่องมือที่ผลิตได้มีขนาดเล็กกะทัดรัด สะดวก และมีราคาไม่สูง [18, 20]

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดสารตกค้างซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร

สมบุญ และคณะ ได้ทำการตรวจสอบการใช้สารเร่งเนื้อแดงชนิดซัลบิวตามอลในสุกรโดยตรวจจากปัสสาวะ ของซากสุกรเพศผู้จำนวน 100 ตัว ที่โรงฆ่าและชำแหละสุกรมาตรฐานแห่งหนึ่ง โดยทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณซัลบิวตามอลในปัสสาวะด้วยเครื่องเอชพีแอลซี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) และฟลูออเรสเซนซ์ ดีเทคเตอร์ ในการตรวจปัสสาวะสุกร 100 ตัวอย่าง ตรวจพบสารตกค้างซัลบิวตามอลในทุกตัวอย่าง โดยพบปริมาณเฉลี่ย 19.65 ± 14.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [27]

บุญเชิด อาจองค์ และคณะ ได้ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะสุกรจากฟาร์มและโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดพะเยา เพื่อตรวจหาสารเร่งเนื้อแดงกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์จำนวน 4,292 ตัวอย่างด้วยวิธีอีไลซ่า พบว่ามีตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกจำนวน 92 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นผลบวกของการตรวจปัสสาวะ

สุกรจากฟาร์มเลี้ยงสุกรจำนวน 27 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 902 ตัวอย่าง และผลบวกของการตรวจ
ปัสสาวะสุกรจากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 65 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 3,390 ตัวอย่าง [32]

Weiyu Wang และคณะ ทำการตรวจวัดสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสตีในปัสสาวะสุกรโดยใช้วิธี
Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection (CE-ED) พบว่าสามารถนำมาใช้ในการ
การตรวจวัดซัลพิวตามอลในปัสสาวะสุกรได้ในช่วงความเข้มข้น 0.20 – 100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
และมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [33]

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดซัลพิวตามอลแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดซัลพิวตามอล

ชื่อผู้วิจัย	ปี	เทคนิค	ตัวอย่าง	ช่วงที่สามารถวัดได้
สมบุญ และคณะ [27]	2539	HPLC ¹	Swine urine	50 -1000 ng/ml
บุญเชิด และคณะ [32]	2548	ELISA	Swine urine	Positive 92 sample
Wang et al. [33]	2010	CE-ED ²	Swine urine	0.20 – 100.00 µg/ml
Johansson et al. [4]	2004	SPR ³ , IIF ⁴	Bovine urine	0.2 – 5.0 ng/ml
Traynor et al. [3]	2003	SPR	Liver matrix	0.5 – 10.0 ng/g
Lei et al. [34]	2008	ELISA	Swine serum	0.05 – 1.00 ng/ml
Phensri et al. [35]	2008	ELISA	Swine urine Liver	0 – 700 ng/ml 0 – 15 ng/g

¹. High performance liquid chromatography, HPLC

². Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection, CE-ED

³. Surface Plasmon resonance, SPR

⁴. Integrated immunofiltration, IIF

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

ซัลบิวตามอล ซัลเฟต (Salbutamol SO₄, ความบริสุทธิ์ 99.75%, Merck, Germany)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride, NaCl, Merck, Germany)

โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate, Na₂CO₃, Merck, Germany)

โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium Bicarbonate, NaHCO₃, Merck, Germany)

โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium monohydrogen phosphate, Na₂HPO₄•12H₂O, May and Baker Ltd., Dagenham England.)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, NaOH, Merck, Germany)

โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride, KCL, Merck, Germany)

โพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium dichromate, K₂Cr₂O₇, Merck, Germany)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนอโรฟอสเฟต (Potassium dihydrogenphosphate, KH₂PO₄, MERCK, Germany)

โมโนโซเดียมฟอสเฟต (Monosodium phosphate, NaH₂PO₄•12H₂O, Merck, Germany)

โมโนโซเดียมฟอสเฟต (Monosodium phosphate, NaH₂PO₄•2H₂O, Merck, Germany)

หางนม (Skim milk, Difco™, USA)

OPD ซับสเตอร์ (o-Phenylenediamine, OPD, Sigma Aldrich, USA)

TMB ซับสเตอร์ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB, Sigma Aldrich, USA)

กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H₂SO₄, ความบริสุทธิ์ 95 %, Merck, Germany)

กรดซิตริก (Citric acid, C₆H₈O₇•H₂O, ความบริสุทธิ์ 99.8%, Farmitalia Carlo erba, Germany)

ซัลบิวตามอลแอนติบอดี (รศ.ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ และคณะ, คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ)

ซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดส (Salbutamol-Succinate

Conjugate Enzyme Horseradish Peroxidase, รศ.ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ และคณะ,

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ)

ทวิน 20 (Tween 20, Merck, Germany)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2 , Merck, Germany)

3.1.2 อุปกรณ์

โวลเตจเรกูเลเตอร์ (7805, STMicroelectronics, Switzerland)

ไดโอดเปล่งแสง (L450, Marubeni, Japan)

ไฟโตไดโอด (EPD-470-5, Epigap, Germany)

ออปแอมป์ (AD623, Analog Device, USA)

วงจรรควบคุมขนาดเล็ก (PIC18F4550, Microchip, USA)

ถาดหลุม (Micro plate, NUNC, Denmark)

คิวเวตขนาด 4.5 มิลลิลิตร และเซมิ-ไมโครคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Cuvette 4.5 ml and

Semi-micro cuvette 1.5 ml; BrandTech Scientific, USA and VWR, USA)

แผ่นเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (0.45 μ m Membrane filters)

3.1.3 เครื่องมือ

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer; UV-3101PC, Shimada, Japan)

เครื่องอ่านถาดหลุม (Micro plate Reader; Versa max, Molecular Device, USA)

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator; Memment, Germany)

เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge; EBA 12, Hettich, Germany)

เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer; Vortex-2 Genie, Scientific industries, USA)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter; 744, Metrohm, Switzerland)

ปิเปตและปิเปตแบบหลายช่อง (Auto pipette and Multi-channel pipette; Socorex, Switzerland)

3.1.4 ตัวอย่างปัสสาวะ

ปัสสาวะสุกร (ปลอดจากสารซัลบิวตามอล, คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงด้วยหลักการการดูดกลืนแสง แบ่ง 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสง

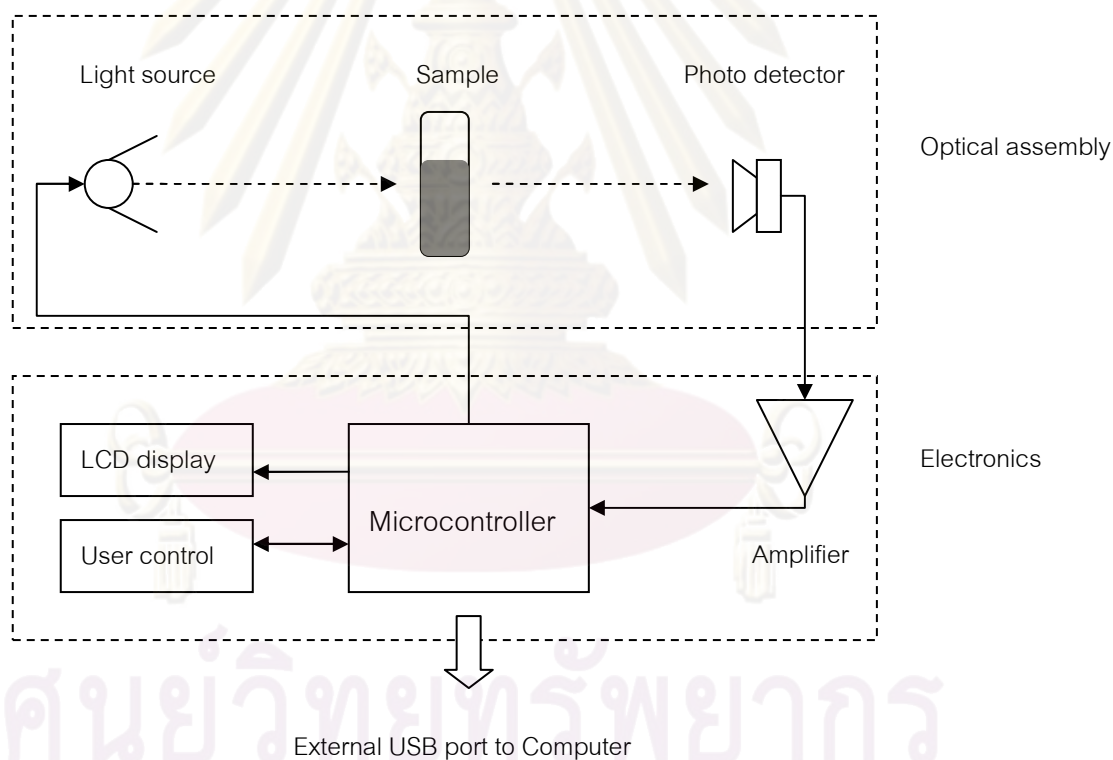
ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพและการปรับเทียบระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้น

ขั้นตอนที่ 3 การนำระบบวัดทางแสงไปใช้ตรวจวัดซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.1 การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสง

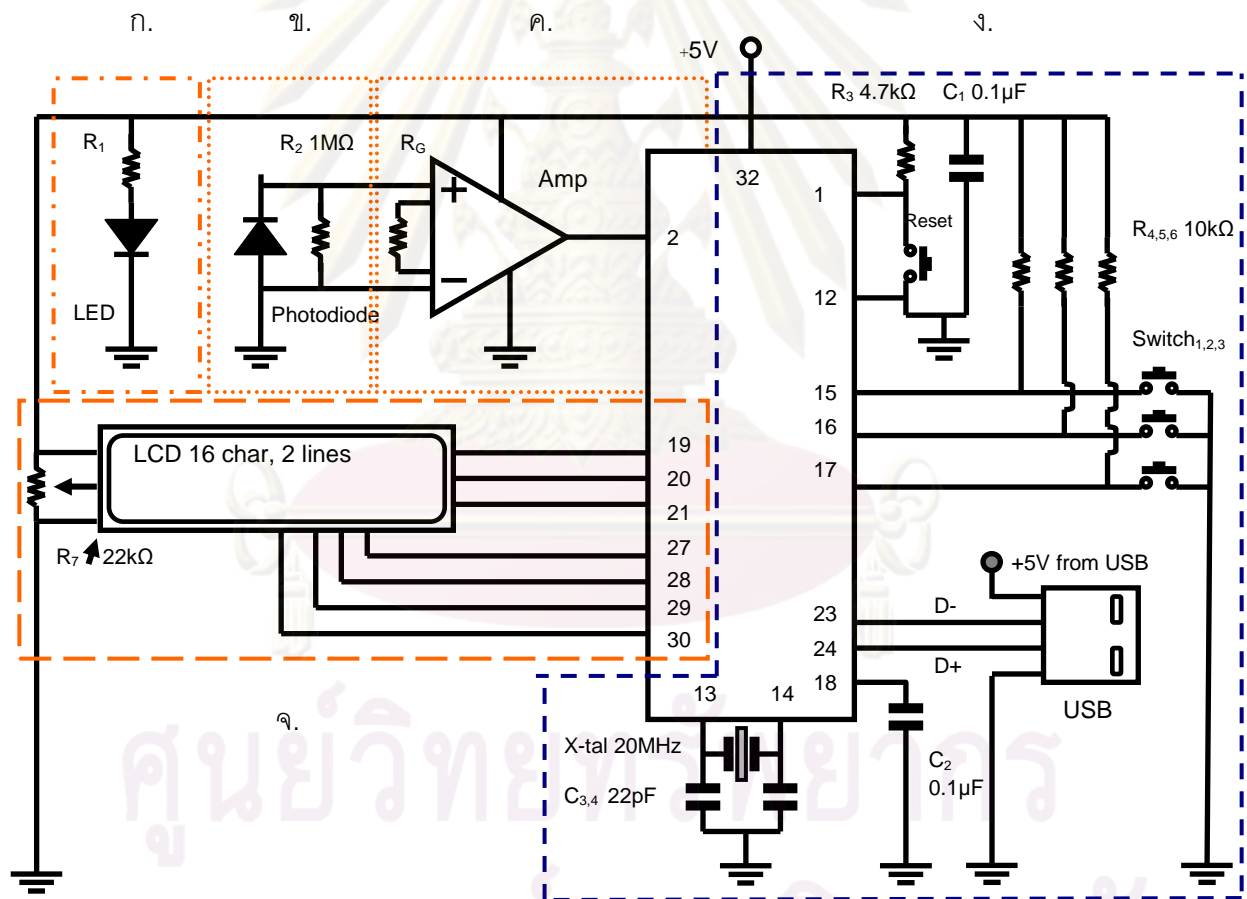
ขั้นตอนการทำงานของระบบวัดทางแสง เริ่มจากการให้แสงที่มีความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากแหล่งกำเนิดแสง เมื่อแสงผ่านควิเวตที่บรรจุตัวอย่างจะถูกดูดกลืนด้วยสีที่เกิดขึ้นจาก TMB ซับสเตรตของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA จากนั้นแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างจะถูกแปลงเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าด้วยตัวตรวจจับวัดแสง ทำการขยายสัญญาณที่วัดได้ด้วยวงจรขยายสัญญาณ แปลงสัญญาณไฟฟ้าซึ่งเป็นสัญญาณแอนะล็อกให้เป็นสัญญาณดิจิทัลด้วยวงจรควบคุม แสดงค่าที่วัดได้ทางจอภาพ และส่งข้อมูลไปยังคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ตยูเอสบี (Universal Serial Bus, USB) แผนภาพการทำงานของระบบวัดทางแสงแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนภาพการทำงานของระบบวัดทางแสง

ระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นประกอบด้วยส่วนของวงจรไฟฟ้า และส่วนของตัวเครื่อง ส่วนของวงจรไฟฟ้าประกอบด้วย 6 ส่วนคือ วงจรไฟเลี้ยง (Power supply) วงจรแหล่งกำเนิดแสง (Light

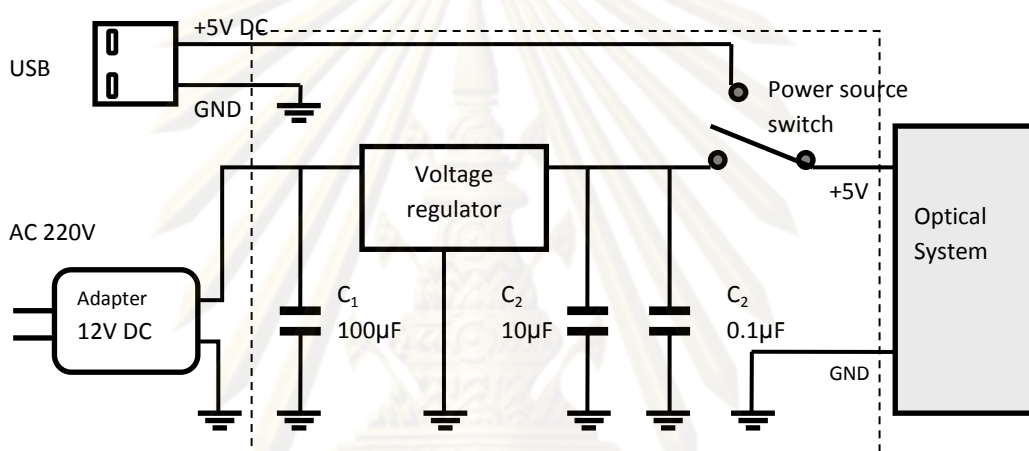
source circuit) วงจรตรวจวัดแสง (Photo Detector circuit) วงจรขยายสัญญาณ (Amplifier circuit) วงจรควบคุม (Control circuit) และวงจรแสดงผลทางจอภาพ (Display circuit) แผนภาพวงจรไฟฟ้าของระบบวัดทางแสงแสดงในรูปที่ 3.2 ในส่วนของวงจรแหล่งกำเนิดแสง ค่าความต้านทาน R1 ที่ใช้จะเป็นตัวกำหนดความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งความเข้มแสงจะแปรตามกระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสงและแปรผกผันกับความต้านทานที่ต่ออนุกรมอยู่ แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะตกกระทบลงบนตัวตรวจวัดแสง จากนั้นจะถูกแปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้าซึ่งแปรตามปริมาณแสงที่ตกกระทบ สัญญาณไฟฟ้าจะถูกขยายด้วยวงจขยายสัญญาณที่สามารถปรับอัตราขยายผ่านตัวต้านทาน RG ส่วนของวงจรควบคุมจะแปลงสัญญาณไฟฟ้าให้เป็นสัญญาณดิจิทัล จากนั้นแสดงค่าที่วัดได้ออกทางจอภาพ และส่งข้อมูลที่วัดได้ไปยังคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ตยูเอสบี (Universal Serial Bus, USB)



รูปที่ 3.2 วงจรไฟฟ้าของเครื่องวัดที่ประดิษฐ์ขึ้นประกอบด้วย ก.วงจรแหล่งกำเนิดแสง ข.วงจรตรวจวัดแสง ค. วงจรขยาย ง. วงจรควบคุม และ จ. วงจรแสดงผลทางจอภาพ

3.2.1.1 วงจรไฟเลี้ยง

วงจรมายในระบบวัดทางแสงใช้ไฟเลี้ยง 5 โวลต์ เพื่อความสะดวกในการใช้งาน ระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นสามารถเลือกแหล่งจ่ายไฟได้ 2 แหล่ง คือ ไฟเลี้ยง 5 โวลต์จากเครื่องคอมพิวเตอร์หรือคอมพิวเตอร์พกพาผ่านการเชื่อมต่อจากพอร์ตยูเอสบี หรือไฟเลี้ยงจากภายนอกโดยใช้หม้อแปลงในการปรับค่าศักย์ไฟฟ้า 220 โวลต์เป็น 12 โวลต์ จากนั้นใช้ไอซีโวลเตจเรกูเลเตอร์ (Voltage regulator) แปลงเป็นไฟเลี้ยง 5 โวลต์ วงจรไฟเลี้ยงแสดงดังรูปที่ 3.3

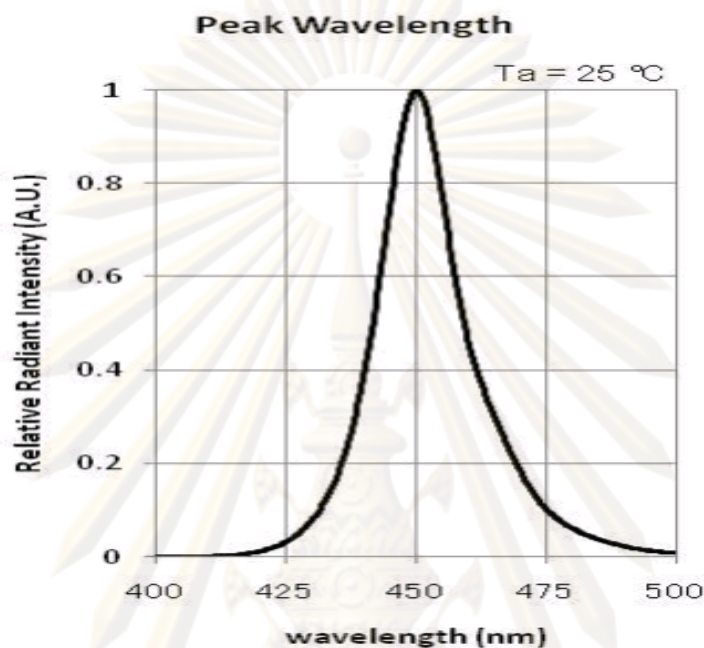


รูปที่ 3.3 วงจรไฟเลี้ยง

3.2.1.2 วงจรแหล่งกำเนิดแสง

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้แหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสง (Light-Emitting Diode, LED) ที่สามารถให้แสงในช่วงความยาวคลื่นเฉพาะ แหล่งกำเนิดแสงชนิดนี้ให้แสงสีน้ำเงินในช่วงความยาวคลื่น 440 – 460 นาโนเมตร โดยให้ความเข้มแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ความเข้มแสงจะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อความยาวคลื่นเปลี่ยนไป 12.5 นาโนเมตร ความเข้มแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 3.4 [36] การเลือกใช้แหล่งกำเนิดแสงชนิดนี้มีข้อดีคือ มีขนาดเล็ก มีความไว้วางใจสูง ใช้งานได้นาน ใช้แรงดันไฟฟ้าที่ต่ำ [37] น้ำหนักเบา ราคาไม่แพง เกิดความร้อนระหว่างการใช้งานน้อยมาก ไม่ต้องใช้เกรตติง (Grating) หรือฟิลเตอร์ (Filter) สำหรับเลือกความยาวคลื่นซึ่งทำให้ทางเดินแสงสั้นและสามารถประดิษฐ์เป็นเครื่องวัดที่มีขนาดเล็กได้ วงจรแหล่งกำเนิดแสงทำโดยต่อตัวต้านทาน

R_{LED} อนุกรมเข้ากับแหล่งกำเนิดแสง เพื่อควบคุมไม่ให้แหล่งกำเนิดแสงได้รับกระแสมากเกินไป การเลือกใช้ตัวต้านทานที่มีค่าต่าง ๆ จะมีผลต่อความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสง แผนผังวงจรแหล่งกำเนิดแสงแสดงดังรูปที่ 3.2 ก.

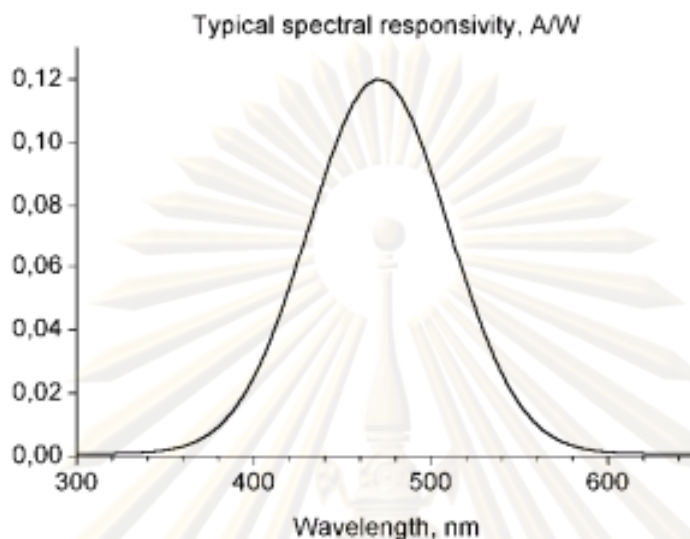


รูปที่ 3.4 กราฟความเข้มแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะ 450 นาโนเมตร [36]

3.2.1.3 วงจรตรวจวัดแสง

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ตัวตรวจวัดแสงแบบโฟโตไดโอดที่สามารถตรวจวัดแสงในช่วงความยาวคลื่นเฉพาะ โดยมีความไวในการวัดสูงสุดที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และความไวในการวัดจะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อความยาวคลื่นเปลี่ยนไป (Spectral bandwidth at 50%) 50 นาโนเมตร รูปที่ 3.5 แสดงกราฟความไวในการวัดที่ความยาวคลื่นต่างๆ การวัดค่ากระแสไฟฟ้าจากโฟโตไดโอดในที่มีด (Dark current) ได้ค่ากระแสไฟฟ้า 20-50 พิกโคแอมแปร์ [38] ตัวตรวจวัดแสงชนิดนี้มีข้อดีคือ มีการเปลี่ยนแปลงความต้านทานที่ไวต่อแสง สัญญาณเอาต์พุตเปลี่ยนแปลงตามความเข้มแสงอินพุตแบบเชิงเส้นได้ดี มีสัญญาณรบกวนต่ำ มีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา มีความคงทนและอายุการใช้งานยาวนาน

[37] วงจรตรวจวัดแสงจะใช้ตัวต้านทานขนาด 1 เมกะโอห์มต่อขนานกับโฟโตไดโอด เพื่อทำการวัดศักย์ไฟฟ้าที่ตกคร่อมบนตัวต้านทาน วงจรตรวจวัดแสงแสดงดังรูปที่ 3.2 ข.



รูปที่ 3.5 กราฟความไวที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของตัวตรวจวัดแสง [38]

3.2.1.4 วงจรขยายสัญญาณ

วงจขยายสัญญาณที่ใช้ในการประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงนี้ได้เลือกใช้ออป-แอมป์ (Operational amplifier, Op-Amp) ชนิดอินสตรูเมนต์เช่น แอมพลิฟาย (Instrumentation amplifier) ซึ่งมีความต้านทานภายใน 10^9 โอห์ม สามารถใช้กำลังขยายได้ตั้งแต่ 1 – 1000 เท่า โดยสามารถปรับกำลังขยายได้จากการปรับค่าตัวต้านทานของกำลังขยาย (R_G) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงกำลังขยาย (Gain) ของวงจรสามารถคำนวณได้ดังสมการ 3.1 ออปแอมป์ชนิดนี้มีข้อดีคือ มีอิมพีแดนซ์ขาเข้าสูง สามารถใช้ไฟเลี้ยงกระแสตรงได้ สามารถขยายสัญญาณได้ถึงระดับไฟเลี้ยงที่ใช้ (Rail-to-Rail output swing) มีความแม่นยำสูง และมีสัญญาณรบกวนที่ต่ำ [39]

$$G = 1 + \left(\frac{100}{R_G} \right) \quad (3.1)$$

วงจรรขยายสัญญาณนั้นนอกจากนำมาใช้เพื่อขยายสัญญาณที่วัดได้จากวงจรถรวจวัดแสงแล้วยังถูกใช้เป็นวงจรมัฟเฟอ (Buffer circuit) เพื่อเชื่อมวงจรถรวจวัดแสงที่เป็นผู้ให้สัญญาณและวงจรรควบคุมที่เป็นผู้รับสัญญาณเข้าด้วยกัน เนื่องจากความต้านทานภายในขาออกจากวงจรถรวจวัดแสงมีค่าสูงทำให้วงจรรควบคุมไม่สามารถวัดสัญญาณได้ ดังนั้นออปแอมป์ซึ่งมีคุณสมบัติความต้านทานภายในขาเข้าสูงและความต้านทานภายในขาออกต่ำจึงถูกนำมาใช้เป็นวงจรมัฟเฟอ วงจรรขยายสัญญาณแสดงในรูปที่ 3.2 ค.

3.2.1.5 วงจรรควบคุม

การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงนี้ได้ใช้วงจรรควบคุมขนาดเล็ก (Microcontroller) ตระกูล PIC (Peripheral Interface Controller) รุ่น 18F4550 ของ Microchip เป็นตัวประมวลผลและจัดการควบคุมการทำงานของระบบ รวมถึงทำหน้าที่แปลงสัญญาณแอนะล็อกของศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากวงจรรขยายสัญญาณให้เป็นสัญญาณดิจิทัลด้วยโมดูลเอดีซี (Analog to Digital Converter, ADC) วงจรรควบคุมขนาดเล็กชนิดนี้มีความละเอียดของการแปลงสัญญาณขนาด 10 บิต ซึ่งมีความละเอียดของระดับสัญญาณ 1024 ระดับ ทำให้แต่ละระดับการแปลงสัญญาณแอนะล็อกเป็นดิจิทัลของวงจรรควบคุมขนาดเล็กจะมีศักย์ไฟฟ้าแตกต่างกัน 4.88 มิลลิโวลต์เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า 5 โวลต์เป็นไฟเลี้ยงในระบบ ข้อดีของวงจรรควบคุมขนาดเล็กรุ่นนี้คือ มีโมดูลเอดีซีขนาด 10 บิต มีโมดูลยูเอสบี มีหน่วยความจำโปรแกรม (Program memory) เป็นแบบแฟลช (Flash) ซึ่งสามารถโปรแกรมใหม่ได้หลายครั้ง และรองรับการเขียนโปรแกรมภาษา C [40, 41] การใช้ระบบวัดทางแสงในการทดลองวัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ จะแสดงค่าที่วัดได้เป็นค่าการดูดกลืนแสง โดยคำนวณค่าการดูดกลืนแสงจากค่าศักย์ไฟฟ้าโดยใช้กฎของ Lambert-Beer ในหัวข้อ 2.2 ซึ่งสมการที่ใช้ในการประมวลผลแสดงไว้ในสมการที่ 3.2 [31, 42]

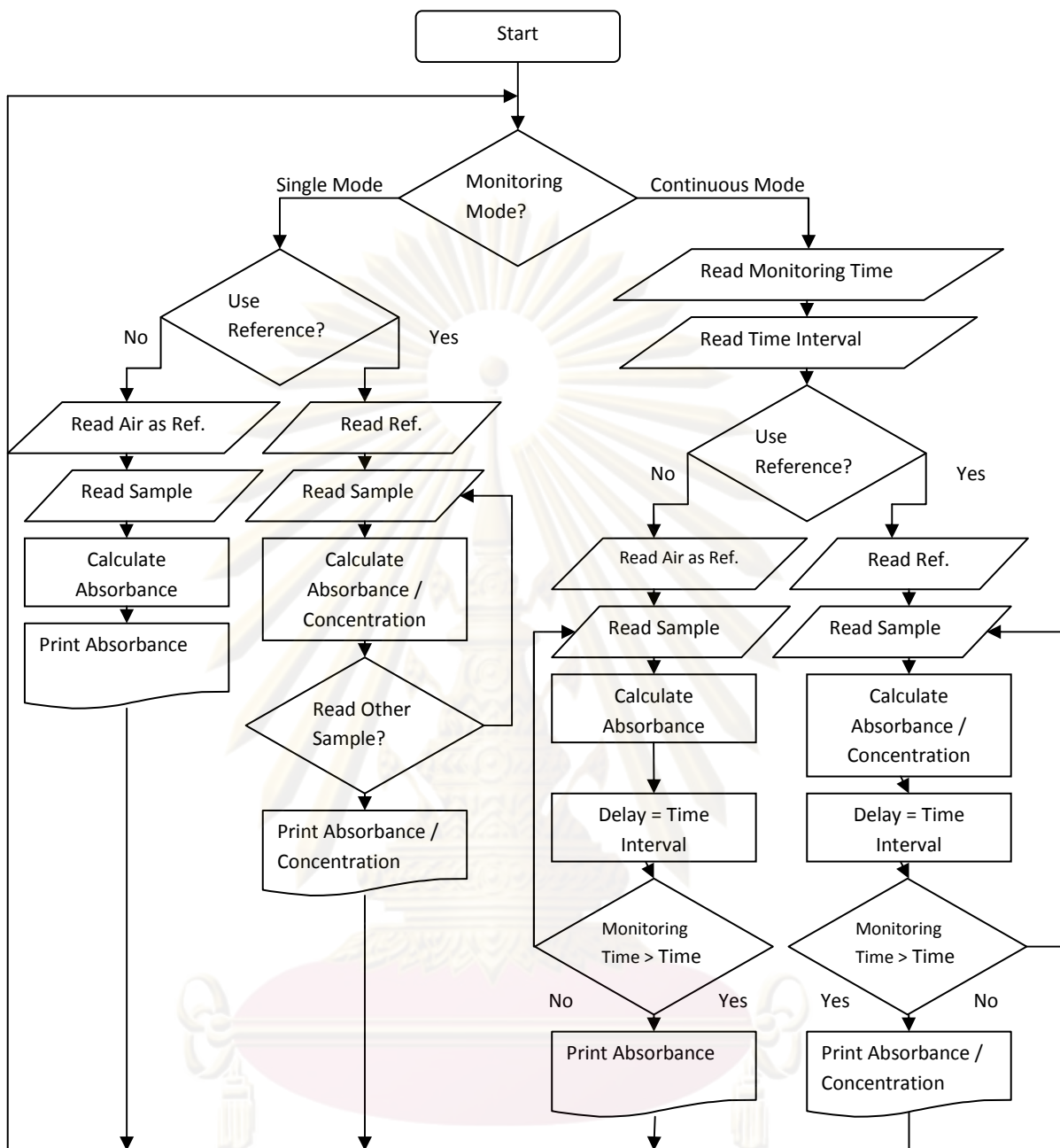
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$A = -\log \left[\frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{zero}})}{(V_{\text{reference}} - V_{\text{zero}})} \right] \quad (3.2)$$

- เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของการวัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นนั้นๆ
- V_{sample} คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าของการวัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นนั้นๆ
- $V_{\text{reference}}$ คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าของการวัดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย
- V_{zero} คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าของสัญญาณพื้นหลัง

วงจรควบคุมประกอบด้วยส่วนของสวิทช์สำหรับรีเซตระบบ และสวิทช์สำหรับรับคำสั่ง วงจรควบคุมแสดงเป็นแผนภาพดังรูปที่ 3.2 ง. คำสั่งที่ใช้ในการควบคุมการทำงานของระบบเขียนด้วยภาษา C โดยมีแผนผังการทำงานดังรูปที่ 3.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.6 แผนผังการทำงานของระบบวัด

วงจรวัดสามารถเชื่อมต่อกับเครื่องคอมพิวเตอร์ได้โดยผ่านทางพอร์ตยูเอสบีโดยใช้โมดูลยูเอสบีของวงจรวัดขนาดเล็ก วงจรส่งออกสัญญาณประกอบด้วยสัญญาณขาออกผ่านขา D+ และสัญญาณขาเข้าผ่านขา D-

3.2.1.6 วงจรแสดงผลทางจอภาพ

ระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นมีความสามารถที่จะทำการวัดและแสดงผลด้วยตัวเองได้ ส่วนของการแสดงผลที่เลือกใช้เป็นชนิดหน้าจอลิควิดคริสตัล (Liquid crystal display, LCD) แบบ 16 ตัวอักษร 2 บรรทัด ติดต่อกับวงจรควบคุมขนาดเล็กด้วยโมดูลแสดงผล (Display driver) ในโหมด 4 บิต แผนผังการต่อวงจรแสดงดังรูปที่ 3.2 จ.

3.2.1.7 ส่วนของตัวเครื่อง

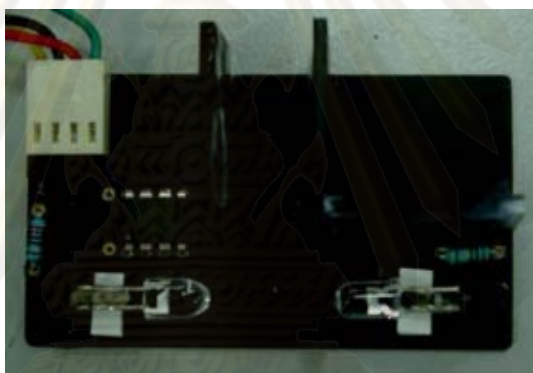
ในการประดิษฐ์เครื่องวัดได้ใช้กล่องพลาสติกขนาด $12 \times 12 \times 5$ เซนติเมตร³ เป็นโครงสร้างของระบบวัดทางแสง ภายในใช้สีดำเพื่อป้องกันการสะท้อนแสงภายในระบบ ในส่วนของช่องสำหรับใส่ตัวอย่างได้ออกแบบให้มีขนาดพอดีกับคิวเวต (Cuvette) สำหรับใส่สารตัวอย่าง ซึ่งมีขนาด $1.2 \times 1.2 \times 4.5$ เซนติเมตร³ ระยะจากแหล่งกำเนิดแสงและโฟโตไดโอดไปยังกึ่งกลางคิวเวตเท่ากับ 8.5 มิลลิเมตร ด้านหน้าโฟโตไดโอดจะถูกกั้นด้วยแผ่นพลาสติกสีดำที่มีช่องให้แสงผ่านขนาด 0.5×1 เซนติเมตร² ตัวแหล่งกำเนิดแสงและโฟโตไดโอดสูงกว่าฐานล่าง 0.6 เซนติเมตร ดังนั้นปริมาตรต่ำสุดที่ใช้วัดได้เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรเมื่อใช้คิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร ภาพเครื่องวัด วงจรภายใน และช่องสำหรับใส่ตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 3.7- 3.9 ตามลำดับ



รูปที่ 3.7 ภาพภายนอกของเครื่องวัดทางแสง และช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง



รูปที่ 3.8 ภาพวงจรภายในของระบบวัดทางแสง



รูปที่ 3.9 ภาพวงจรวัดและช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้น

การทดสอบประสิทธิภาพและการปรับเทียบระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นแบ่งออกเป็น 3 การทดสอบ คือ การทดสอบสัญญาณรบกวนบนพื้นหลัง การทดสอบผลของกำลังขยายและผลของความเข้มแสงที่มีต่อการวัด การเปรียบเทียบระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.2.2.1 การทดสอบสัญญาณรบกวนพื้นหลัง (Background noise)

ในระบบของเครื่องวัดการดูดกลืนแสง นอกจากแสงที่ได้รับจากแหล่งกำเนิดแสงแล้วโฟโตไดโอดยังสามารถได้รับแสงจากสิ่งแวดล้อมทั้งในและนอกระบบ กล่าวคืออาจเกิดจากแสงที่เล็ดลอดมาจากภายนอกแชมเบอร์ และแสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่สะท้อนไปมาภายในแชมเบอร์ ซึ่งแสงทั้งสองส่วนนี้จะมีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เปลี่ยนไปและไม่คงที่ จึงเรียกแสงทั้งสองส่วนนี้เป็นสัญญาณรบกวนพื้นหลัง

การหาค่าสัญญาณรบกวนพื้นหลังทำได้โดยการวัดสัญญาณจากโฟโตไดโอดในสภาวะที่ใช้วัตถุทึบแสงปิดกั้นแสงจากแหล่งกำเนิดแสง โดยทำการวัดสัญญาณจำนวน 100 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของสัญญาณ สัญญาณรบกวนพื้นหลังจะต้องมีค่าไม่มากกว่าครึ่งหนึ่งของสัญญาณที่วัดได้จากตัวอย่าง [29]

3.2.2.2 การทดสอบผลของกำลังขยายและผลของความเข้มแสงที่มีต่อการวัด

ทำการทดสอบเพื่อศึกษาผลที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงกำลังขยายและความเข้มแสงที่มีต่อการวัด โดยใช้กำลังขยาย 1, 3 และ 5 เท่า และการเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงโดยใช้กระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง 25 และ 50 มิลลิแอมแปร์ ในการวัดค่าจะใช้สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต [43, 44] ซึ่งมีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรมาใช้เป็นตัวอย่าง

ทำการทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.001 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 11 ความเข้มข้น วัดค่าศักย์ไฟฟ้าด้วยระบบวัดทางแสง

หาช่วงที่สามารถวัดได้โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) เพื่อบอกคุณสมบัติเชิงเส้นของกราฟ จากนั้นเปรียบเทียบค่าความชันของเส้นกราฟที่ได้จากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) เพื่อใช้บอกผลของการเปลี่ยนแปลงกำลังขยายและความเข้มแสง

3.2.2.3 การเปรียบเทียบระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ทำการสอบเทียบระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้น โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบค่าที่วัดได้ในตัวอย่างเดียวกันของการวัดด้วยระบบวัดทางแสงกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้เป็นมาตรฐาน จากนั้นทำการเปรียบเทียบความชันของระบบวัดกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้เป็นมาตรฐาน

การทดสอบทำโดย นำค่าศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการวัดตัวอย่างสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.001 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 11 ความเข้มข้น ด้วยระบบวัดทางแสงในการทดลอง 3.2.2.2 มาทำการแปลงศักย์ไฟฟ้าให้เป็นค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สมการที่ 3.2 เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในการวัดสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่ความเข้มข้นเดียวกัน

3.2.3 การนำระบบวัดทางแสงไปใช้ในการวัดซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร

หลังจากทำการประดิษฐ์และทดสอบประสิทธิภาพของระบบวัดทางแสงแล้ว ในขั้นตอนนี้จะเป็นการนำระบบวัดทางแสงไปใช้ในการวัดซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร โดยอาศัยหลักการอิมมูโนแอสเซย์ ด้วยเทคนิค ELISA

3.2.3.1 การหาค่าความแรง (Titer) ของแอนติบอดีในการจับกับซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

แอนติบอดีต่อซัลบิวตามอลที่ใช้ได้มาจากการเหนี่ยวนำกระต่ายโดยใช้ซัลบิวตามอลเป็นอิมมูโนเจน นำแอนติบอดีที่ได้มาหาค่าความแรงของแอนติบอดีในการจับกับซัลบิวตามอล เพื่อใช้ในการคัดเลือกอัตราส่วนของแอนติบอดีและอัตราส่วนของซัลบิวตามอลที่สามารถจับกันได้ดีที่สุด ซึ่งจะใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมในการนำไปใช้วัดซัลบิวตามอลตัวอย่าง ขั้นตอนการหาค่าความแรงมีดังนี้

การตรึงแอนติบอดี

ทำโดยการเตรียมแอนติบอดีลงในสารละลายคาร์บอนเนต pH 9.6 ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นอัตราส่วน 1:1 นำไปเจือจางลงอัตราส่วนละ 10 เท่าเป็นอัตราส่วน 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶ และ 1:10⁷ ตามลำดับ และใช้สารละลายคาร์บอนเนตที่ไม่มีแอนติบอดีอยู่เป็นตัวเปรียบเทียบ (Blank) นำแอนติบอดีที่เตรียมไว้เติมลงในภาดหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างแอนติบอดีส่วนที่ไม่ได้จับกับภาดหลุมออกโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ทวิน หลุมละ 180 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำการปิดกั้นพื้นที่ว่างที่ซัลบิวตามอลไม่ได้จับกับภาดหลุมโดยใช้หางนม 5% หลุมละ 100 ไมโครลิตร ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ทวิน หลุมละ 180 ไมโครลิตร 3 ครั้ง

การหาค่าความแรงของแอนติบอดีด้วยอิมมูโนแอสเซย์แบบไม่มีการแย่งที่ โดยใช้เทคนิค

Direct ELISA

เติมซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ทวิน หลุมละ 180 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมด้วยที่เอ็มบีซัสเตรท หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืด 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย กรดซัลฟิวริก 0.5 โมลต่อลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านภาดหลุม นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของการจับ (%Binding) ดังแสดงในสมการที่ 3.3

$$\%binding = \frac{\text{Absorbance of each diluted antibody}}{\text{Maximum absorbance of diluted antibody}} \times 100 \quad (3.3)$$

การคัดเลือกอัตราส่วนของแอนติบอดีที่มีความแรงในการจับกับซัลบิวตามอลได้ดีที่สุดจะพิจารณาจากค่าที่ร้อยละ 50 ของการจับ [45, 46] บนกราฟร้อยละของการจับ โดยเลือกใช้อัตราส่วนของซัลบิวตามอลที่มีการใช้ปริมาณแอนติบอดีน้อยที่สุด

3.2.3.2 การหาช่วงความเข้มข้นที่สามารถวัดได้ของซัลบิวตามอลตัวอย่าง

ในการสร้างกราฟมาตรฐานของการวัดซัลบิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะสุกร จะต้องใช้ช่วงความเข้มข้นที่สามารถวัดได้ที่มีคุณสมบัติเชิงเส้นเพื่อใช้ในการสร้างกราฟ การทดลองนี้จะทำการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นที่สามารถวัดได้ในเบื้องต้น เพื่อนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานในหัวข้อต่อไป ทำการหาช่วงความเข้มข้นของซัลบิวตามอลตัวอย่างที่สามารถวัดด้วยหลักการอิมมูโนแอสเซย์แบบแย่งที่ โดยใช้เทคนิค Direct ELISA ขั้นตอนการหาช่วงความเข้มข้นที่สามารถวัดได้มีดังนี้

การตรึงแอนติบอดี

ทำเช่นเดียวกับการตรึงแอนติบอดีในการทดลองที่ 3.2.3.1 แต่ใช้แอนติบอดีอัตราส่วน 1:120 ในกระบวนการตรึง ซึ่งได้จากผลการหาค่าความแรงของแอนติบอดีในการทดลองที่ 3.2.3.1

การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะสุกร

ตัวอย่างปัสสาวะสุกรที่ใช้ในงานวิจัย เป็นปัสสาวะของสุกรที่เลี้ยงโดยไม่ใช้สารซัลบิวตามอล นำปัสสาวะสุกรที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสด้านบนมากรองผ่านแผ่นเยื่อกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การแย่งที่กันระหว่างซัลบิวตามอลตัวอย่างกับซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ใน

การทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

เตรียมซัลบิวตามอลตัวอย่างในสารละลายฟอสเฟตและในปัสสาวะสุกร โดยใช้ซัลบิวตามอลซัลเฟตความเข้มข้น 0, 1.6, 8, 40, 200, 1000, 5000, และ 25000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำไปหลุมละ 50 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดสที่อัตราส่วน 1:20,000 ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเป็นการทำเช่นเดียวกับการหาค่าความแรงของแอนติบอดีในการทดลองที่ 3.2.3.1

ดูดสารที่ทำการทดลองในภาตหลุมไปยังเข็มไมโครคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อทำการวัดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยระบบวัดทางแสง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของการจับสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการจับกับความเข้มข้น หาช่วงความเข้มข้นของซัลบิวตามอลที่สามารถวัดได้จากโดยพิจารณาจากช่วงที่มีคุณสมบัติเชิงเส้น

3.2.3.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร

นำช่วงความเข้มข้นที่สามารถวัดได้จากการทดลองที่ 3.2.3.2 มาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ 5 ความเข้มข้นในช่วงที่สามารถทำการวัดได้ ทำการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยหลักการอิมมูโนแอสเซย์แบบแย่งที่ โดยใช้เทคนิค Direct ELISA [45, 46, 47]

ทำการทดสอบการแย่งที่กันระหว่างซัลบิวตามอลตัวอย่างกับซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยาจับกับแอนติบอดีในช่วงความเข้มข้น 10 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.3.2 เพื่อนำมาใช้สร้างกราฟมาตรฐานของซัลบิวตามอล โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.3.2 ยกเว้นใช้ซัลบิวตามอลซัลเฟตความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรแทน

3.2.3.4 ความเที่ยง และความแม่นยำ (Precision and Accuracy) ของการตรวจวัดซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร

การทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำ เป็นการทดสอบเพื่อหาความน่าเชื่อถือของวิธีการทดสอบผลของการวัดซัลบิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะสุกร [47, 48] การทดสอบความเที่ยง เพื่อใช้แสดงความใกล้เคียงกันของค่าที่วัดได้ ทำการวัดตัวอย่างปัสสาวะสุกรที่เติมซัลบิวตามอลลงไป นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นด้วยสมการถดถอยของกราฟมาตรฐาน หาค่าเฉลี่ย (\bar{X}) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่วัดได้ ความเที่ยงแสดงด้วยค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative standard deviation, %RSD) ดังสมการที่ 3.5

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \quad (3.5)$$

การทดสอบความแม่นยำ เพื่อให้แสดงความใกล้เคียงของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ ว่าเป็นความใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นจริงที่เติมลงไป ความแม่นยำแสดงในรูปของค่าร้อยละความเบี่ยงเบน (%Bias) ดังสมการที่ 3.6

$$\% \text{Bias} = \frac{(\text{ค่าที่วัดได้} - \text{ค่าที่เติม}) \times 100}{\text{ค่าที่เติม}} \quad (3.6)$$

การหาค่าความเที่ยงและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทำโดยการเติมซัลฟิวตามอลลงในปัสสาวะสุกรให้มีความเข้มข้น 70 และ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ทำพร้อมกับการสร้างกราฟมาตรฐานในการทดลอง 3.2.3.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดด้วยระบบวัดทางแสงมาคำนวณเป็นความเข้มข้นของซัลฟิวตามอลด้วยสมการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน ความเที่ยงแสดงด้วยค่า %RSD ที่คำนวณโดยสมการที่ 3.5 และความแม่นยำแสดงด้วยค่า %Bias ที่คำนวณโดยสมการที่ 3.6 โดยความเข้มข้นซัลฟิวตามอลที่ทำการตรวจวัดควรจะมีค่าความเที่ยงและความแม่นยำไม่เกิน 15% [48]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผล

4.1 การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสง

ระบบวัดทางแสงที่ได้ทำการประดิษฐ์ขึ้นนั้น มีคุณสมบัติทั่วไปดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติทั่วไปของระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้น

ไฟเลี้ยง	ไฟฟ้ากระแสสลับ 220 โวลต์ หรือไฟฟ้ากระแสตรง 5 โวลต์
ความยาวคลื่นหลักของแหล่งกำเนิดแสง	450 นาโนเมตร
ความยาวคลื่นหลักของตัวตรวจจับแสง	475 นาโนเมตร
กำลังขยายที่สามารถใช้ได้	1 - 5 เท่า
ความละเอียดของการวัดสัญญาณ	1024 ระดับ
การแสดงผล	จอผลึกเหลวแบบ 16 ตัวอักษร 2 บรรทัด
การเชื่อมต่อ	เครื่องคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ตยูเอสบี
ขนาดเครื่องวัด	12 x 12 x 5 เซนติเมตร
ช่องใส่ตัวอย่าง	1.2 x 1.2 x 4.5 เซนติเมตร
ช่องทางเดินแสง	0.5 x 1 เซนติเมตร
ปริมาณตัวอย่างน้อยสุดในการวัด	0.4 มิลลิลิตร เมื่อใช้ไมโครคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้น

4.2.1 การทดสอบสัญญาณรบกวนพื้นหลัง

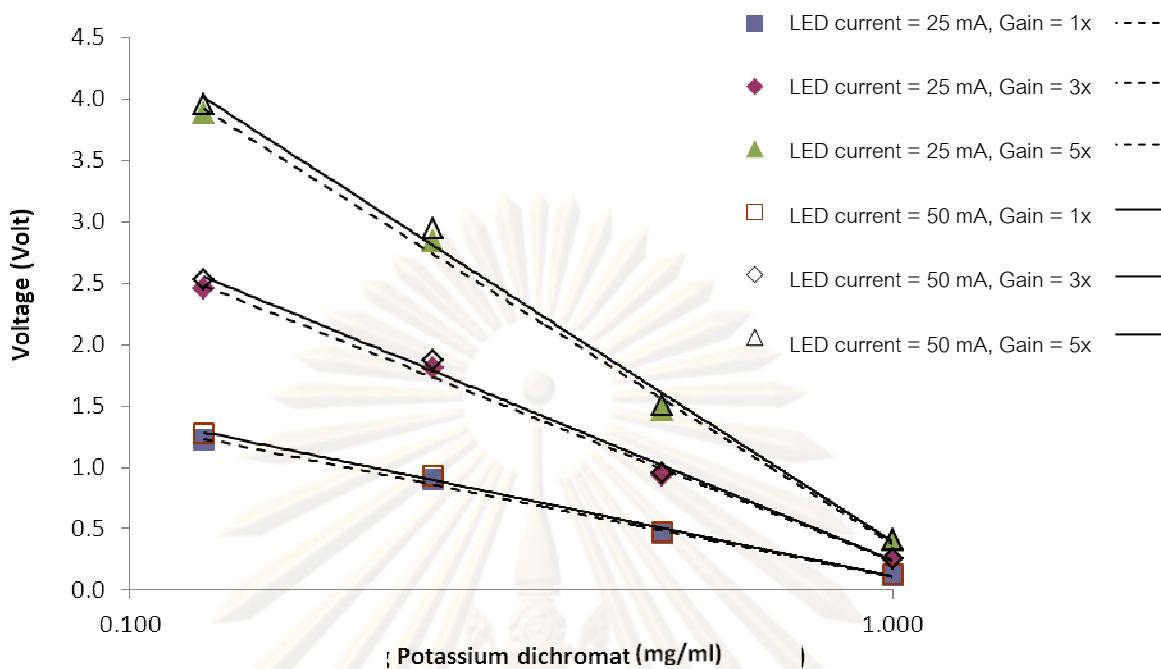
ค่าสัญญาณรบกวนพื้นหลังที่ได้จากการวัดสัญญาณของโฟโตไดโอดในสภาวะที่ใช้วัตถุที่บดแสงปิดกั้นแสงจากแหล่งกำเนิดแสง ด้วยการวัดสัญญาณจำนวน 100 ครั้ง พบว่ามีค่า $\bar{X} \pm SD$ เท่ากับ 2 ± 1 มิลลิโวลต์

เนื่องจากเฉลี่ยของสัญญาณรบกวนพื้นหลังที่วัดได้มีค่าต่ำกว่าค่าความผิดพลาดที่สามารถเกิดขึ้นได้จากการเปลี่ยนแปลงของระดับสัญญาณแอนะล็อกเป็นดิจิทัลของวงจรควบคุมขนาดเล็ก 1 ระดับซึ่งมีค่า 4.88 มิลลิโวลต์ จึงเลือกใช้ค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับสัญญาณ 4.88 มิลลิโวลต์ ซึ่งเป็นค่าความผิดพลาดที่สูงกว่าเพื่อใช้เป็นค่าสัญญาณรบกวนพื้นหลัง

4.2.2 การทดสอบผลของกำลังขยายและผลของความเข้มแสงที่มีต่อการวัด

ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการทดลองวัดสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ความเข้มข้น 0.001 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 ซ้ำ เมื่อเปลี่ยนความเข้มของแหล่งกำเนิดแสงโดยใช้ค่ากระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง 25 และ 50 มิลลิแอมป์ และเมื่อใช้กำลังขยายสัญญาณขนาด 1, 3 และ 5 เท่า ทำการวัดด้วยระบบวัดทางแสง สร้างกราฟระหว่างศักย์ไฟฟ้ากับความเข้มข้นโพแทสเซียมไดโครเมต ช่วงที่สามารถทำการวัดได้จะอยู่ในช่วง 0.125 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.1 แสดงสมการถดถอยเชิงเส้น และค่า R^2 ในตารางที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 กราฟระหว่างศักย์ไฟฟ้ากับความเข้มข้นโพแทสเซียมไดโครเมตในช่วง 0.125 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของการวัดด้วยระบบวัดทางแสงเมื่อเปลี่ยนกำลังขยาย (Gain) และเปลี่ยนกระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง (LED current)

ตารางที่ 4.2 สมการถดถอยเชิงเส้นและค่า R²

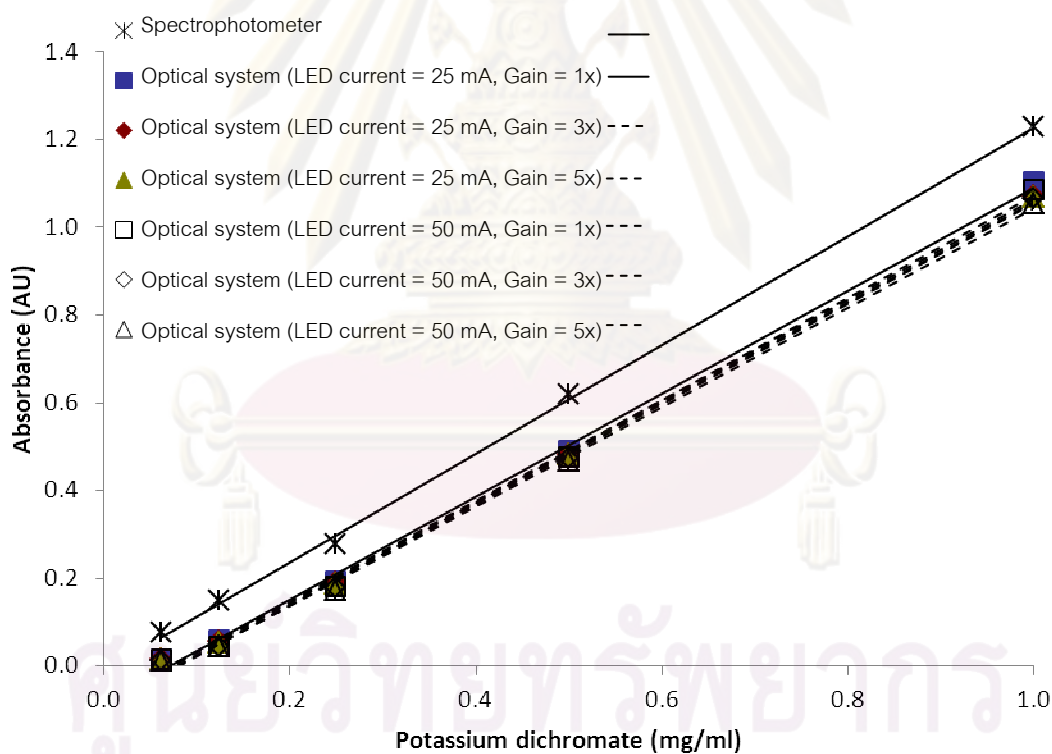
ค่ากระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง (มิลลิแอมแปร์)	กำลังขยาย	สมการถดถอยเชิงเส้น	R ²
25	1	$y = -0.54\ln(x) + 0.107$	0.996
25	3	$y = -1.08\ln(x) + 0.235$	0.996
25	5	$y = -1.70\ln(x) + 0.368$	0.996
50	1	$y = -0.56\ln(x) + 0.111$	0.996
50	3	$y = -1.11\ln(x) + 0.240$	0.996
50	5	$y = -1.74\ln(x) + 0.391$	0.995

จากสมการถดถอย ($y = ax+b$) ความไวในการวัดแสดงด้วยค่าความชัน (a) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงกำลังขยายมีผลต่อความชันมาก ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงกระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิด

แสงมีผลต่อความชันเพียงเล็กน้อย โดยที่การใช้กำลังขยายที่ 5 เท่าและกระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง 50 มิลลิแอมแปร์จะให้ความชันที่ดีที่สุด ส่วนการที่ค่าความชันเป็นลบเนื่องจากค่าศักย์ไฟฟ้าที่ระบบวัดได้เป็นค่าการทะลุผ่านของแสง ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับค่าการดูดกลืนแสง

4.2.3 การเปรียบเทียบระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

นำค่าศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการวัดด้วยระบบวัดทางแสงมาคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสง เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากการวัดในช่วง 0.001 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงที่สามารถทำการวัดได้จะอยู่ในช่วง 0.063 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในรูปที่ 4.2 และแสดงสมการถดถอยเชิงเส้นและค่า R^2 ในตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.2 กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นโพแทสเซียมไดโครเมตในช่วงความเข้มข้น 0.063 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของการวัดด้วยระบบวัดทางแสงเมื่อเปลี่ยนกำลังขยายและเปลี่ยนกระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง เปรียบเทียบกันผลของการวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

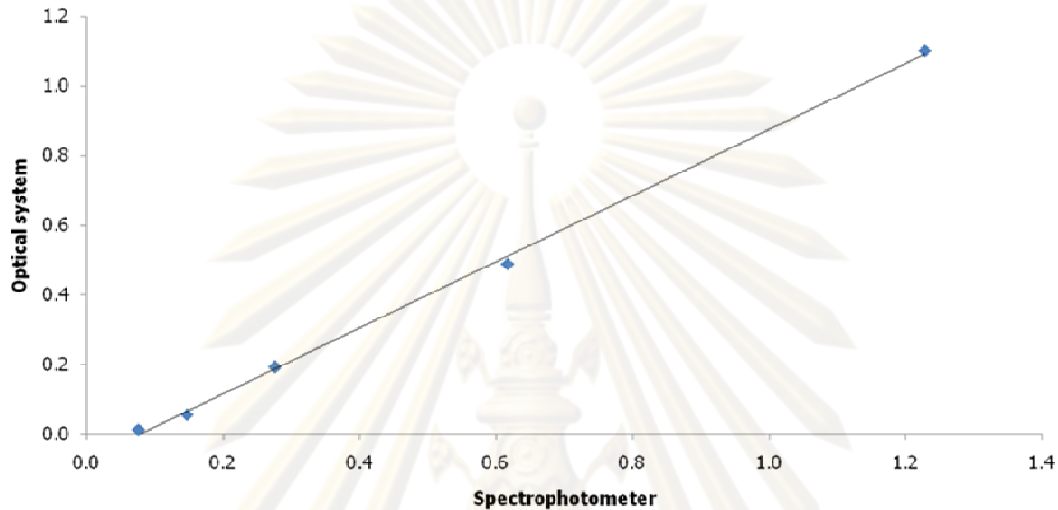
ตารางที่ 4.3 สมการถดถอยเชิงเส้นและค่า R^2

ระบบวัด	สมการถดถอย	R^2
สเปกโทรโฟโตมิเตอร์	$y = 1.239x - 0.011$	0.999
ระบบวัด	สมการถดถอย	R^2
ระบบวัดทางแสง		
ค่ากระแสที่ไหลผ่านแหล่งกำเนิดแสง		
(มิลลิแอมแปร์)	กำลังขยาย	
25	1	$y = 1.175x - 0.084$
25	3	$y = 1.145x - 0.082$
25	5	$y = 1.142x - 0.083$
50	1	$y = 1.167x - 0.093$
50	3	$y = 1.144x - 0.089$
50	5	$y = 1.132x - 0.090$

จากกราฟเมื่อทำการแปลงค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นค่าการดูดกลืนแสงแล้วพบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะไม่ขึ้นกับอัตราขยายและความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสง เนื่องจากในสมการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงจะหาได้จากอัตราส่วนระหว่างความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงกับความเข้มแสงที่ทะลุผ่าน ซึ่งผลของกำลังขยายและความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงจะถูกตัดทอนไปในสมการ เมื่อพิจารณาค่าความชันที่ได้จากสมการถดถอยพบว่าค่าความชันที่ได้มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดได้จากการขยายสัญญาณของวงจรถ่ายยที่ใช้อย่างไม่เป็นไปตามสมการคำนวณกำลังขยาย

ในการเปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความเข้มของค่าเดียวกันของสารละลาย พบว่าเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์มีค่าความชันในการวัดการดูดกลืนแสงที่ดีกว่า แม้ว่าการวัดด้วยระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นและเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะเป็นการวัดด้วยหลักการทางสเปกโทรสโกปีเช่นเดียวกันก็ตาม แต่ส่วนของแหล่งกำเนิดแสง ตัวตรวจวัดแสง และวงจรต่าง ๆ ที่ใช้ภายในเครื่องทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกัน ทำให้สัญญาณไฟฟ้าที่ได้จากการวัดสารตัวอย่างที่ความเข้มเดียวกันมีค่าไม่เท่ากัน ในการแปลงสัญญาณไฟฟ้าเป็นค่าการดูดกลืนแสงแม้ว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นคุณสมบัติที่ขึ้นกับสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดก็ตาม แต่สมการที่ใช้ในการแปลงสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกันทำให้ค่าการดูดกลืนแสง

ที่วัดได้จากตัวอย่างความเข้มข้นเดียวกันมีค่าไม่เท่ากัน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการปรับเทียบระบบวัดทางแสงที่ได้ประดิษฐ์ขึ้นโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นเครื่องอ้างอิง โดยทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดด้วยระบบวัดทางแสงและเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในการวัดตัวอย่างเดียวกันดังแสดงในรูปที่ 4.3

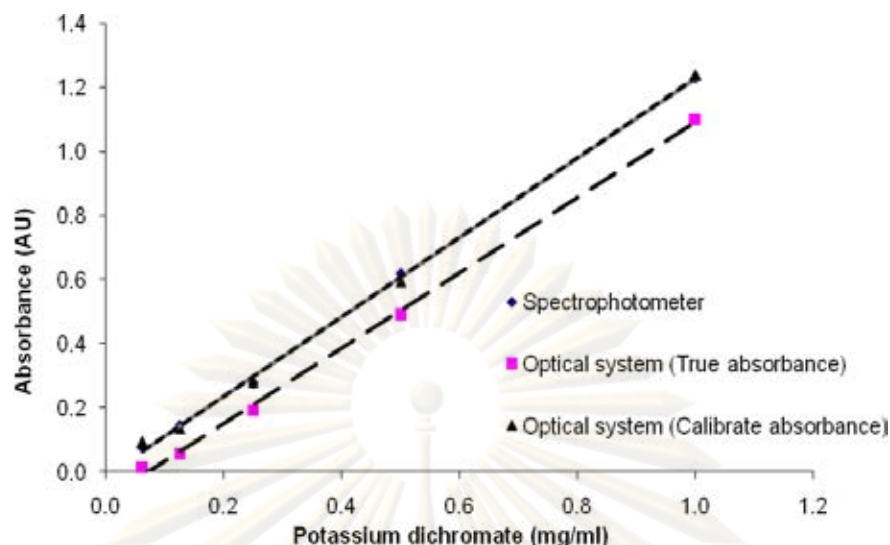


รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยระบบวัดทางแสงและเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

จากกราฟจะได้สมการเชิงเส้น $y = 0.9497x - 0.0731$ ซึ่งสามารถนำสมการนี้มาใช้ปรับเทียบสมการแปลงสัญญาณไฟฟ้าเป็นค่าการดูดกลืนแสงในสมการที่ 3.2 ได้เป็นสมการที่ 4.1

$$A = \frac{-\log \frac{V_{\text{solution}} - V_{\text{zero}}}{V_{\text{solvent}} - V_{\text{zero}}} + 0.0731}{0.9479} \quad (4.1)$$

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตของการวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เปรียบเทียบกับกราฟจากการวัดด้วยระบบวัดทางแสงก่อนและหลังการปรับเทียบด้วยสมการที่ 4.1 ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งการใช้การปรับเทียบด้วยสมการนี้สามารถใช้ได้เฉพาะสารโพแทสเซียมไดโครเมตในช่วงความเข้มข้น 0.063 - 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น



รูปที่ 4.4 กราฟระหว่ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดโครเมต ในช่วงความเข้มข้น 0.063 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของการวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์และการวัดด้วยระบบวัดทางแสงก่อนและหลังการปรับเทียบ

4.3 การนำระบบวัดทางแสงไปใช้ในการวัดซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร

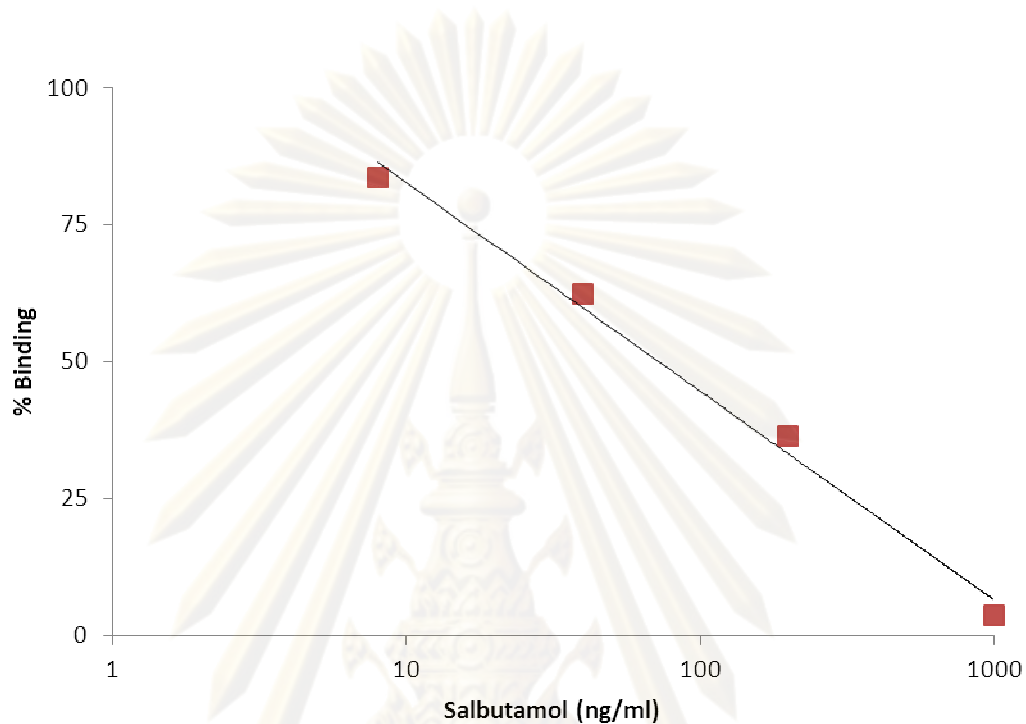
4.3.1 การหาค่าความแรง (Titer) ของแอนติบอดีในการจับกับซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

ในงานวิจัยนี้อัตราส่วนแอนติบอดีที่มีความแรงในการจับกับซัลบิวตามอลได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาจากค่าที่ร้อยละ 50 ของการจับ พบว่าเมื่อใช้ซัลบิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัตราส่วน 1:20,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะเหมาะสมกับแอนติบอดีที่อัตราส่วน 1:120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3.2 การหาช่วงความเข้มข้นของซัลบิวตามอลตัวอย่างที่สามารถวัดได้

นำค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเข้มข้นที่วัดได้จากระบบวัดทางแสงมาคำนวณหาค่าร้อยละของการจับ จากนั้นสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการจับกับความเข้มข้นซัลบิวตามอลซัลเฟตใน

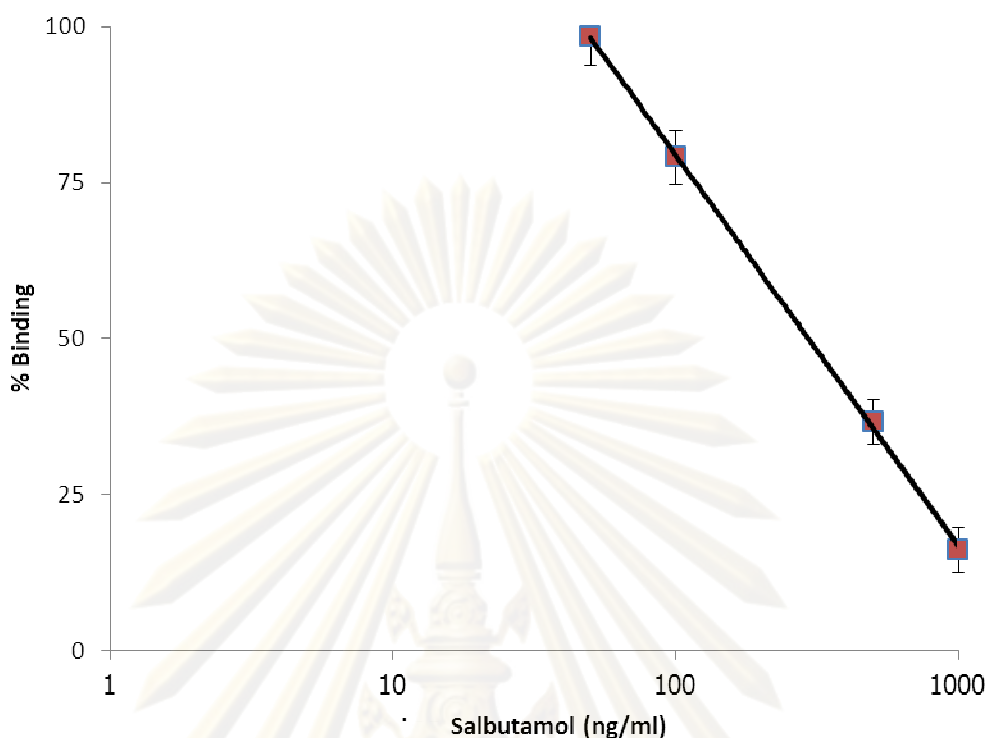
ปัสสาวะสุกรที่ช่วง 0 – 25,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าช่วงความเข้มข้นที่สามารถวัดได้คือ 8 – 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.5 กราฟมีความสัมพันธ์เชิงลอการิทึมโดยมีสมการถดถอย $y = -16.5\ln(x) + 120.9$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.990



รูปที่ 4.5 กราฟระหว่างร้อยละของการจับกับความเข้มข้นซัลบิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะสุกร ในช่วงความเข้มข้น 8 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของการวัดด้วยระบบวัดทางแสง

4.3.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร

นำค่าการดูดกลืนแสงของซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกรที่วัดได้จากระบบวัดทางแสงมาคำนวณหาค่าร้อยละของการจับ จากนั้นสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการจับกับความเข้มข้นซัลบิวตามอลซัลเฟตในปัสสาวะสุกรที่ช่วงความเข้มข้น 10 – 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าช่วงความเข้มข้นที่สามารถวัดได้คือ 50 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นช่วงที่มีความสัมพันธ์เชิงลอการิทึม กราฟมาตรฐานของการวัดซัลบิวตามอลแสดงในรูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์เชิงลอการิทึม $y = -27.1\ln(x) + 204.5$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.999



รูปที่ 4.6 กราฟระหว่างร้อยละของการจับกับความเข้มข้นซัลบิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะสุกร ในช่วงความเข้มข้น 50 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของการวัดด้วยด้วยระบบวัดทางแสง

4.3.4 ความเที่ยง และความแม่นยำของการตรวจวัดซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร

ความเที่ยงและความแม่นยำได้จากการวัดซัลบิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะสุกรความเข้มข้น 70 และ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นของซัลบิวตามอล ค่าความเที่ยงและความแม่นยำจากการวัดด้วยระบบวัดทางแสงแสดงในตารางที่

4.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ความเที่ยงและความแม่นยำของการวัดซัลบิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะ
สุกรด้วยระบบวัดทางแสง

ความเข้มข้นที่เติมลงไป (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (n=3) (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	$\bar{X} \pm SD$	% RSD	%Bias
70	78 ± 7	9	+ 11
300	323 ± 23	7	+ 8

ความเที่ยงของการวัดจะยอมรับได้เมื่อ %RSD ไม่เกิน 15% [48] ของความเข้มข้นที่เติมลงไป ซึ่งค่าจากตารางที่ความเข้มข้น 70 และ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มี %RSD 9% และ 7% ตามลำดับ จึงบอกได้ว่าการวัดด้วยระบบวัดทางแสงนั้นมีความเที่ยง

ความแม่นยำของการวัดจะยอมรับได้เมื่อ %Bias ไม่เกิน $\pm 15\%$ ของความเข้มข้นที่เติมลงไป [48] ซึ่งค่าจากตารางที่ความเข้มข้น 70 และ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มี %Bias +11% และ +8% ตามลำดับ จึงบอกได้ว่าการวัดด้วยระบบวัดทางแสงนั้นมีความแม่นยำ

การที่เลือกใช้ความเข้มข้น 70 และ 300 นาโนกรัมเนื่องจากช่วงที่สามารถวัดได้ของกราฟมาตรฐานในการทดลองนี้มีช่วงแคบกว่าช่วงที่สามารถวัดได้ของกราฟมาตรฐานในการทดลองเบื้องต้น ซึ่งเป็นช่วงที่นำมาใช้ในการเลือกความเข้มข้นสำหรับหาค่าความเที่ยงและความแม่นยำ และเนื่องจากช่วงที่สามารถวัดได้ของกราฟมาตรฐานในการทดลองนี้แคบลง ทำให้ความเข้มข้นที่ได้เลือกไว้สำหรับหาค่าความเที่ยงและความแม่นยำบางส่วนไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากไม่ได้อยู่บนกราฟมาตรฐาน จึงเป็นสาเหตุให้ความเข้มข้นในการหาค่าความเที่ยงและความแม่นยำไม่ได้เป็นความเข้มข้นที่เป็นค่าต่ำสุด ค่ากลาง และค่าสูงสุดบนกราฟมาตรฐาน ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรจะมีการทำการทดลองซ้ำเพื่อให้ได้ค่าความเที่ยงและความแม่นยำที่ความเข้มข้นค่าต่ำสุด ค่ากลาง และค่าสูงสุดบนกราฟมาตรฐาน

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

งานวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงด้วยหลักการดูดกลืนแสงสำหรับตรวจวัดซัลฟิวตามอล การตรวจวัดใช้แอนติบอดีเป็นสารชีวภาพในการจับจำเพาะกับซัลฟิวตามอล การวัดทำโดยใช้หลักการอิมมูโนแอสเซย์แบบมีการแย่งที่ โดยใช้เทคนิค Direct ELISA ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาจะเกิดการแย่งกันระหว่างซัลฟิวตามอลตัวอย่างกับซัลฟิวตามอลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ในขั้นตอนการวัดจะใช้ซับสเตรตเพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่เป็นตัวติดฉลาก ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะแปรผกผันกับปริมาณซัลฟิวตามอลตัวอย่างที่นำมาตรวจวัด ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ TMB เป็นซับสเตรต ซึ่งสีที่เกิดขึ้นจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

การประดิษฐ์ระบบวัดทางแสงนี้ใช้ไดโอดเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะ 450 นาโนเมตร เป็นแหล่งกำเนิดแสง และใช้โฟโตไดโอดที่สามารถวัดได้ในช่วงความยาวคลื่น 370 - 570 นาโนเมตร เป็นตัวตรวจวัดแสง การวัดสัญญาณมีความละเอียดของการวัดสัญญาณ 1024 ระดับ ระบบวัดทางแสงมีการปรับเทียบความไวโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-3101PC, Shimada) เป็นมาตรฐาน ในการนำระบบวัดทางแสงไปวัดซัลฟิวตามอลในปัสสาวะสุกร มีช่วงความเข้มข้นที่สามารถทำการวัดได้ 50 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ความเที่ยงและความแม่นยำของระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นในการวัดซัลฟิวตามอลมีค่าที่ยอมรับได้ในค่าของ %RSD และ %Bias ที่ 9% และ +11% ตามลำดับ ระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นมีขนาด 12 x 12 x 5 เซนติเมตร³ สามารถใช้ไฟเลี้ยงได้จาก 2 แหล่งจ่ายคือไฟฟ้ากระแสสลับ 220 โวลต์และไฟฟ้ากระแสตรง 5 โวลต์ มีการแสดงผลทางจอภาพและส่งสัญญาณออกไปยังคอมพิวเตอร์ ส่วนของช่องสำหรับใส่ตัวอย่างมีขนาด 1.2 x 1.2 x 4.5 เซนติเมตร³ ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตร เมื่อใช้ไมโครคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดที่ต้องทำการศึกษาเพื่อพัฒนาระบบวัดทางแสงให้มีประสิทธิภาพ และมีความสะดวกในการนำไปตรวจคัดกรองในสถานใช้งานจริงต่อไปในอนาคต

5.2 ปัญหาและข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในขั้นตอนการวัดซัลฟิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะสุกรด้วยเทคนิคอีไลซานั้นต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยารวมหลายชั่วโมง ใช้เครื่องมือหลายชนิด อีกทั้งต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ ทำให้ยังไม่เหมาะสมเพียงพอในการนำระบบวัดทางแสงในงานวิทยานิพนธ์นี้ไปใช้วัดในสถานที่จริง เช่น ฟาร์ม หรือ โรงฆ่าสัตว์ เป็นต้น ซึ่งในส่วนนี้ควรจะมีการทดลองต่อไปเพื่อลดเวลาและขั้นตอนของการตรวจวัด

5.2.2 เมื่อทำการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงจากค่าแรงดันไฟฟ้าแล้ว กำลังขยายที่ใช้ไม่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง ทำให้ไม่สามารถใช้การขยายสัญญาณเพื่อทำการวัดในช่วงที่มีความเข้มข้นต่ำได้

5.2.3 การตรึงแอนติบอดีในงานวิทยานิพนธ์นี้ ทำการตรึงเฉพาะบนภาคหลุม เนื่องจากการตรึงบนเซมิ-ไมโครคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิเมตรนั้นมีพื้นที่ด้านล่างสำหรับใช้ตรึงแอนติบอดีเพียง 0.5×1 เซนติเมตร ซึ่งต่อไปควรจะมีการทดลองเพื่อหาขั้นตอนและสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการตรึงบนเซมิ-ไมโครคิวเวต

5.2.4 ระบบวัดทางแสงที่ประดิษฐ์ขึ้นในงานวิทยานิพนธ์นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการวัดเฉพาะสารซัลฟิวตามอลเท่านั้น จึงไม่สามารถวัดตัวอย่างที่ชนิดอื่นได้ ในการนำไปวัดตัวอย่างชนิดอื่นจะต้องทำการปรับปรุง เช่น

- ทำการเปลี่ยนแอนติบอดีและแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ให้เหมาะสมกับการวัดตัวอย่างชนิดนั้นๆ
- ปรับปรุงระบบวัดทางแสงโดยเปลี่ยนแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัดแสงให้เหมาะสม หรือใช้การเกรตติงเพื่อแยกแสงก็ได้

รายการอ้างอิง

- [1] ปศุสัตว์, กรม. ตารางแสดงจำนวนสัตว์ในประเทศแยกเป็นรายภาคปี 2550.
[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.dld.go.th> [2551, พฤษภาคม 1].
- [2] การค้าต่างประเทศ, กรม. สินค้าสุกร. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.dft.moc.go.th>
[2551, พฤษภาคม 1].
- [3] Traynor, I.M., Crooks, S.R.H., Crooks, J. and Elliott, C.T. 2003. Detection of Multi- β -Agonist Residues in Liver Matrix by use of a Surface Plasma Resonance Biosensor. Analytica Chimica Acta. 483: 187–191.
- [4] Johansson, M.A. 2004. Immunosensor Methods for Drug Residue Control of Food.
Doctoral Thesis. Department of Food Science. Acta Universitatis agriculturae Suecia.
- [5] Wikipedia. Salbutamol – Wikipedia. [online]. Available from:
<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Salbutamol> [2008, April 1].
- [6] McEvoy, G.K. 2007. AHFS Drug Information. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists
- [7] พิสิฐ วงศ์วัฒน์. 2548. ยา The Pill Book. กรุงเทพฯ: หมอชาวบ้าน, 1400
- [8] โสภิต ธรรมอารี และคณะ. 2533. เภสัชวิทยา 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [9] สุวัฒน์ วิมลวัฒน์ภักดิ์. 2543. ตำราเภสัชวิทยา เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดพิทักษ์
การพิมพ์
- [10] สุภาภรณ์ พงศกร และ ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์. 2543. ความก้าวหน้าทางเภสัชวิทยา ของ ยาแก้
โรคหืด ยาลดน้ำตาลในเลือด ยาต้านเกร็ดเลือด ยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด และยา
คลายลิ้มเลือด. กรุงเทพฯ: นิเวไทยมิตรการพิมพ์
- [11] รัฐบาลไทย. สรุปผลการประชุมคณะรัฐมนตรี วันที่ 18 มีนาคม 2546.
[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.thaigov.go.th> [2551, พฤษภาคม 1].
- [12] สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2545. ปัญหาขาดก้างในเนื้อสัตว์และแนวทางแก้ไข
1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานองค์การทหารผ่านศึก

- [13] สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2545. ปัญหาขาดค้ำในเนื้อสัตว์และแนวทางแก้ไข
2.กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานองค์การทหารผ่านศึก
- [14] Jones, R.W., Easter, R.A., McKeith, F.K., Dalrymple, R.H., Maddock, H.M. and Bechtel, P.J. 1985. Effect of the β -Adrenergic Agonist Cimaterol (CL 263,780) on the Growth and Carcass Characteristics of Finishing Swine. Journal of Animal Science. 61: 905-907
- [15] Warriss, P.D., Kestin, S.C., Rolph, T.P. and Brown, S.N. 1990. The Effects of the beta-Adrenergic Agonist Salbutamol on Meat Quality in Pigs. Journal of Animal Science. 68: 128-136
- [16] Andrea, P., Miroslav, S., Silvia, S. and Stanislav, M. 2001. A Solid Binding Matrix/Molecularly Imprinted Polymer-based Sensor System for the Determination of Clenbutarol in Bovine Liver using Differential-pulse Voltammetry. Sensor and Actuators. B 76: 286-294
- [17] Velasco-Garcia, M.N. and Mottram, T. 2003. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. Biosystems Engineering.84. 1: 1–12
- [18] นันทยา ชนะรัตน์. Biosensors. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.ams.cmu.ac.th> [2551, พฤษภาคม 1].
- [19] Feltis, B.N., Sexton, B.A., Sexton, F.L., Sexton, M.J., Wilkins, M. and Wilkins, T.J. 2008. A Hand-held Surface Plasmon Resonance Biosensor for the Detection of Ricin and other Biological Agents., Biosensors and Bioelectronics Vol.23: 1131–1136
- [20] มานะ ศรียุทธศักดิ์. 2536. ตัวตรวจจู้ชีวภาพ: ไบโอะเซนเซอร์. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [21] Wilkins, J. 2007. Biomedical Engineering. Austria: ACTA Press, 468
- [22] Ho, W., Chen, J., Ker, M., Wu, T., Wu C., Yang, Y., Li, Y. and Yuan, C. 2007. Fabrication of a Miniature CMOS-based Optical Biosensor. Biosensors and Bioelectronics. 22: 3008–3013

- [23] เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ. 2553. การวิเคราะห์ด้วยยาในซีรัม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่ง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [24] กฤษณา จรรยาพูน. 2548. พื้นฐานการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน Basic Immunoassays.
กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แอนนาออฟเซต
- [25] มนต์รี จุฬาวัดมนทล. 2542. ซีวเคมี. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล
- [26] นภาพร บานชื่น. ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
- [27] สมบูรณ์ เลิศปัญญาวิรพล, ไพรวัน สีพั้ว และ วีระศักดิ์ อัญโยธา. 2539. การตรวจสอบการใช้
สารเร่งเนื้อแดงชนิดซัลบูตามอลในสุกรโดยตรวจจากปัสสาวะ. กรุงเทพฯ : คณะสัตว
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [28] Kirkegaard and Perry Laboratories. Comparison of ABTS, TMB and OPD Peroxidase
Substrate System. [online]. Available from : <http://www.kem-en-tec.com> [2008,
April 3].
- [29] แม้น อมรสิทธิ์. 2539. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์
- [30] พิมล เรียนวัฒนา. 2524. สเปกโตรสโคปีขั้นพื้นฐานกับการประยุกต์ทางเคมี. กรุงเทพฯ : อักษร
เจริญทัศน์
- [31] Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A. 1998. Principle of Instrumental Analysis.
Saunders College publishing
- [32] บุญเชิด อางองค์ และ เกียรติศักดิ์ พิมพ์งาม. ผลการตรวจหาสารเร่งเนื้อแดง กลุ่มเบต้าอะโก
นินส์ ในปัสสาวะสุกรของจังหวัดพะเยาโดยวิธีอีไลซ่า. วารสารวิชาการปศุสัตว์เขต 5. 7: 3
- [33] Wang, W., Geng, C., Geng, Y., Shi, X. and Ye, J. 2007. CE-ED Separation and
Determination of Seasonal Content Variations of Some Active Ingredients in
Toona sinensis (A. Juss) Roem Leaves. Chromatographia. 66: 697–701
- [34] Lei, Y., Tsai, Y., Tai, Y., Lin, C., Hsieh, K., Chang, T., Sheu, S. and Kuo, T. 2008.
Development and Fast Screening of Salbutamol Residues in Swine Serum by an

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Taiwan. Agricultural and Food Chemistry. 56: 5494-5499

- [35] Thongnopnua, P., Lipipun, V., Niratisai, S. and Matapatara, W. 2008. The detection of residual salbutamol in swine's urine and liver. Thai J.Pharm. Sci. 32: 70
- [36] Marubeni America Corporation, MOLD LED LAMP L450series Lead(Pb)Free Product-RoHS Compliant, [online]. Available from : http://www.ushiolighting.co.jp/product/LED/epitex/mold/pdfs/L450-__series_catalog.pdf [2010, March 1].
- [37] คุณิต เครื่องงาม. 2542. สิ่งประดิษฐ์ออปโตอิเล็กทรอนิกส์ พิสิกส์ เทคโนโลยี และการใช้งาน เล่ม 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [38] EPIGAP Optoelektronik GmbH, Selective Photodiode EPD-470-5/05-1, [online]. Available from : <http://www.datasheetarchive.com/datasheet-pdf/078/DSAE0070676.html> [2010, March 1].
- [39] Analog Devices, Inc. 1999. AD623 Single Supply, Rail-to-Rail, Low Cost Instrumentation Amplifier. [online]. Available from : <http://www.analog.com> [2010, March 1].
- [40] Microchip Technology Inc. 2004. PIC18F2455/2550/4455/4550. [online]. Available from : <http://www.microchip.com> [2010, March 1].
- [41] ประจัน พลังสันติกุล. 25. เรียนรู้และใช้งาน CCS C คอมไพเลอร์ เขียนโปรแกรมภาษา C ควบคุมวงจรควบคุมขนาดเล็ก PIC. กรุงเทพฯ: อินโนเวตีฟ เอ็กเพอริเมนต์
- [42] Noui, L., Hill, J., Keay, P.J., Wang, R.Y., Smith, T., Yeung, K., Yeung, G. and Hoare, M. 2002. Development of a high resolution UV spectrophotometer for at-line monitoring of bioprocess. Chemical Engineering and Processing. 41:107-114
- [43] Shultz, A., Campbell, D., and Messman, J. 1998. Reference Material Standardization Guidelines for Quality Control and Validation of UV/VIS Absorption Spectrophotometers. Cal lab.

- [44] International Accreditation New Zealand. 2005. UV/VIS Spectrophotometer Calibration Procedures. [online]. Available from : http://www.ianz.govt.nz/publications2/pdfs/ASTG4_UV-VIS_Spectro.pdf [2010, March 1].
- [45] อนุศักดิ์ ศิริคดิธรรม. 2542. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดอิเฟดรีนด้วยหลักการอิมมูโนวิทยา ระหว่างเทคนิคการติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ กับการติดฉลากด้วยอนุภาคโลหะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ. ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [46] วลัยลักษณ์ เมธภัทร. 2548. ผลของเฮเทอโรปีโพลีโคลนอล และโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจสอบแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน และอีเฟดรีนด้วยเมมเบรนอิมมูโนแอสเซย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ. ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [47] Lei, Y., Tsai, Y., Tai, Y., Lin, C., Hsieh, K., Chang, T., Sheu, S. and Kuo, T. 2008. Development and Fast Screening of Salbutamol Residue in Swine Serum by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Taiwan. Agricultural and Food Chemistry. 56: 5494-5499
- [48] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2001. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. [online]. Available from: <http://www.fda.gov> [2008, April 1].

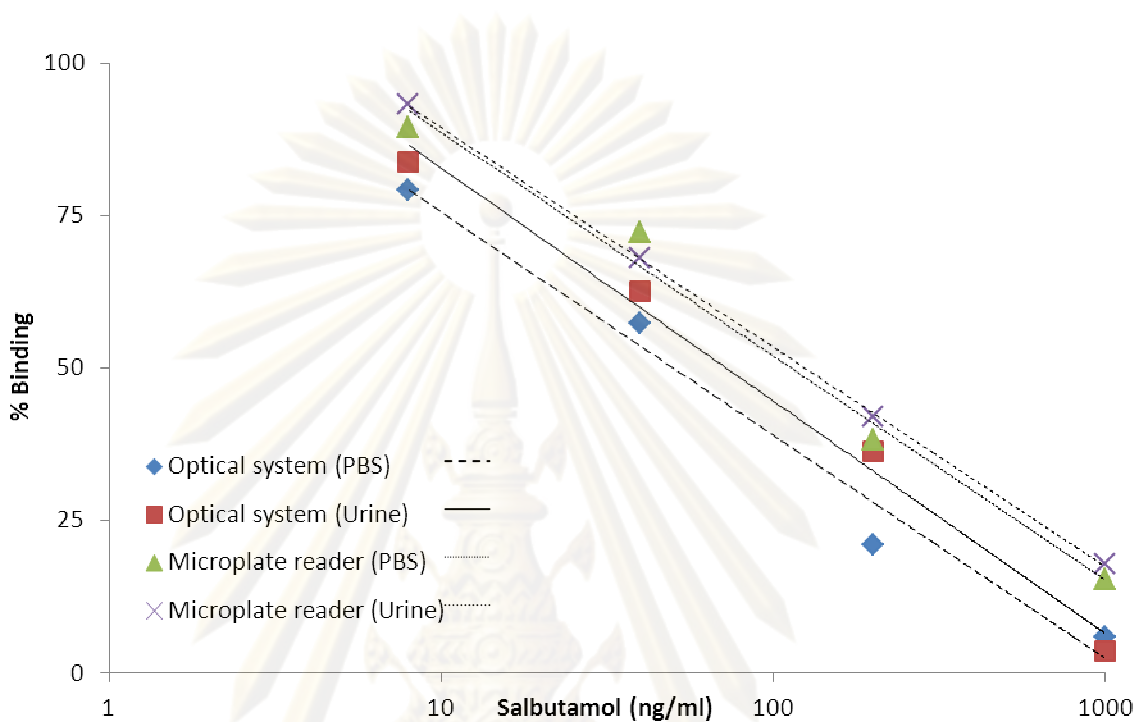
ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก (Appendices)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก การวัดค่าชีวตามอลในสารละลายฟอสเฟตและในปัสสาวะสุกรด้วย
ระบบวัดทางแสงและเครื่องอ่านไมโครเพลต

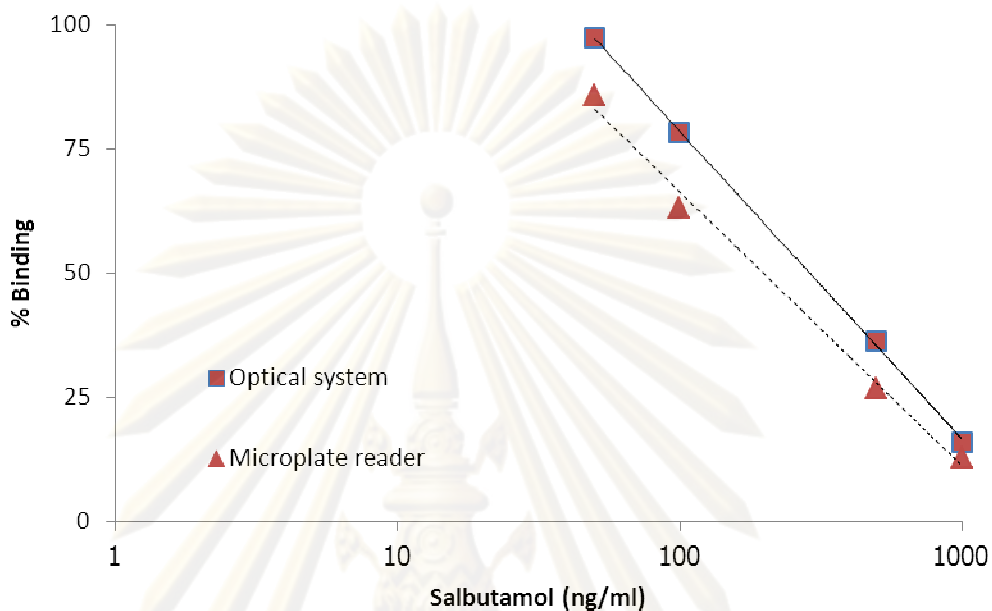


รูปที่ ๑.1. กราฟระหว่างร้อยละของการจับกับความเข้มข้นซัลบูตามอลตัวอย่างใน
ปัสสาวะสุกรและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเข้มข้น 8 - 1000 นาโนกรัมต่อ
มิลลิลิตรของการวัดด้วยด้วยระบบวัดทางแสง และเครื่องอ่านไมโครเพลต

ตารางที่ ๑.1. สมการถดถอยและค่า R^2

ระบบวัด	สารละลาย	สมการถดถอย	R^2
ระบบวัดทางแสง	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	$y = -15.88\ln(x) + 112.17$	0.977
	ปัสสาวะสุกร	$y = -16.56\ln(x) + 120.9$	0.990
เครื่องอ่านไมโครเพลต	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	$y = -15.94\ln(x) + 125.38$	0.986
	ปัสสาวะสุกร	$y = -15.62\ln(x) + 125.41$	0.999

ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานของซัลบิวตามอลในปัสสาวะสุกร ในการวัดด้วย
ระบบวัดทางแสงและเครื่องอ่านไมโครเพลต



รูปที่ ค1. กราฟระหว่างร้อยละของการจับกับความเข้มข้นซัลบิวตามอลตัวอย่างในปัสสาวะสุกร ในช่วงความเข้มข้น 50 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิตรของการวัดด้วยด้วยระบบวัดทางแสง และเครื่องอ่านไมโครเพลต

ตารางที่ ค1. สมการถดถอยและค่า R^2

ระบบวัด	สมการถดถอย	R^2
ระบบวัดทางแสง	$y = -26.9\ln(x) + 16.642$	0.999
เครื่องอ่านไมโครเพลต	$y = -23.948\ln(x) + 11.226$	0.994

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเรวัต รัตนกิจรุ่งเรือง เกิดเมื่อวันที่ 10 ตุลาคม 2525 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี
วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา
2548 และเข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมชีวเวช ภาควิชาวิศวกรรม
ชีวเวช คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2549



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย