

DEVELOPMENT OF PORTABLE SEROTONIN MEASURING SYSTEM

Miss Nisachol Whandee



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ที่ส่งขึ้นเพื่อใช้ในการขอรับปริญญา

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Institutional Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

Faculty of Engineering
Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การพัฒนาเครื่องตรวจวัดปริมาณซีโรโตนินแบบพกพา

นางสาวนิศาชล หวานดี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเครื่องตรวจวัดปริมาณซีโรโตนินแบบพกพา
โดย	นางสาวนิศาชล หวานดี
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิราษฎร์)

นิตาชล หวานดี : การพัฒนาเครื่องตรวจวัดปริมาณซีโรโทนินแบบพกพา (DEVELOPMENT OF PORTABLE SEROTONIN MEASURING SYSTEM) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนา, 98 หน้า.

ซีโรโทนินคือสารสื่อประสาท มีหน้าที่สำคัญในระบบประสาทส่วนกลาง ถ้าระดับของซีโรโทนินในร่างกายไม่สมดุล อาจนำไปสู่ภาวะซึมเศร้า การตรวจวัดระดับซีโรโทนินทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่ยอมรับมากที่สุดคือการตรวจวัดด้วยวิธีเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนแอสเซย์ เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง จึงให้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ แต่มีข้อจำกัดคือมีราคาแพง และทำในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงมีความประสงค์จะพัฒนาเครื่องตรวจวัดระดับซีโรโทนินแบบพกพาโดยเทคนิคสเปกโตรฟลูออโรเมทรี ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้ง่าย ราคาถูกลง และสามารถใช้งานแบบภาคสนามได้ โดยเริ่มจากศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของซีโรโทนินเพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานนำไปสู่การพัฒนาและออกแบบเครื่องตรวจวัดระดับซีโรโทนินด้วยระบบสเปกโตรฟลูออโรเมทรี โดยโครงสร้างของระบบวัดจะประกอบด้วย Cuvette บรรจุสารตัวอย่าง แหล่งกำเนิดแสง โฟโตดีเทคเตอร์ ไมโครคอนโทรลเลอร์ และหน้าจอแสดงผล

เมื่อได้ระบบตรวจวัดแล้ว นำมาทดสอบประสิทธิภาพและการใช้งานที่เหมาะสมของระบบพบว่าเครื่องมือสามารถวัดแบบซีโรโทนินได้ การวัดซ้ำหลายครั้งในวันเดียวมีความแม่นยำสูง (%CV<5) การวัดซ้ำระหว่างมีความแม่นยำน้อยลงตามความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถวัดได้คือ 10^{-5} M (0.01 mmol/L) ซึ่งยังคงไม่สามารถวัดได้ถึงระดับซีโรโทนินในเลือดของร่างกายคนปกติ จึงต้องมีการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดให้มีความไวเพิ่มขึ้นโดยการเพิ่มความเข้มแสงไปกระตุ้นซีโรโทนินให้เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์มากขึ้น อาจทำให้ระบบการวัดมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5570266021 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS: SEROTONIN, 5-HT, SPECTROFLUOROMETRY

NISACHOL WHANDEE: DEVELOPMENT OF PORTABLE SEROTONIN MEASURING SYSTEM. ADVISOR: ASSOC. PROF. MANA SRIYUDTHSAK, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 98 pp.

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a monoamine neurotransmitter that important roles in physiological systems. Imbalance in 5-HT levels may influence to mood, sleep and appetite that lead to depression. Therefore, the measurement of 5-HT levels is necessary. Levels of 5-HT are commonly detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) which is costly and difficult to use, thus we studied an autofluorescence properties of 5-HT for development of portable serotonin measuring system which is low cost, simple to use and for on-site application. Preliminary study of 5-HT was performed in PBS solutions containing serotonin. The device consists of light source, photodetector, microcontroller and display by using UV cuvette micro containing samples.

Efficiency of the system was tested by measuring 5-HT samples. This device was able to detect 5-HT levels and the results were not time-dependent. Within-day measurement could be repeated with high precision (%CV<5).

However, the detection limit of the portable serotonin measuring system by fluorometry was 10^{-5} M (0.01 mmol/L) which is not sensitive enough to detect the 5-HT in blood sample. Thus, enhancing the excitation of the 5-HT by increasing the UV intensity of the light source may result in better efficiency of the device.

Field of Study: Biomedical Engineering

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการทำงานวิจัยและความรู้รอบด้านให้ข้าพเจ้านำไปพัฒนาปรับปรุง รวมถึงคำสอนในการดำเนินชีวิตตลอดจนช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ในงานวิจัย จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ และนางสาววราพร รักชิตะ วัฒนา คณะ

สหเวชศาสตร์ สาขาเทคนิคการแพทย์ ที่เอื้อเพื่อสารซีโรโทนินและอำนวยความสะดวกให้ใช้เครื่อง Spectro-microplate reader สำหรับการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเพื่อสารทริปโตเฟนสำหรับการวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์เดโช ทองอร่าม ภาควิชาวิศวกรรมนิวเคลียร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเพื่อโฟโตดีเทคเตอร์ TCS230 สำหรับการวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล และรองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ที่สละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำปรึกษา

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา เพื่อน พี่ น้องของข้าพเจ้าทุกคนที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำและกำลังใจตลอดการทำวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	11
สารบัญตาราง.....	16
1. บทนำ.....	17
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	17
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
1.3 คำถามงานวิจัย.....	20
1.4 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	20
1.5 สมมติฐานการวิจัย.....	20
2. ความรู้พื้นฐานและหลักการที่เกี่ยวข้อง.....	21
2.1 ซีโรโทนิน.....	21
2.2 วิธีการตรวจวัดซีโรโทนินในปัจจุบัน.....	22
2.2.1 High performance liquid chromatography (HPLC).....	22
2.2.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	23
2.3 สเปกโตรโฟโตเมทรี.....	25
2.3.1 Spectrophotometer.....	25
2.3.2 Fluorometer.....	26
3. การศึกษาคุณสมบัติของสารซีโรโทนินเบื้องต้น.....	28
3.1 แผนผังขั้นตอนดำเนินงานวิจัยโดยสังเขป.....	28

3.2 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี	29
3.3 UV and Fluorescence measurement.....	29
3.3.1 UV measurement.....	29
3.3.2 Fluorescence measurement.....	30
3.4 การแปลผลข้อมูล.....	34
3.5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	53
4. ออกแบบและพัฒนาเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา ด้วยเทคนิค Fluorometry	55
4.1 หลักการทำงานของระบบตรวจวัดซีโรโทนินด้วยเทคนิค Fluorometry.....	55
4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการประกอบเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา	55
4.2.1 แหล่งกำเนิดแสง (Light source)	55
1. หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280.....	56
2. หลอด LED รุ่น M35C1F01Z0	57
4.2.2 โฟโตดีเทคเตอร์ (Photo detector).....	59
1. ET- TCS230	59
2. ML8511 (อุปกรณ์ตรวจวัดความเข้มแสงอุลตราไวโอเลต)	60
4.2.3 ไมโครคอนโทรลเลอร์ (Microcontroller).....	61
4.2.4 หน้าจอ LCD (Liquid Crystal Display).....	62
4.2.5 Cuvette	63
4.3 การประกอบระบบเครื่องตรวจวัด.....	64
4.3.1 วงจรขับหลอด LED	64
4.3.2 วงจรขับ Detector.....	65
1. วงจรขับ TCS230	65
2. วงจรขับ ML8511.....	67

4.4 การเชื่อมต่อ Arduino กับอุปกรณ์ต่างๆ	68
4.4.1 การเชื่อมต่อ Arduino กับหลอด LED	68
4.4.2 การเชื่อมต่อ Arduino กับ TCS230	68
4.4.3 การเชื่อมต่อ Arduino กับหน้าจอ LCD	69
4.4.4 การเชื่อมต่อ Arduino กับ ML8511	69
4.5 การสร้างกล่องเครื่องมือ	70
5. การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา ด้วยเทคนิค Fluorometry	72
5.1 ทดสอบการทำงานของระบบตรวจวัดซีโรโทนิน	72
5.1.1 ให้ Detector เป็น ML8511	72
5.1.2 ให้ Detector เป็น TCS230	72
5.2 ทดสอบประสิทธิภาพและการทำงานที่เหมาะสมของระบบเครื่องวัดซีโรโทนินแบบพกพา	73
5.3 ผลการทดสอบการทำงานของระบบตรวจวัดซีโรโทนิน	74
5.3.1 ผลการใช้ ML8511 เป็น Detector	74
5.3.2 ผลการใช้ Detector เป็นโฟโตดีเทคเตอร์ TCS230	75
5.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพและการทำงานที่เหมาะสมของระบบเครื่องวัดซีโรโทนินแบบ พกพา	77
5.4.1 ผลการเปรียบเทียบขั้นตอนในการวัด	77
5.4.2 ผลการเปรียบเทียบความต่อเนื่องในการวัด	78
5.4.3 ผลการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการวัด	79
5.4.4 ผลการเปรียบเทียบชนิดของ Cuvette ที่ใช้ในการวัดสารตัวอย่าง	83
5.4.5 ผลการทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือ	86
5.4.6 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection)	88

5.5 สรุปผลการทดลอง	89
6. ข้อสรุปงานวิจัย.....	91
6.1 การศึกษาคุณสมบัติทางแสงของซีโรโทนิน	91
6.2 การศึกษาเบื้องต้นซีโรโทนินด้วยเทคนิค Fluorometry	91
6.3 เครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา.....	91
6.4 ข้อเสนอแนะ	92
รายการอ้างอิง	93
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	98



สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์ซีโรโทนิน	21
รูปที่ 2.2 การทำงานของเครื่อง HPLC.....	23
รูปที่ 2.3 หลักการและขั้นตอนการทำ ELISA	24
รูปที่ 2.4 ความเข้มแสงก่อนหลังผ่านสารตัวอย่าง	25
รูปที่ 2.5 ภาพระยะทางที่แสงผ่านมีผลกับความทึบแสง	26
รูปที่ 2.6 การเปล่งแสงเนื่องจากการเปลี่ยนระดับพลังงานของอะตอม	27
รูปที่ 3.1 Dilution of serotonin in PBS solution	30
รูปที่ 3.2 การเตรียมสารละลายซีโรโทนิน สำหรับการทดลองศึกษาผลของปริมาณสารละลายที่มีต่อการวัดฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีโรโทนิน	31
รูปที่ 3.3 การเตรียมสารละลายซีโรโทนิน สำหรับการทดลองศึกษาผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายซีโรโทนินที่มีต่อการวัดฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีโรโทนิน.....	32
รูปที่ 3.4 การเตรียมสารละลายซีโรโทนินและสารรบกวนสำหรับการทดลองศึกษาผลของเวลาที่มีต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีโรโทนินและศึกษาสารรบกวนอื่นของซีโรโทนิน	33
รูปที่ 3.5 กราฟที่ได้จากการ scan UV Spectrum ของสารละลาย Serotonin ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M และ 10^{-3} M.....	34
รูปที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับค่า Absorbance ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M - 10^{-3} M	35
รูปที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับค่า Absorbance ที่ความเข้มข้น 0.1 – 1.0 mM.....	35
รูปที่ 3.8 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ความเข้มข้น 10^{-6} M ปริมาตร 90 μ l, 135 μ l, 180 μ l และ 225 μ l.....	36
รูปที่ 3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์และปริมาณสารละลายซีโรโทนิน ความเข้มข้น 10^{-6} M ที่ปริมาตร 90, 135, 180 และ 225 μ l	37

รูปที่ 3.10 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนิน กำหนดค่า excitation ที่ 250, 280, 336 และ 366 nm และ Emission range 300-600 nm.....	38
รูปที่ 3.11 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ชาโลน ที่ความเข้มข้น 0.1 M.....	39
รูปที่ 3.12 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ชาโลน ที่ความเข้มข้น 0.05 M.....	40
รูปที่ 3.13 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ชาโลน ที่ความเข้มข้น 0.01 M.....	41
รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและค่าความแสง ฟลูออเรสเซนซ์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน ที่ความเข้มข้น 0.01 M 0.05 M และ 0.1 M.....	42
รูปที่ 3.15 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของ สารละลาย serotonin ใน PBS ที่ความเข้มข้น 0.01 M 0.05 M และ 0.1 M.....	43
รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการวัดสารละลาย serotonin ใน 0.01 M PBS กับ ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์.....	44
รูปที่ 3.17 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการวัดสารละลาย serotonin ใน 0.01 M PBS กับ ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์.....	45
รูปที่ 3.18 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายทริปโตเฟน.....	48
รูปที่ 3.19 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายโดปามีน.....	49
รูปที่ 3.20 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายแอสคอร์บิก เอซิด.....	50
รูปที่ 3.21 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซีโรโทนินและสารรบกวน กับค่าความเข้มแสง ฟลูออเรสเซนซ์.....	51
รูปที่ 3.22 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum เปรียบเทียบ emission peak ของ สารละลาย serotonin, tryptophan, dopamine และ ascorbic acid.....	52
รูปที่ 4.1 ระบบตรวจวัดซีโรโทนินด้วยเทคนิค Fluorometry.....	55
รูปที่ 4.2 ภาพหลอด LED 280 nm รุ่น HH-5050SMD-280.....	56

รูปที่ 4.3 Outline Dimensions.....	56
รูปที่ 4.4 Optical Characteristics	57
รูปที่ 4.5 ภาพหลอด LED 280 nm รุ่น Deep UV LED M35C1F01Z0.....	57
รูปที่ 4.6 Outline Dimensions.....	58
รูปที่ 4.7 Relative Spectrum Power Distribution	58
รูปที่ 4.8 ภาพ Top view ของเซนเซอร์ TCS230.....	59
รูปที่ 4.9 ภาพบล็อกไดอะแกรมการทำงานของเซนเซอร์ TCS230	60
รูปที่ 4.10 ภาพ UV sensor (ML8511).....	60
รูปที่ 4.11 Spectral responsivity characteristics ของ ML8511	61
รูปที่ 4.12 Arduino Uno R3	61
รูปที่ 4.13 ภาพจอ LCD ขนาด 16 ตัวอักษร จำนวน 2 บรรทัด.....	62
รูปที่ 4.14 ภาพขนาดของ UV-Cuvette micro.....	63
รูปที่ 4.15 Transmission curves of different cuvettes	63
รูปที่ 4.16 วงจรขับหลอด LED.....	64
รูปที่ 4.17 วงจรแผ่นปริ้นส์ PCB แสดงการเชื่อมต่อหลอด LED	65
รูปที่ 4.18 ภาพขาสัญญาณต่างๆ ของ TCS230	65
รูปที่ 4.19 วงจรแผ่นปริ้นส์ PCB แสดงการเชื่อมต่อ TCS230	66
รูปที่ 4.20 วงจร TCS230.....	66
รูปที่ 4.21 ภาพขาสัญญาณต่างๆ ของ ML8511	67
รูปที่ 4.22 ภาพการเชื่อมต่อ Arduino กับอุปกรณ์ต่างๆ.....	68
รูปที่ 4.23 ภาพแบบร่างกล่องเครื่องมือวัดซีโรโทนิน	70
รูปที่ 4.24 ภาพเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา	71

รูปที่ 5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและ Δf (Hz) โดยใช้ Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 หลอด LED รุ่น LED M35C1F01Z0 และใช้สองหลอดร่วมกัน	75
รูปที่ 5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและ Δf (Hz) โดยใช้ Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอด เทียบกับการใช้หลอด LED 2 รุ่น	76
รูปที่ 5.3 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและ Δf (Hz) โดยเปรียบเทียบการวัดเริ่มต้นจากความเข้มต่ำไปสูงและความเข้มข้นสูงไปต่ำ	77
รูปที่ 5.3 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดจากความเข้มข้นสูงไปต่ำและวัดจากความเข้มข้นต่ำไปสูง	77
รูปที่ 5.4 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและ Δf (Hz) โดยเปรียบเทียบการวัดค่าแบบต่อเนื่องและปิด-เปิดเครื่องใหม่ในแต่ละรอบของการวัด	78
รูปที่ 5.4 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดแบบต่อเนื่อง 15 นาที กับวัดแบบเปิดปิดเครื่องในแต่ละรอบการวัด	78
รูปที่ 5.5 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการวัดสารตัวอย่างและ Δf (Hz) ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-3} M	79
รูปที่ 5.5 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการวัดเริ่มต้นที่ 0 นาทีและวัดที่ 10,15,20 และ 25 นาที	80
รูปที่ 5.6 ผลการวัดค่าความถี่ของ TCS230 เมื่อปิดหลอด LED 30 นาที	80
รูปที่ 5.7 ผลการทดสอบการให้แสงกระตุ้นของหลอด LED เป็นเวลา 30 นาที	81
รูปที่ 5.8 ผลการทดลองเวลาที่ใช้ในการวัดจากเครื่อง Spectro-microplate reader	82
รูปที่ 5.9 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับ Δf (Hz) ที่ได้จากการใช้ UV cuvette micro บรรจุสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบระหว่างการให้ด้านใส่ติด Detector กับให้ด้านหยาบติด Detector	83
รูปที่ 5.9 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการใช้ cuvette ด้านใสและด้านหยาบติด detector	84
รูปที่ 5.10 การกระเจิงแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อผ่านด้านหยาบกับด้านใสของ cuvette	84

รูปที่ 5.11 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับ Δf (Hz) ที่ได้จากการใช้ UV quartz และ UV cuvette micro ในการบรรจุสารตัวอย่าง.....	85
รูปที่ 5.11 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ Quartz และ UV micro cuvette บรรจุสารในการวัด	86
รูปที่ 5.12 %CV ที่ได้จากการทดสอบวัดสารซีโรโทนินซ้ำจำนวน 10 ครั้งในวันเดียวกัน ณ ความเข้มข้น $10^{-5} - 10^{-2}$ M	86
รูปที่ 5.13 %CV ที่ได้จากการทดสอบวัดสารซีโรโทนินซ้ำระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน ณ ความเข้มข้น $10^{-5} - 10^{-2}$ M.....	87



สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จากผลการทดลองวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ณ ความเข้มข้นของซีโรโทนิน 10^{-4} M เมื่อวัดทุกๆ 30 นาทีไปจนถึง 120 นาที.....	46
ตารางที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จากผลการทดลองวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน 10^{-5} M เมื่อวัดทุกๆ 30 นาทีไปจนถึง 120 นาที	47
ตารางที่ 4.1 การเชื่อมต่อ Arduino กับหน้าจอสแสดงผล LCD 12C	69
ตารางที่ 4.2 การเชื่อมต่อ Arduino กับ ML8511.....	70
ตารางที่ 5.1 Output ที่ได้จากการใช้ ML8511 เป็น detector โดยแบ่งชนิดของ Light source ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ UV จากแสงแดด, LED รุ่น HH-5050SMD-280 และ LED รุ่น M35C1F01Z0.....	74
ตารางที่ 5.2 ข้อมูลค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าการกระจายของข้อมูล (SD) ที่ได้จากการวัดสารซีโรโทนินซ้ำเป็นเวลา 3 วัน	87
ตารางที่ 5.3 ข้อมูลค่าเฉลี่ย(Mean) และค่าการกระจายของข้อมูล (SD) ที่ได้จากการวัดสาร	88

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบัน การตรวจวัดระดับสารชีวโมเลกุล (Biomolecule) เพื่อหาความผิดปกติในร่างกายมนุษย์นั้น มีความสำคัญต่อคุณภาพชีวิตของคนเราเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะผู้ป่วยซึ่งต้องได้รับการดูแลอย่างใกล้ชิด เนื่องจากความไม่สมดุลของระดับสารชีวโมเลกุลในร่างกายที่อาจจะมีมากเกินไป น้อยเกินไป หรือไม่มีปรากฏเลย สาเหตุมักเกิดจากอวัยวะที่ทำหน้าที่ผลิต สังเคราะห์ หรือควบคุมการหลั่งสารชีวโมเลกุลนั้นมีความบกพร่อง ทำงานได้ไม่เต็มที่หรือทำงานมากเกินไป ส่งผลต่อการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกายที่เกี่ยวข้อง เป็นเหตุให้เกิดของโรคภัยไข้เจ็บตามมา หากความผิดปกติที่รุนแรงอาจทำให้คนไข้เสียชีวิตในที่สุด ดังนั้น การพัฒนาเครื่องมือตรวจวัดระดับของสารชีวโมเลกุลให้มีประสิทธิภาพ จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในวงการแพทย์ปัจจุบัน ซึ่งจะช่วยให้สามารถวินิจฉัยและบ่งชี้โรคที่เกิดกับผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ทำให้เพิ่มคุณภาพชีวิตและลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้มากขึ้น

โรคซึมเศร้า (Depression) คือ อาการป่วยทั้งทางด้านอารมณ์ ความรู้สึกนึกคิด พฤติกรรม ร่วมกับอาการทางร่างกาย ส่งผลกระทบต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย เป็นปัญหาสาธารณสุขสุที่ทวีความรุนแรงมากขึ้นเป็นลำดับ ในประเทศไทย ปี 2558 (นับถึงวันที่ 19 มิถุนายน พ.ศ. 2558) มีผู้ป่วยโรคซึมเศร้าเข้ารับการรักษา 55,814 คน และคาดการณ์ว่ายังมีผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาอีก 866,112 คนทั่วประเทศ สาเหตุของโรคซึมเศร้า เชื่อกันว่าเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน ได้แก่ ทางด้านกรรมพันธุ์ สภาพจิตใจ สังคมรอบด้าน และปัญหาทางด้านร่างกายคือการเปลี่ยนแปลงระดับสารเคมีในสมอง (กรมสุขภาพจิต, กระทรวงสาธารณสุข) โดยมีงานวิจัยจำนวนมากมุ่งความสนใจไปที่การเปลี่ยนแปลงระดับของสารซีโรโทนินว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้า (Ardesheer และคณะ, 2015 และ Ze Gao และคณะ, 2014)

ซีโรโทนิน (5-Hydroxytryptamine, Serotonin, 5-HT) เป็นสารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนและสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine neurotransmitter) สังเคราะห์จากทริปโตเฟน (tryptophan) (Mohammad-Zadeh และคณะ, 2008) ที่เป็นกรดอะมิโนจำเป็นต่อร่างกาย โดยเซลล์เอ็นเทอโรโครมาฟฟิน (enterochromaffin cell) ในระบบทางเดินอาหาร มีการสร้างมากถึง 80% ของการสร้างซีโรโทนินในร่างกายทั้งหมด ส่วนที่เหลือถูกสร้างมาจากเซลล์ซีโรโตเนอจิก นิวรอน (serotonergic neurons) ในระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากนี้ยังพบซีโรโทนินในธรรมชาติ ได้แก่ ผัก ผลไม้ และถั่วอีกด้วย (Kema และคณะ, 2000) บทบาทหน้าที่ของซีโรโทนินพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับหลายระบบของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบประสาท โดยมีหน้าที่

เกี่ยวข้องกับการควบคุมความอยากอาหาร (appetite) อารมณ์ (mood) ความวิตกกังวล (anxiety) ซึ่งถ้าหากระดับของซีโรโทนินในร่างกายอยู่ในภาวะไม่สมดุล อาจนำไปสู่อาการของโรคซึมเศร้า (depression) และโรคจิตเภทอื่นๆ (schizophrenia) (Kema และคณะ, 2000) ดังนั้นการตรวจวัดระดับของซีโรโทนินในร่างกายจึงมีความสำคัญ ถ้าตรวจพบว่ามีความผิดปกติของระดับซีโรโทนินในร่างกายก็จะสามารถรับการรักษาได้ทันที่

การตรวจวัดระดับซีโรโทนินในปัจจุบันนิยมตรวจวัดด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิขวิด โครมาโตกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) และวิธีเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนแอสเซย์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดที่ให้ผลน่าเชื่อถือ แต่มีราคาแพงและมีขั้นตอนที่ซับซ้อน จึงต้องทำโดยผู้เชี่ยวชาญในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความประสงค์จะพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดระดับซีโรโทนินแบบพกพา ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้ง่าย ราคาถูกลง และสามารถนำเครื่องมือนี้ออกนอกสนามไปตรวจในพื้นที่ห่างไกลในสถานพยาบาลขนาดเล็ก เพื่อสามารถตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคซึมเศร้าที่มีสาเหตุมาจากการขาดซีโรโทนินในเบื้องต้นได้

นอกจากการใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขแล้ว เครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพาอาจประยุกต์ใช้งานทางด้านสัตวศาสตร์ โดยมีงานวิจัยศึกษาการฉีดซีโรโทนินให้กับแม่พันธุ์กึ่งก้ามกรามและกึ่งกุลาดำ พบว่ามีผลทำให้รังไข่พัฒนาเร็วขึ้นและเซลล์ไข่ก็เพิ่มปริมาณและคุณภาพอีกด้วย (Siangcham, 2013) ซึ่งถ้าสามารถประดิษฐ์เครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพาเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้ในงานภาคสนามสำหรับตรวจหาปริมาณซีโรโทนินในกึ่ง ก็จะสามารถติดตามการเจริญเติบโตของกึ่งได้ เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

โดยวิทยานิพนธ์นี้มุ่งศึกษาคุณสมบัติที่น่าสนใจอย่างหนึ่งของซีโรโทนินนั่นคือ เมื่อถูกกระตุ้นอย่างเหมาะสมซีโรโทนินจะสามารถเรืองแสงได้ตามธรรมชาติ (auto-fluorescence) (Crespi และคณะ, 2004) ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยระบบทางแสงสเปกโตรฟลูออโรเมทรี (Spectrofluorometry) อันจะเป็นความรู้พื้นฐานในการพัฒนาระบบตรวจวัดซีโรโทนินด้วยระบบทางแสงและเป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจวัดระดับซีโรโทนินต่อไป

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวัดระดับซีโรโทนินด้วยระบบสเปกโตรโฟโตเมทรี เป็นการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสารในช่วงความยาวคลื่นอัลตราไวโอเล็ตและช่วงความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) หรือวัดการเปล่งแสงของสารเมื่อถูกกระตุ้น

ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Spectrofluorometer) มีรายงานการศึกษาพบว่าสามารถใช้เทคนิคดังกล่าวตรวจวัดระดับซีโรโทนินได้โดยตรงจากภายในร่างกาย (Crespi และคณะ, 2004) โดยทำการทดลองแบ่งกลุ่มตัวอย่างหนูทดลองเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดผลิตซีโรโทนิน (treated to affect endogenous 5-HT levels) กับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นนำชิ้นส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus sections) จากสมองของหนูซึ่งเป็นบริเวณที่อุดมไปด้วยซีโรโทนินมาบดจนเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenate) มาวัดด้วยเทคนิคการตรวจวัดทางแสงสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์โดยทำการกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่น 366 nm และทำการวัดที่ความยาวคลื่น 400-550 nm พบว่าเป็นเทคนิคการตรวจวัดที่สามารถตรวจระดับสารสื่อประสาทได้โดยตรง แต่ยังเป็น การทดลองแบบที่ต้องนำอวัยวะในร่างกายของสัตว์ทดลองออกมาวัดในหลอดทดลอง (ex vivo) และเป็นแบบที่ต้องนำเครื่องมือสอดเข้าไปในร่างกาย (in vivo) ซึ่งค่อนข้างมีความเสี่ยงและเพิ่มความเครียดให้กับผู้ป่วยถ้าหากจะนำมาใช้ในการตรวจวัดกับคนไข้ในการรักษาจริง

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาพบว่า มีการนำเทคนิคการตรวจวัดด้วยระบบสเปกโตรฟลูออโรเมทรีมาตรวจวัดหาระดับสารสื่อประสาทในสมองรวมทั้งซีโรโทนินอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การตรวจวัดสารสื่อประสาทในสมองของหนู ในเลือดและปัสสาวะของคนด้วยเครื่องมือลิขวิด โครมาโตกราฟีค ฟลูออโรเมทริกซ์ซิสเต็ม (liquid chromatographic-fluorometric systems, LC-F) (Anderson และคณะ, 1981) โดยใช้เวลาในการวัด 5-20 นาที โดยกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่น 270-280 nm และทำการวัดที่ความยาวคลื่น 360 nm อย่างไรก็ตามระบบลิขวิด โครมาโตกราฟีค (liquid chromatographic methods) เป็นระบบตรวจวัดที่ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงและมีขั้นตอนยุ่งยากในการเตรียมการ

ต่อมา De Benedetto และคณะได้พัฒนาเครื่องตรวจวัดสารสื่อประสาทในสมองรวมทั้งซีโรโทนิน ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography ด้วยเทคนิคฟลูออโรเมทริก (Fluorimetric) โดยใช้ตัวอย่างคือเนื้อสมองส่วนสเตรตัม (striatum) ของหนูทดลองบดละเอียดและวัดฟลูออเรสเซนซ์โดยตรง โดยทำการกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่น 279 nm และทำการวัดที่ความยาวคลื่น 340 nm เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถแยกสารสื่อประสาทแต่ละชนิดออกมาได้ภายในเวลา 15 นาที และลดขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่างลง ทว่าเป็นการวัดในตัวอย่างเป็นของสัตว์ทดลองเท่านั้น (De Benedetto และคณะ, 2014) นอกจากนี้มีรายงานที่มีการนำเทคนิคการตรวจวัดทางแสงมาใช้ คือการทดลองตรวจวัดการทำงานของซีโรโทนินทรานสปอร์ตเตอร์ (serotonin transporter, SERT) ในเซลล์ LAN-5 cell line หลังจากได้รับการเลี้ยงด้วยสารสกัดจากใบชี้เหล็กบ้าน (*Senna simea* Lam. leaf) เพื่อดูว่าสารสกัดของใบชี้เหล็กบ้านมีผลต่อการทำงานของ SERT หรือไม่ อย่างไร (Thanesphatisuk และคณะ, 2013) การศึกษานี้เป็นการตรวจวัดร่วมกับสารประกอบอื่น และไม่ใช่วิธีการตรวจวัดระดับซีโรโทนินโดยตรง

1.3 คำถามงานวิจัย

สามารถพัฒนาระบบตรวจวัดซีโรโทนินโดยอาศัยองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสง (Absorbance) และการเปล่งแสง (Fluorescence) ของซีโรโทนินได้หรือไม่

1.4 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อออกแบบและพัฒนาเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพาด้วยระบบทางแสง

1.5 สมมติฐานการวิจัย

สารละลายซีโรโทนินสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา

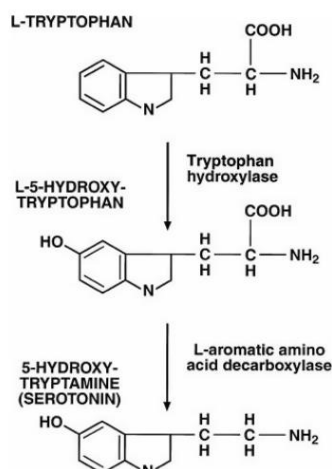


2. ความรู้พื้นฐานและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ซีโรโทนิน

ซีโรโทนิน (5-Hydroxytryptamine, Serotonin, 5-HT หรือ 3-(2-aminoethyl)indol-5-ol) เป็นสารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นฮอโมนและสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine neurotransmitter) และเป็นสารประกอบอินโดลิก (indolic compound) สังเคราะห์จากทริปโตเฟน (tryptophan) (Mohammad-Zadeh และคณะ, 2008) ที่เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยเซลล์เอ็นเทอโรโครมาฟฟิน (enterochromaffin cell) มีรายงานว่าในระบบทางเดินอาหาร มีการสร้างมากถึง 80% ของการสร้างซีโรโทนินในร่างกายทั้งหมด ส่วนที่เหลือถูกสร้างมาจากเซลล์ซีโรโทนอร์จิก นิวรอน (serotonergic neurons) ในระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากนี้ยังพบซีโรโทนินในธรรมชาติ ได้แก่ ผัก ผลไม้ และถั่วอีกด้วย (Kema และคณะ, 2000)

การสังเคราะห์ซีโรโทนินเริ่มจากปฏิกิริยาการเติมหมู่ -OH เข้าไปในโมเลกุลของสารตั้งต้นทริปโตเฟน (Hydroxylation) โดยใช้เอนไซม์ทริปโตเฟนไฮดรอกซีเลส (tryptophan hydroxylase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ผลผลิตเป็นไฮดรอกซีทริปโตเฟน (5-hydroxytryptophan, 5-HTP) จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากโมเลกุล (decarboxylation) ของ 5-HTP โดยใช้เอนไซม์แอล อะโรมาติก อะมิโนเอซิด ดีคาร์บอกซีเลส (L-aromatic amino acid decarboxylase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีไพริดอกซอล ฟอสเฟต (pyridoxol-5-phosphate) เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์ซีโรโทนิน (Gwaltney-Brant และคณะ, 2000)

บทบาทหน้าที่ของซีโรโทนินนั้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับหลายระบบของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบประสาท โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความอยากอาหาร (appetite) อารมณ์ (mood) ความวิตกกังวล (anxiety) ซึ่งถ้าหากระดับของซีโรโทนินในร่างกายอยู่ในภาวะไม่สมดุลมากเกินไป อาจนำไปสู่อาการของโรคซึมเศร้า (depression) และโรคจิตเภทอื่นๆ (schizophrenia)

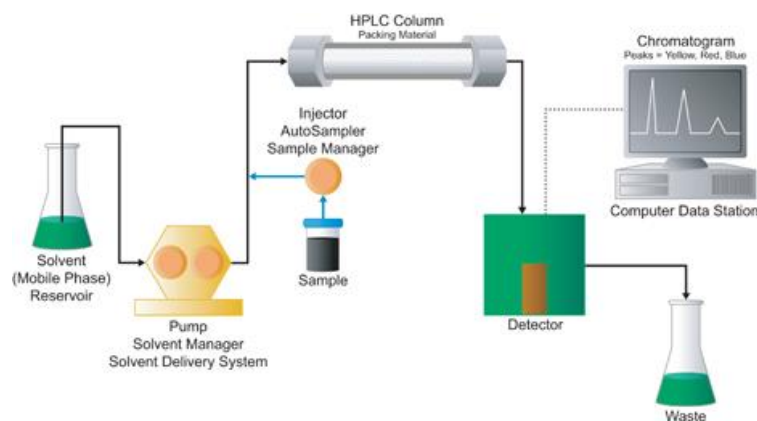
คุณสมบัติที่น่าสนใจอย่างหนึ่งของซีโรโทนินคือเป็นเอนโดจีเนียส ฟลูออโรฟออร์ (endogenous fluorophore) เมื่อถูกกระตุ้นอย่างเหมาะสมด้วยแสง โดยจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 290 nm และสามารถเรืองแสงได้ (auto-fluorescence) โดยจะเรืองแสงที่มีความยาวคลื่น 340 nm (Udenfriend, 1962)

สารรบกวนในการวัดซีโรโทนินได้แก่ทริปโตเฟน โดปามีนและกรดแอสคอร์บิก เอซิด เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นอะโรมาติกเช่นเดียวกับซีโรโทนิน และทริปโตเฟนและโดปามีนยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทเช่นเดียวกับซีโรโทนินอีกด้วย

2.2 วิธีการตรวจวัดซีโรโทนินในปัจจุบัน

2.2.1 High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ โดยทำการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารประกอบอื่นๆ ในตัวอย่าง โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบบนเฟสคงที่ (Stationary phase) ที่อยู่ในคอลัมน์ (Column) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) โดยสารตัวอย่างจะไหลลงไปในคอลัมน์และเคลื่อนผ่านได้โดยสารที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำลาย ถ้าสารประกอบใดเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่ก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสคงที่ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง ซึ่งสารประกอบที่แยกออกมาจะถูกตรวจวัดด้วย Detector และแปลผลออกมาเป็นโครมาโตแกรม (Chromatogram)

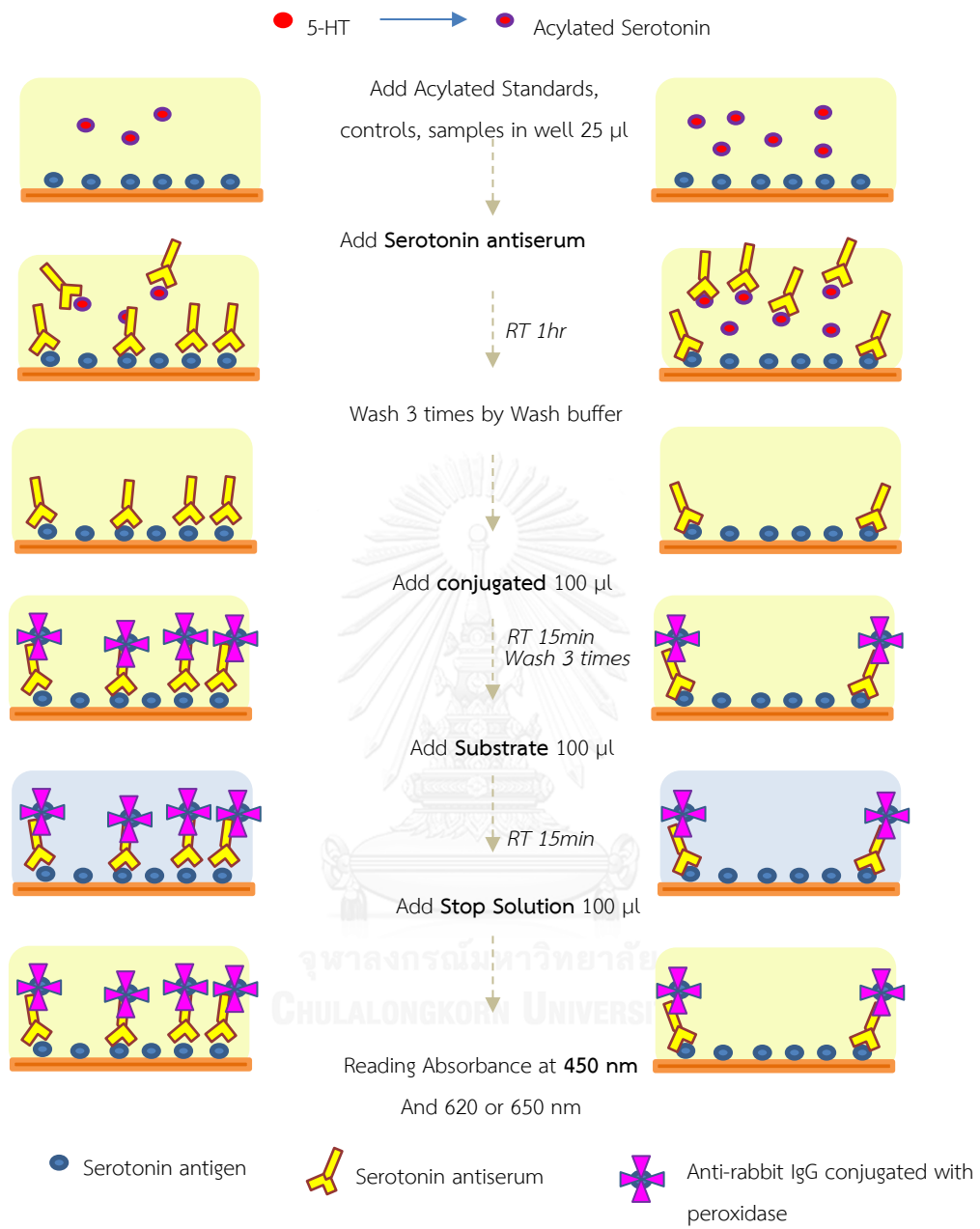


รูปที่ 2.2 การทำงานของเครื่อง HPLC (Waters, 2015)

2.2.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

หลักการของ Competitive ELISA

รูปที่ 2.3 อธิบายหลักการและขั้นตอนการทำ ELISA ซึ่งเป็นวิธีตรวจวัดปริมาณซีโรโทนินในเลือด ปัสสาวะและเกล็ดเลือด ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ได้ถึง 5 ng/ml โดยในขั้นตอนการเตรียมสาร ซีโรโทนินในสารตัวอย่างจะถูกเติมหมู่ acyl group เป็น N-acylserotonin เพื่อให้สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ดีขึ้น และใน Competitive ELISA kit นี้จะใช้ไมโครไทเทอร์เพลท (microtiter plate) ที่มี Antigen ติดแน่นที่ผิวของแต่ละหลุม และเมื่อเติมสารตัวอย่างซึ่งมี N-acylserotonin ลงไป Antigen ที่ติดบนผิวเพลทกับ N-acylserotonin จะเกิดการแย่งกันจับกับ Serotonin antiserum ที่จำกัดจำนวน binding sites ไว้แล้ว หลังจากทีระบบอยู่ในสภาวะสมดุล Free antigen กับ Free antigen-antiserum จะถูกล้างออกไป จากนั้นเติม Conjugate หรือ Anti-rabbit IgG ที่จับกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ลงไปในแต่ละหลุมให้ Anti-rabbit IgG-peroxidase conjugated จับกับ antigen-antiserum ที่ติดแน่นบนผิวเพลท เมื่อล้างส่วนเกินออกไป ก็ใส่ Substrate (Tetramethylbenzidine, TMB) ลงไป ซึ่ง TMB จะถูกออกซิไดซ์ (Oxidized) ในกระบวนการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กลายเป็นน้ำด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารละลาย โดย oxidized TMB จะเป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้มและดูดกลืนแสงได้ในช่วง 620-650 nm และเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วย Stop solution (0.25 M H₂SO₄) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 450 nm ดังนั้นในการวัดค่า OD จะต้องวัดที่ความยาวคลื่น 620 หรือ 650 nm ควบคู่ไปด้วยเพื่อเป็น Reference wavelength ทดสอบดูว่าสารละลายหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดได้หมดหรือไม่ (IBL-America, 2011)



รูปที่ 2.3 หลักการและขั้นตอนการทำ ELISA

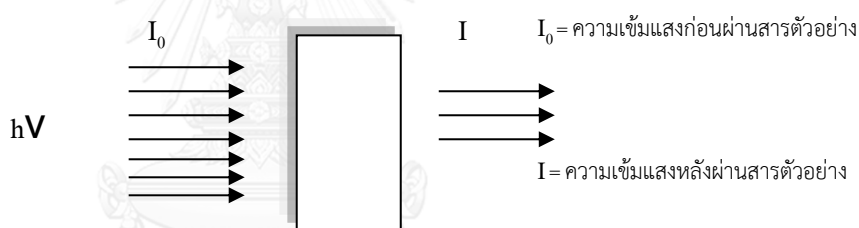
2.3 สเปกโตรโฟโตเมทรี

การตรวจวัดระดับซีโรโพรตีนด้วยระบบสเปกโตรโฟโตเมทรี เป็นการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสารในช่วงความยาวคลื่นอุลตราไวโอเล็ตและช่วงความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) หรือวัดการเปล่งแสงของสารเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Spectrofluorometer)

2.3.1 Spectrophotometer

เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณความเข้มข้นของสารต่างๆ โดยใช้หลักการการดูดกลืนแสง (absorption) ของสารตัวอย่าง โดยสารหนึ่งๆ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ จึงสามารถนำหลักการนี้มาใช้วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารได้

การดูดกลืนแสง (absorbance) เกิดขึ้นเมื่อแสงตกกระทบวัตถุใดๆ (incident light) แล้วจะเกิดการดูดกลืนแสง (absorbed light) และการผ่านของแสง (transmitted light) ทำให้ความเข้มแสงก่อนและหลังผ่านสารตัวอย่างมีค่าไม่เท่ากันดังรูปที่ 2.4

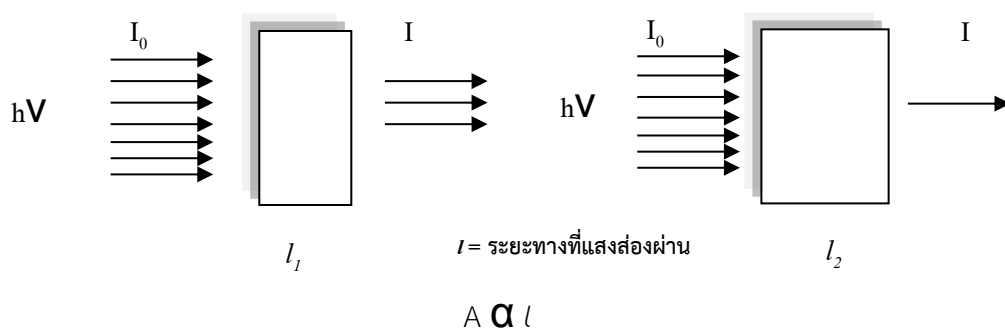


รูปที่ 2.4 ความเข้มแสงก่อนหลังผ่านสารตัวอย่าง

จากรูปจะได้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance หรือ optical density [O.D.]) = $\ln \frac{I_0}{I}$ (2.1)

Absorbance เป็น 0 เมื่อไม่มีการดูดกลืนแสง ($I = I_0$)

Absorbance > 0 เมื่อมีการดูดกลืนแสง ($I < I_0$) กล่าวคือความเข้มแสงก่อนผ่านสารตัวอย่างมีค่ามากกว่าความเข้มแสงหลังผ่านสารตัวอย่าง นอกจากนี้ ระยะทางที่แสงผ่านก็มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง โดยระยะทางที่แสงส่องผ่านน้อย ความเข้มแสงหลังผ่านสารละลายก็จะมีค่ามากกว่าระยะทางที่แสงผ่านมากๆ ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงจึงแปรผันตรงกับระยะทางที่แสงผ่าน ($A \propto l$) ดังรูป



รูปที่ 2.5 ภาพระยะทางที่แสงส่องผ่านมีผลกับความทึบแสง

นอกจากระยะทางที่แสงส่องผ่านแล้ว ความเข้มข้นของสารตัวอย่างก็มีความสัมพันธ์ชนิดแปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกัน ($A \propto C$) ซึ่งเป็นไปตามกฎของ **Lambert-Beer's law** ตามสมการที่ 2.2

$$A = \epsilon l C \quad (2.2)$$

โดยกำหนดให้

A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance หรือ optical density, O.D.)

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (extinction coefficient) [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

l = ระยะทางที่แสงส่องผ่านสารละลาย [cm]

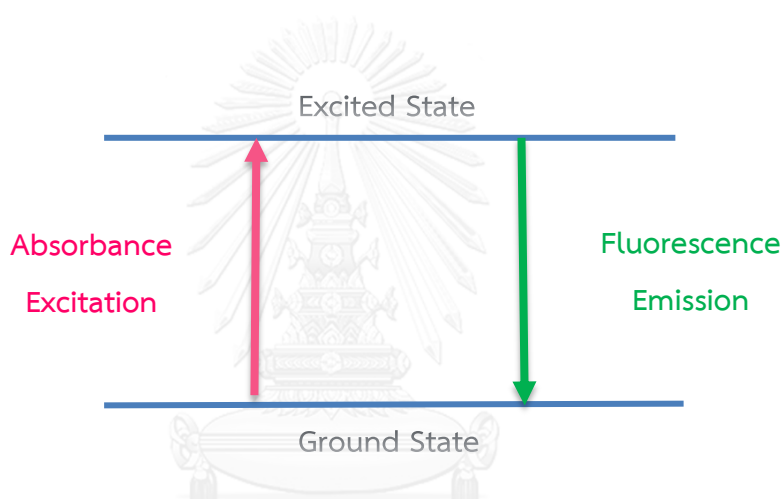
C = ความเข้มข้นของสารละลาย [mole]

ในการทดลอง เราสามารถกำหนดให้ระยะทางที่แสงส่องผ่านสารตัวอย่างมีค่าคงที่ ดังนั้นค่าการดูดกลืนจึงเท่ากับผลคูณของค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย ดังนั้น เราจึงสามารถนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้จากค่าการดูดกลืนแสง

2.3.2 Fluorometer

การวัดปริมาณสารโดยการวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์มีใช้อย่างแพร่หลายในวงการแพทย์และด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง เนื่องจากสารประกอบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence compound) มีการเปล่งแสงในช่วงความถี่ที่แตกต่างกันไปโดยสารแต่ละตัว จึงสามารถนำลักษณะจำเพาะดังกล่าวมาใช้จำแนกหาชนิดของสารตัวอย่างได้

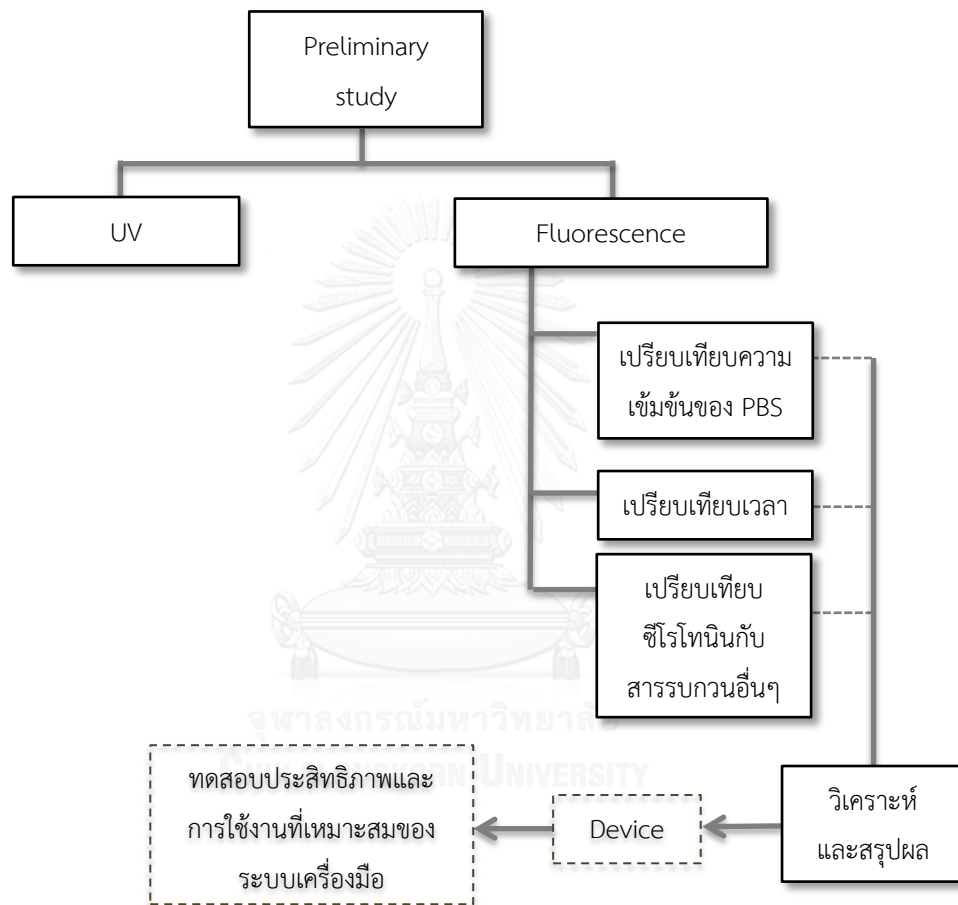
โมเลกุลของสารที่อยู่ในสภาวะปกติจะมีการจัดเรียงอิเล็กตรอนอยู่ในสถานะพื้น (ground state) เมื่อโมเลกุลได้รับพลังงานจากแสงที่มีมากระตุ้น (Excitation energy) จะทำให้อิเล็กตรอนมีพลังงานสูงขึ้น อิเล็กตรอนเหล่านี้จะเปลี่ยนไปอยู่ที่ชั้นระดับพลังงานที่สูงขึ้น ตามระดับพลังงานที่ได้รับ อย่างไรก็ตามอิเล็กตรอนในสภาวะนี้ไม่เสถียร จึงจะปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสง เพื่อกลับสู่สถานะพื้น ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจากในระหว่างที่อิเล็กตรอนกลับเข้าสู่สถานะพื้นมีการสูญเสียพลังงานบางส่วนออกไปจากการสั่น การชนกันของอิเล็กตรอน และการถ่ายเทพลังงานให้กับรอบข้าง ทำให้แสงที่เปล่งออกมามีพลังงานน้อยกว่าแสงที่ได้รับ ดังนั้น ความยาวคลื่นของแสงที่เปล่งออกมา (emission wavelength) จึงยาวกว่าความยาวคลื่นของแสงที่ใช้ในการกระตุ้น (excitation wavelength)



รูปที่ 2.6 การเปล่งแสงเนื่องจากการเปลี่ยนระดับพลังงานของอะตอม

3. การศึกษาคุณสมบัติของสารซีโรโทนินเบื้องต้น (Preliminary study of Serotonin)

3.1 แผนผังขั้นตอนดำเนินงานวิจัยโดยสังเขป



3.2 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี

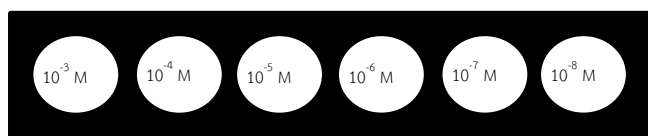
- UV spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific model NanoDrop 2000C)
- Spectro-microplate reader (Synergy Mx monochromator-based multi-mode microplate reader)
- 96 well Assay Plate, Sterile Black Plate (Corning Incorporated, COSTAR)
- 5-hydroxytryptaminehydrochloride (5-HT, Serotonin hydrochloride, Sigma)
- 3-Hydroxytyramine hydrochloride (Dopamine hydrochloride, Sigma)
- 2-Amino-3-(1H-indol-3-yl) propanoic acid (L-Tryptophan, Changsha Choice Chemicals Ltd.)
- (5R)-[(1S)-1,2-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one (L-ascorbic acid, Vitamin C)
- Phosphate buffer saline pH 7.0 (NaCl 0.9%)
- Deionized Water

3.3 UV and Fluorescence measurement

3.3.1 UV measurement

การเตรียมสารละลายซีโรโทนิน นำซีโรโทนิน ($C_{10}H_{12}N_2O \cdot HCl$, MW= 212.68) 0.0106 กรัม (g) มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline, PBS) pH 7.4 ปริมาตร 50 ml (ml) เก็บไว้เป็นสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock Solution) ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M ใน strip tube หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันแสง ก่อนการวัดก็นำมาเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ทีละ 10 เท่า โดยเริ่มจากความเข้มข้นสูงสุด 10^{-3} M เจือจางต่อไปเป็น 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M ตามลำดับ ดังรูปที่

3.1



รูปที่ 3.1 Dilution of serotonin in PBS solution

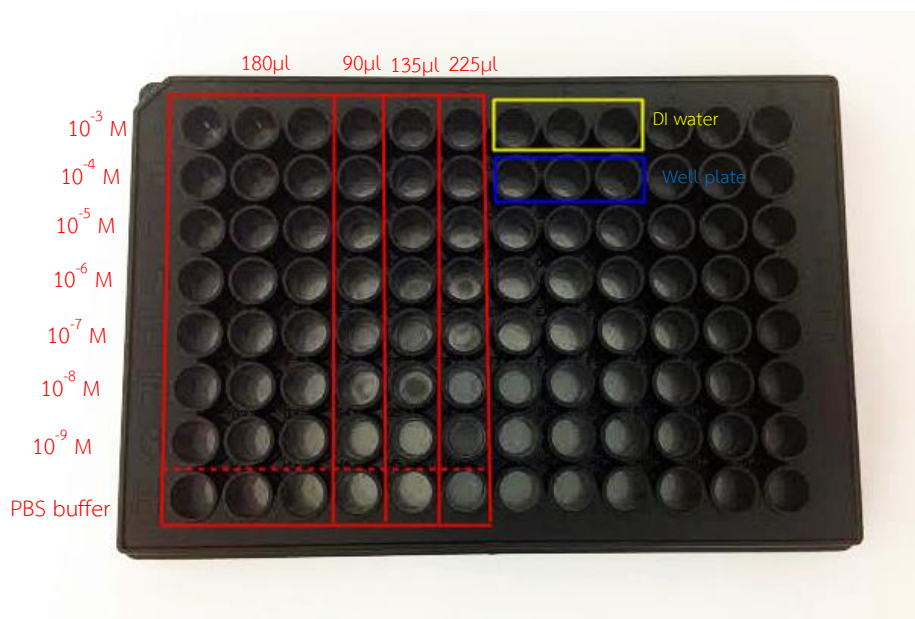
ขั้นตอนการวัด นำสารละลายซีโรโทนินที่เจือจางความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-8} - 10^{-3} M ไปวัดค่ายูวีสเปกตรัม (UV spectrum scan) ด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer: Thermo Fisher Scientific model NanoDrop 2000C) โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์เป็น blank บันทึกผล

3.3.2 Fluorescence measurement

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีโรโทนินเบื้องต้น เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดซีโรโทนินโดยการวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างเครื่องวัดซีโรโทนินทางแสงอย่างง่ายขึ้นมา โดยปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ สารรบกวนที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันและเวลาที่ใช้ในการวัด ซึ่งการวัดสารตัวอย่างด้วยเครื่อง Spectro-microplate reader นั้นได้ทำการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายก่อนจะทำการทดลองในลำดับต่อไป

1. ปริมาตรของสารละลายซีโรโทนินที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารละลายซีโรโทนิน นำซีโรโทนิน ($C_{10}H_{12}N_2O \cdot HCl$, MW= 212.68) 0.0106 กรัม (g) มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ความเข้มข้น 0.01 M pH 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ml) เก็บไว้เป็นสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock Solution) ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M ในการวัดจะใช้ 96-Well Assay plate สีดำ ในการศึกษาเบื้องต้นนี้จะศึกษาผลของปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ในการวัด โดยแถวที่ 1-3 ใช้ปริมาตร 180 ไมโครลิตร (μ l) แถวที่ 4 ใช้ปริมาตร 90 μ l แถวที่ 5 ใช้ปริมาตร 135 μ l และแถวที่ 6 ใช้ปริมาตร 225 μ l แต่ละแถวนำมาเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ทีละ 10 เท่า เริ่มจากความเข้มข้นสูงสุด 10^{-3} M เจือจางต่อไปเรื่อย ๆ เป็น 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9} M ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.2

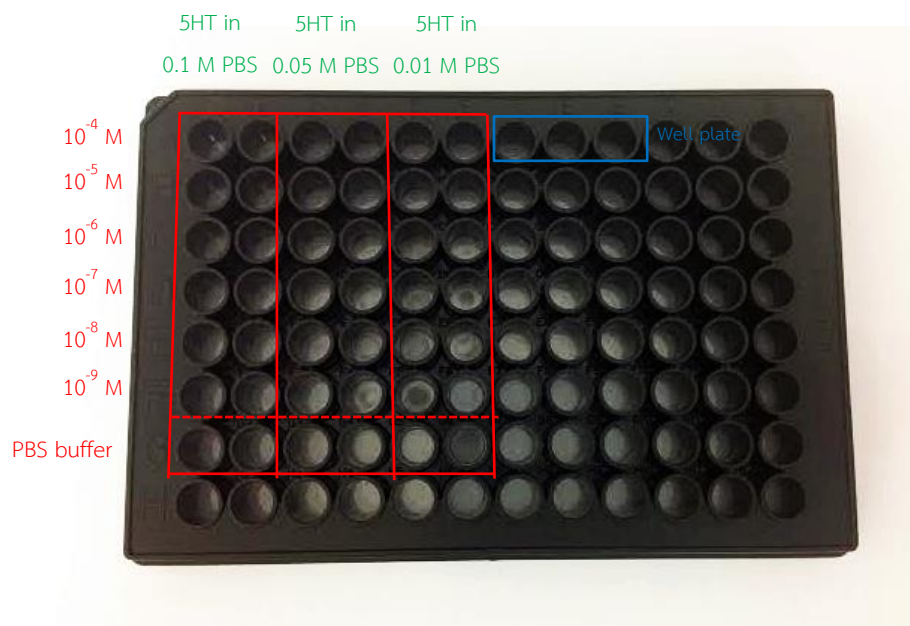


รูปที่ 3.2 การเตรียมสารละลายฮิสโทนินใน 96 well plate สำหรับการทดลองศึกษาผลของปริมาณสารละลายที่มีต่อการวัดฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฮิสโทนิน

ขั้นตอนการวัด นำสารละลายฮิสโทนินที่เตรียมไว้แล้ว ไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรไมโครเพลทรีดเดอร์ (Spectro-microplate reader : Synergy Mx monochromator-based multi-mode microplate reader) กำหนดค่า excitation ที่ 280 นาโนเมตร (nm) และ กำหนดค่า emission ในช่วง 300 – 450 nm เพื่อบันทึกผล

2. ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายฮิสโทนินและการทดลองหา Excitation ที่เหมาะสมในการกระตุ้นฮิสโทนิน

การเตรียมสารละลายฮิสโทนิน นำฮิสโทนิน ($C_{10}H_{12}N_2O \cdot HCl$, MW= 212.68) 0.43 มิลลิกรัม (mg) มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 M pH 7.0 ปริมาตร 20 ml เก็บไว้เป็นสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock Solution) ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M จากนั้นนำ 96-Well Assay plate สีดำทำการแบ่งออกเป็น 3 ส่วน โดยแถวที่ 1-2 สำหรับสารละลายฮิสโทนินใน 0.1 M PBS แถวที่ 3-4 สำหรับสารละลายฮิสโทนินใน 0.05 M PBS แถวที่ 5-6 สำหรับสารละลายฮิสโทนินใน 0.01 M PBS แต่ละแถวนำมาเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ของแต่ละความเข้มข้นที่ละ 10 เท่า เริ่มจากความเข้มข้นสูงสุด 10^{-4} M เจือจางต่อไปเรื่อยๆ เป็น 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9} M โดยแต่ละตัวอย่างมีปริมาตร 180 µl ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 การเตรียมสารละลายซีโรโทนินใน 96 well plate สำหรับการทดลองศึกษาผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลนที่ใช้เป็นตัวทำละลายซีโรโทนินที่มีต่อการวัดฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีโรโทนิน

ขั้นตอนการวัด นำสารละลายซีโรโทนินที่เตรียมไว้แล้ว ไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์เพลท รีดเดอร์ กำหนดค่า excitation ที่ 250, 280, 336 และ 366 nm และกำหนดค่า emission ในช่วง 300 – 600 nm เพื่อบันทึกผล

3. สารรบกวนที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับซีโรโทนินและเวลาที่ใช้ในการวัด

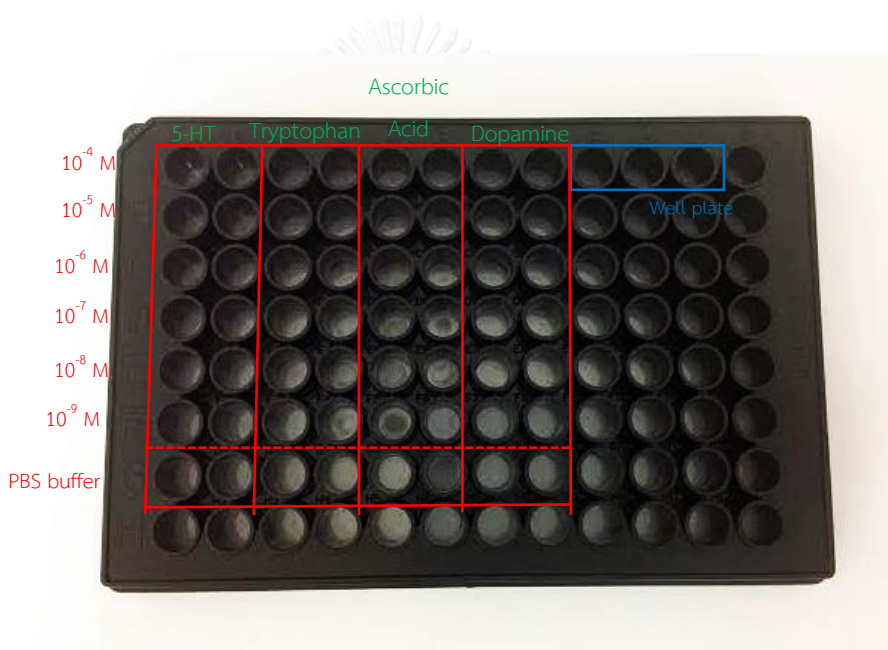
การเตรียมสารละลายซีโรโทนิน นำซีโรโทนิน ($C_{10}H_{12}N_2O \cdot HCl$, MW= 212.68) 0.43 mg มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลนความเข้มข้น 0.01 M pH 7.0 ปริมาตร 20 ml เก็บไว้เป็นสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock Solution) ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M

การเตรียมสารละลายโดปามีน นำโดปามีน ($(HO)_2C_6H_3CH_2CH_2NH_2 \cdot HCl$, MW= 189.64) 0.38 mg มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลนความเข้มข้น 0.01 M pH 7.0 ปริมาตร 20 ml เก็บไว้เป็นสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock Solution) ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M

การเตรียมสารละลายทริปโตเฟน นำทริปโตเฟน ($C_{11}H_{12}N_2O_2$, MW= 204.23) 0.40 mg มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลนความเข้มข้น 0.01 M pH 7.0 ปริมาตร 20 ml เก็บไว้เป็นสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock Solution) ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M

การเตรียมสารละลายแอสคอร์บิก เอซิด นำกรดแอสคอร์บิก เอซิด ($C_6H_8O_6$, MW= 176.12) 0.35 mg มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ความเข้มข้น 0.01 M pH 7.0 ปริมาตร 20 ml เก็บไว้เป็นสารละลายความเข้มข้นสูง (Stock Solution) ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M

ในการวัดจะใช้ 96-Well Assay plate สีดำ โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแถวที่ 1-2 สำหรับสารละลายซีโรโทนิน แถวที่ 3-4 สำหรับสารละลายทริปโตเฟน แถวที่ 5-6 สำหรับสารละลายแอสคอร์บิก เอซิด และแถวที่ 7-8 สำหรับสารละลายโดปามีน แต่ละแถวนำมาเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ความเข้มข้น 0.01 M ทีละ 10 เท่า เริ่มจากความเข้มข้นสูงสุด 10^{-4} M เจือจางต่อไปเรื่อยๆ เป็น 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9} M โดยแต่ละตัวอย่างมี ปริมาตร 180 μ l ดังรูปที่ 3.4

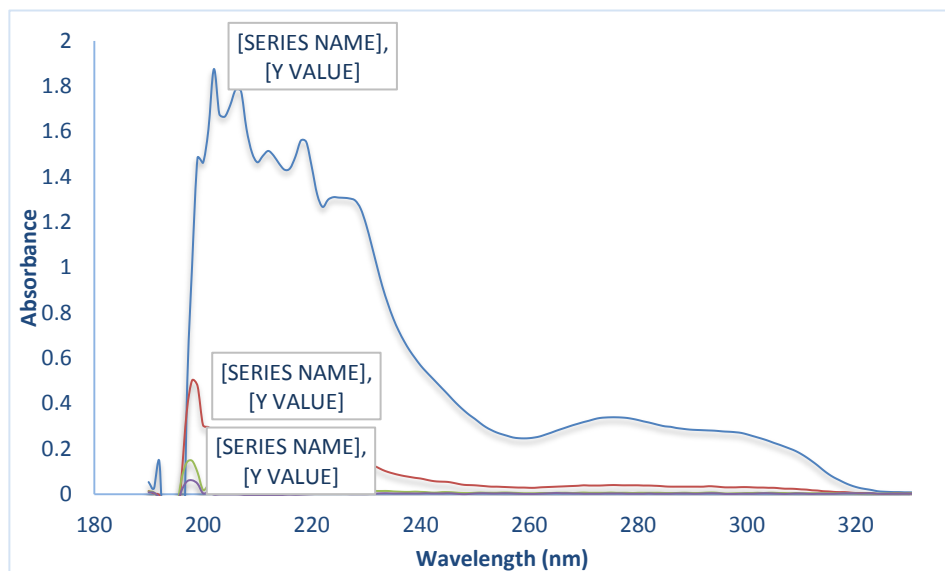


รูปที่ 3.4 การเตรียมสารละลายซีโรโทนินและสารรบกวนอื่นๆ ใน 96 well plate สำหรับการทดลองศึกษาผลของเวลาที่มีต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีโรโทนินและศึกษาสารรบกวนอื่นของซีโรโทนิน

ขั้นตอนการวัด นำสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่เตรียมไว้แล้ว ไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรไมโครเพลท รีดเดอร์ กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และกำหนดค่า emission ในช่วง 300 – 450 nm และทำการวัดทุก 30 นาที จนถึง 120 นาที (0, 30, 60, 90, 120 นาที) บันทึกผล
ทุกขั้นตอนต้องหลีกเลี่ยงแสงเนื่องจากซีโรโทนินมีความไวต่อแสง

3.4 การแปลผลข้อมูล

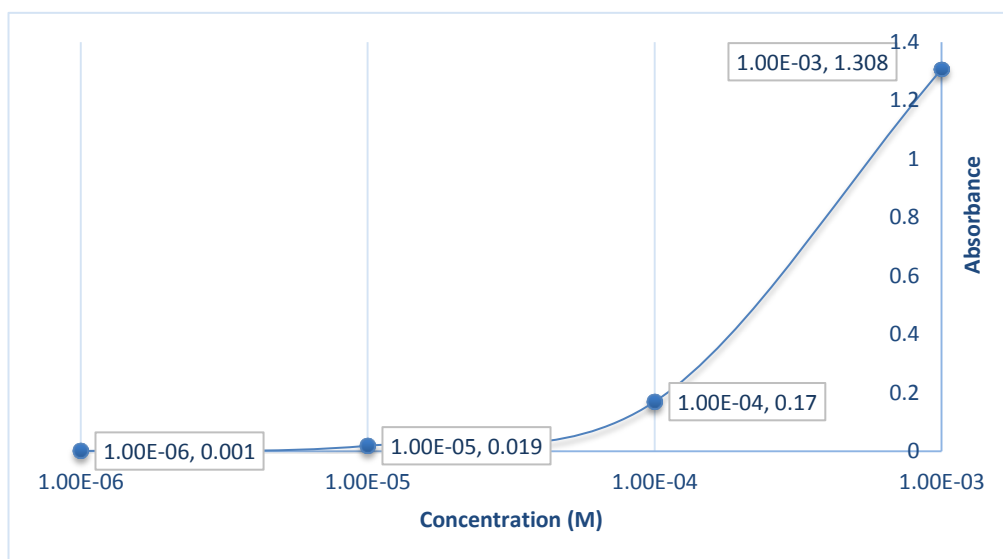
3.4.1. UV measurement



รูปที่ 3.5 กราฟที่ได้จากการ scan UV Spectrum ของสารละลาย Serotonin ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M และ 10^{-3} M

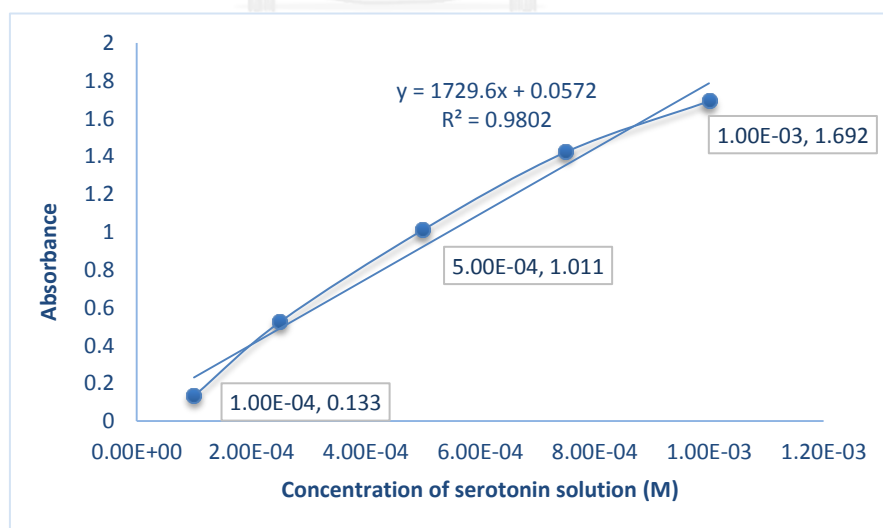
รูปที่ 3.5 แสดงกราฟที่ได้จากการอ่านยูวีสเปกตรัมของสารละลายซีโรโทนินที่ความเข้มข้น 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M และ 10^{-3} M พบว่าความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินแปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) กล่าวคือ ยิ่งความเข้มข้นมากค่าการดูดกลืนแสงยิ่งมาก และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (Absorption peak) ของสารละลายซีโรโทนินอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 200-240 nm และ 250-280 nm

จากนั้นได้นำค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 206 nm เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่ดูดกลืนแสงซีโรโทนินสูงสุด มาจัดเรียงใหม่ โดยให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน และแกน y เป็นค่า Absorbance ดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับค่า Absorbance ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M - 10^{-3} M

จากรูป 3.6 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับค่า Absorbance ณ ความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-3} M พบว่าที่ความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M เห็นการเปลี่ยนแปลงได้น้อยเมื่อเทียบการเปลี่ยนแปลงในช่วงความเข้มข้นที่ 10^{-4} - 10^{-3} M ที่เห็นการเปลี่ยนแปลงได้ดีกว่า จึงได้นำค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความเข้มข้นนี้มาทำ Calibration Curve โดยกระจายความเข้มข้นเป็น 0.1 mM, 0.25 mM, 0.50 mM, 0.75 mM และ 1.0 mM ดังรูปที่ 3.7

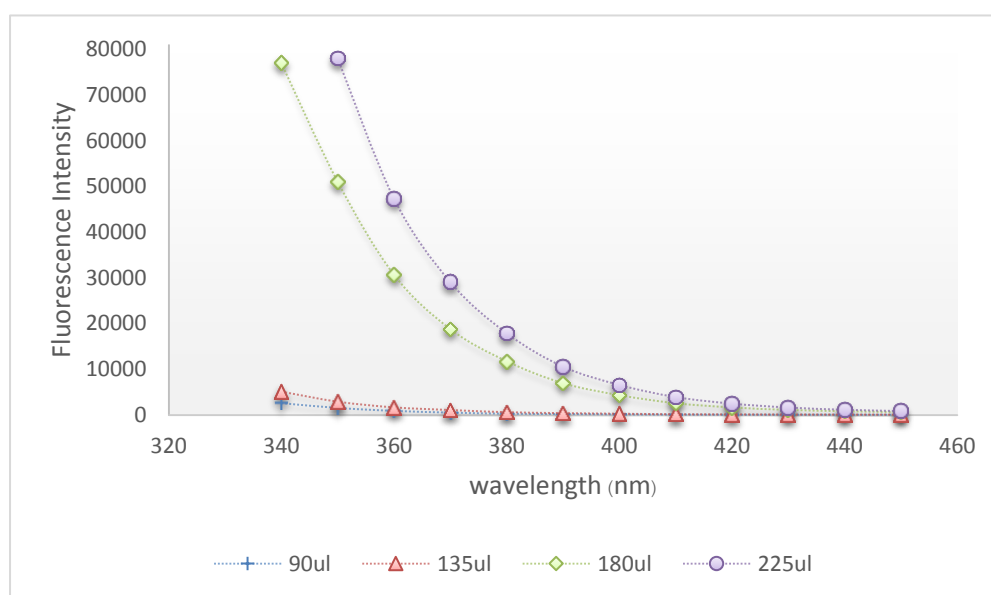


รูปที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับค่า Absorbance ที่ความเข้มข้น 0.1 - 1.0 mM

จากรูป 3.7 พบว่ามีความสัมพันธ์ค่อนข้างเป็นเส้นตรง กล่าวได้ว่าสามารถตรวจวัดระดับความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินได้ในช่วงความเข้มข้น 10^{-4} M - 10^{-3} M แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่านี้เห็นการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน

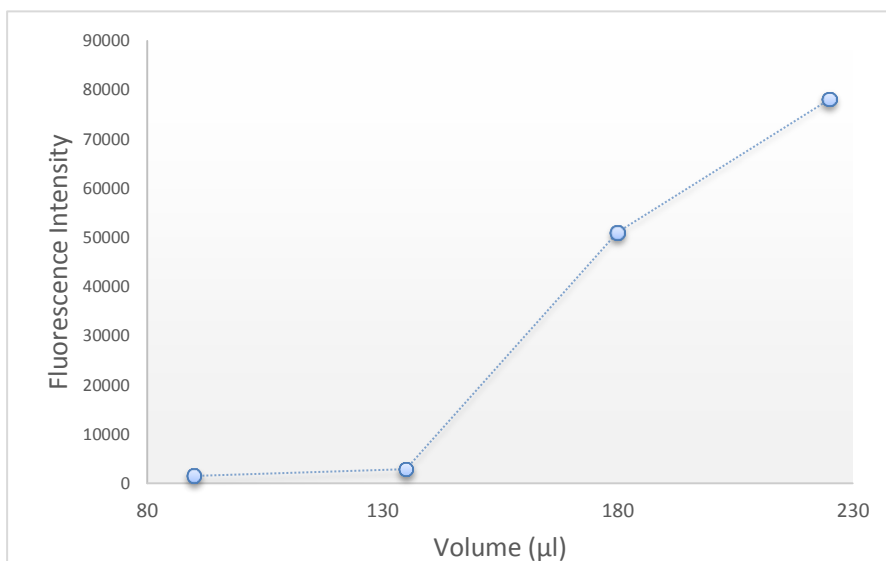
3.4.2 Fluorescence measurement

1. ผลของการทดลองศึกษาปริมาณของสารละลายซีโรโทนินที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 3.8 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ความเข้มข้น 10^{-6} M ปริมาตร 90 μ l (—+—), 135 μ l (—▲—), 180 μ l (—◇—) และ 225 μ l (—○—) กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 340-450 nm

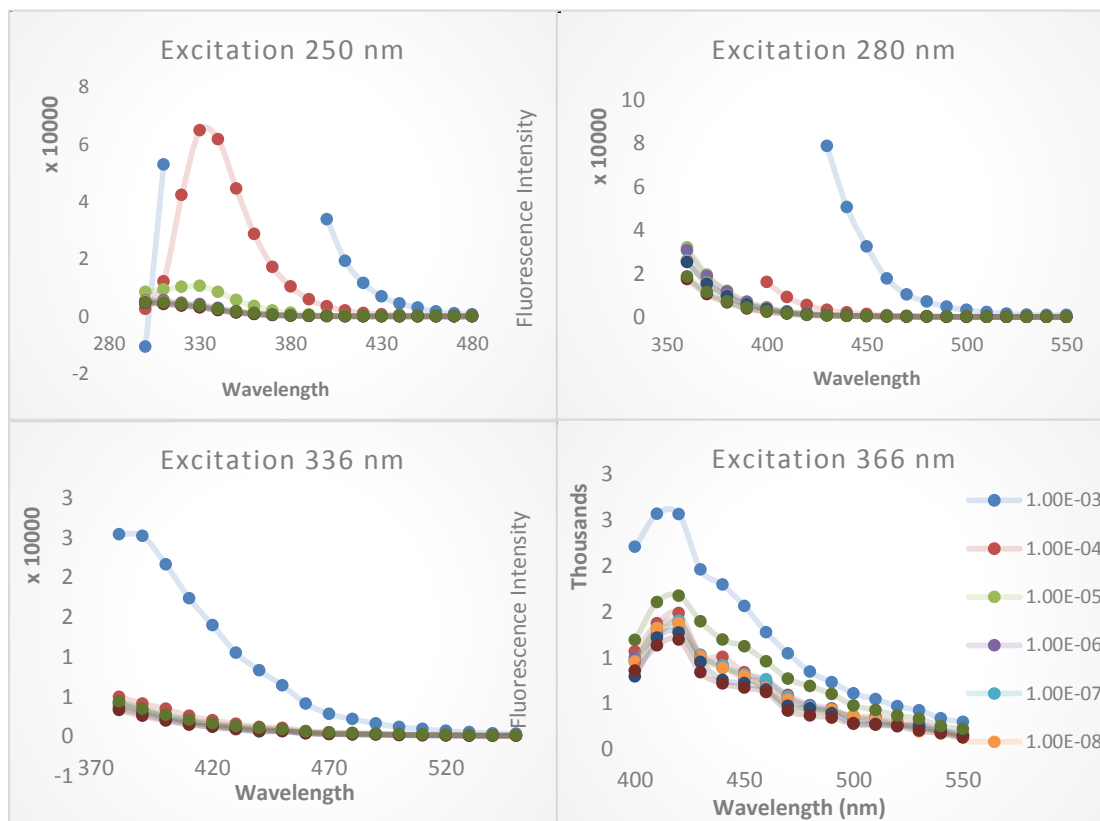
รูปที่ 3.8 เป็นกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ปริมาตร 90 μ l 135 μ l 180 μ l และ 225 μ l กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 340-450 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินที่ 10^{-6} M พบว่าที่ปริมาตร 225 μ l ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือปริมาตรที่ 180, 135 และ 90 μ l ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาที่ความยาวคลื่น 350 nm จะพบความสัมพันธ์ของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์และปริมาตรสารละลายซีโรโทนิน ดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์และปริมาตรสารละลายซีโรโทนินความเข้มข้น 10^{-6} M ที่ปริมาตร 90,135, 180 และ 225 µl กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 350 nm

จากรูปที่ 3.9 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์และปริมาตรสารละลายซีโรโทนินแบบแปรผันตรงกัน กล่าวคือ ยิ่งใช้ปริมาตรสารละลายซีโรโทนินมาก ยิ่งให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูง จากผลการทดลอง พบว่าที่ปริมาตร 135, 180 และ 225 µl ค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด ส่วนที่ปริมาตร 90 µl และปริมาตร 135 µl พบการเปลี่ยนแปลงได้น้อย แต่ 96 well assay plate ที่ใช้แนะนำปริมาตรที่เหมาะสมในการใช้งานคือ 70-200 µl ดังนั้น ปริมาตรที่เหมาะสมในการวัดสารละลายซีโรโทนินโดยการวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่อง Spectro-microplate reader คือ 180 µl

2. ผลการทดลองหา Excitation ที่เหมาะสมในการกระตุ้นซีโรโทนิน



รูปที่ 3.10 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนิน กำหนด excitation ที่ 250, 280, 336 และ 366 nm และ Emission range 300-600 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-3} M

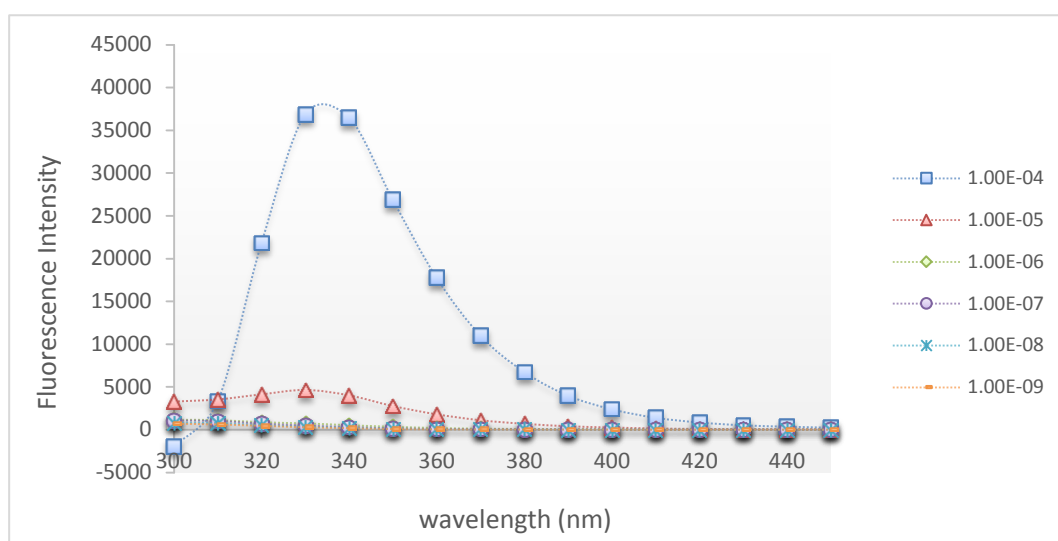
จากรูป 3.10 แสดงกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายซีโรโทนิน ณ ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-3} M กำหนด excitation ที่ 250, 280, 336 และ 366 nm และ Emission range 300-600 nm พบว่าเมื่อให้การกระตุ้นที่ 250 nm และ 280 nm ที่ความเข้มข้นสูงๆ เครื่องไม่สามารถวัดค่าได้เนื่องจากมีสารละลายซีโรโทนินมีความเข้มข้นสูงเกินไป (Overflow) ขณะที่ตำแหน่งการกระตุ้นที่ 336 nm และ 366 nm emission peak ของความเข้มข้น 10^{-3} M ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดมีค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence Intensity) เท่ากับ 30,000 และ 3,000 ตามลำดับ แสดงว่าค่าที่ได้จากการกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 250 และ 280 nm ให้ค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงกว่า

เมื่อพิจารณาที่ตำแหน่งการกระตุ้น 250 ณ ความเข้มข้น 10^{-4} M จะเห็น emission peak ที่ตำแหน่ง 330 nm ส่วนการกระตุ้นที่ 280 nm ณ ความเข้มข้นเดียวกัน ไม่สามารถเห็น emission

peak ได้ เนื่องจากค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้สูงเกินกว่าที่เครื่องจะวัดได้ ดังนั้น ตำแหน่งการกระตุ้นซีโรโทนินที่ให้ผลการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ดีที่สุดคือที่ตำแหน่ง 280 nm จึงได้เลือกใช้การกระตุ้นที่ความยาวคลื่นนี้ในการทำการทดสอบคุณสมบัติทางแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารซีโรโทนินในลำดับต่อไป

3. ผลของการศึกษาความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายซีโรโทนิน

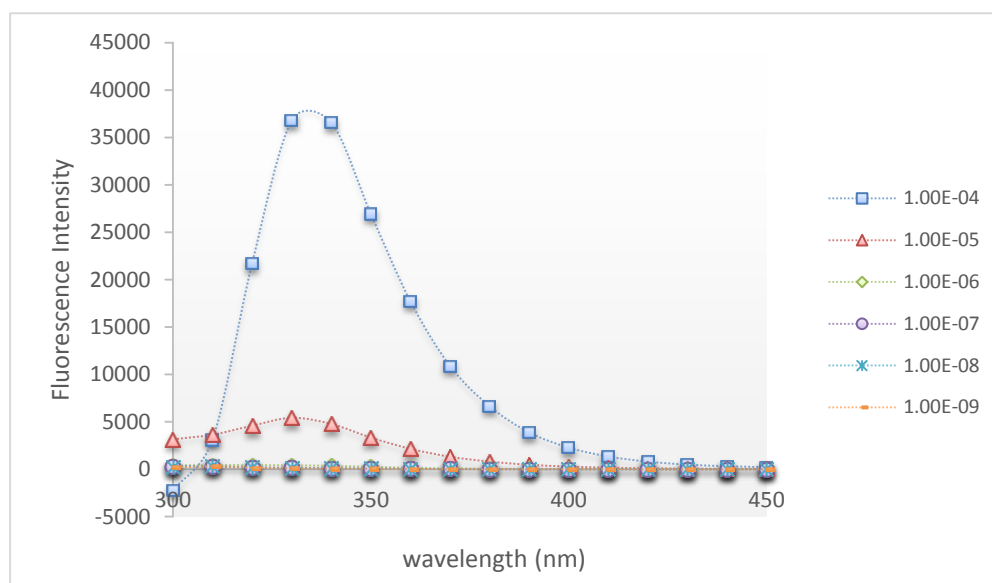
3.1 ผลการทดลองซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ความเข้มข้น 0.1 M



รูปที่ 3.11 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.1 M กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 300-450 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-4} M

จากรูปที่ 3.11 เป็นกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.1 M กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 300-450 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-4} M พบว่าตำแหน่งที่ให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงที่สุด (Emission peak) อยู่ที่ความยาวคลื่น 330-340 nm และในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M เห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่าสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10^{-4} M รองลงมาคือความเข้มข้นที่ 10^{-5} M และ 10^{-6} M ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M นี้ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน ส่วนช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-6} M พบการเปลี่ยนแปลงน้อย

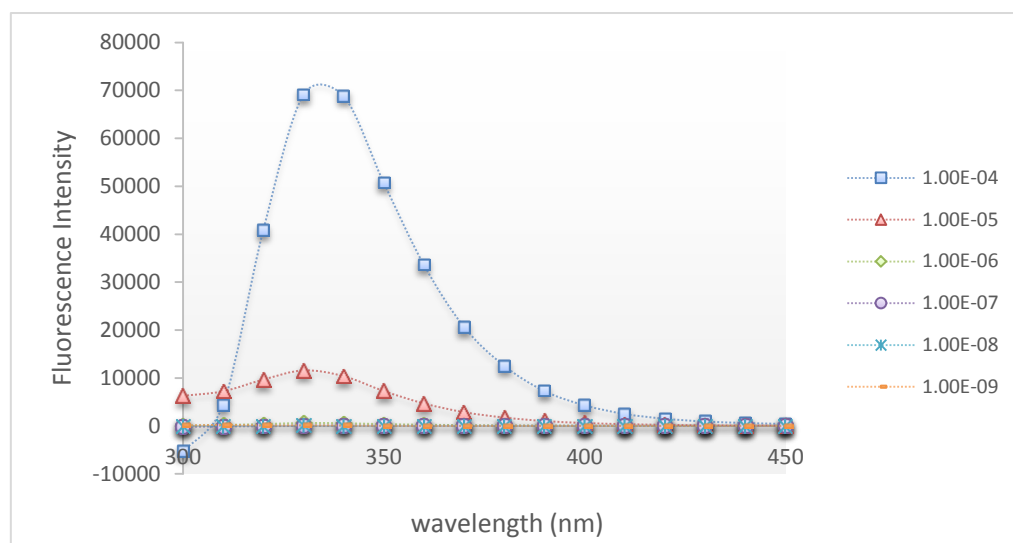
3.2 ผลการทดลองซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ความเข้มข้น 0.05 M



รูปที่ 3.12 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.05 M กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 300-450 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-4} M

จากรูปที่ 3.12 เป็นกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.05 M กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 300-450 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-4} M พบว่าตำแหน่งที่ให้ Emission peak อยู่ที่ความยาวคลื่น 330-340 nm และในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M เห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ดี โดยมีค่าสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10^{-4} M รองลงมาคือความเข้มข้นที่ 10^{-5} M และ 10^{-6} M ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M นี้ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน ส่วนช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-6} M พบการเปลี่ยนแปลงน้อย

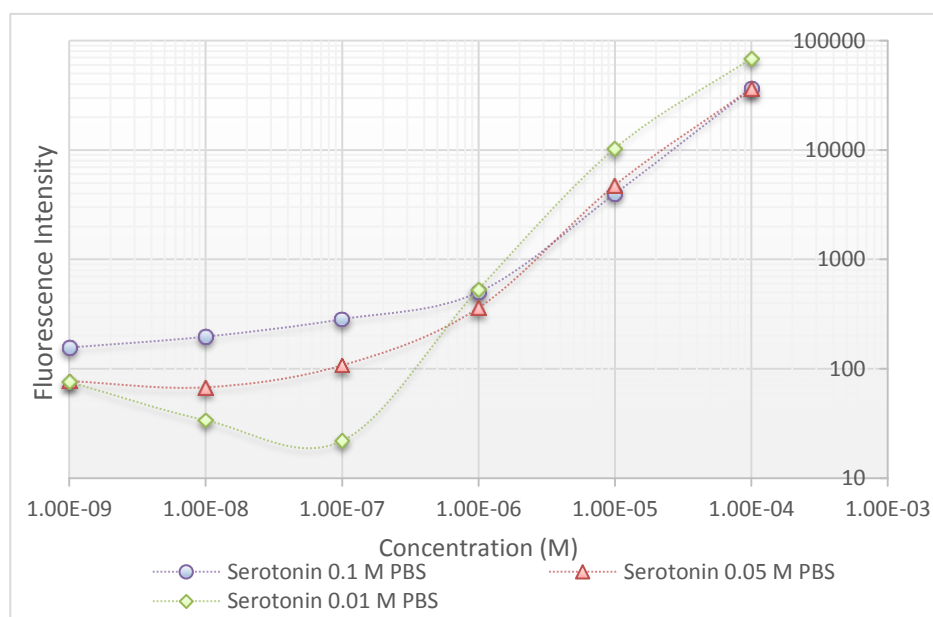
3.3 ผลการทดลองซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ความเข้มข้น 0.01 M



รูปที่ 3.13 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.01 M กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 300-450 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-4} M

จากรูปที่ 3.13 เป็นกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.01 M กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission range 300-450 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-4} M พบว่าตำแหน่งที่ให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงที่สุด (Emission peak) อยู่ที่ความยาวคลื่น 330-340 nm และในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M เห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจน โดยมีค่าสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10^{-4} M รองลงมาคือความเข้มข้นที่ 10^{-5} M และ 10^{-6} M ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M ส่วนช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-6} M พบการเปลี่ยนแปลงน้อย

จากนั้น นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายซีโรโทนินกับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยกำหนดแกน x คือความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ความเข้มข้น 0.1 , 0.05 และ 0.01 M ตามลำดับ ณ ตำแหน่งความยาวคลื่น 340 nm เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่ให้ค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงและเสถียรมากที่สุด ส่วนแกน y คือค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ตามรูปที่ 3.14

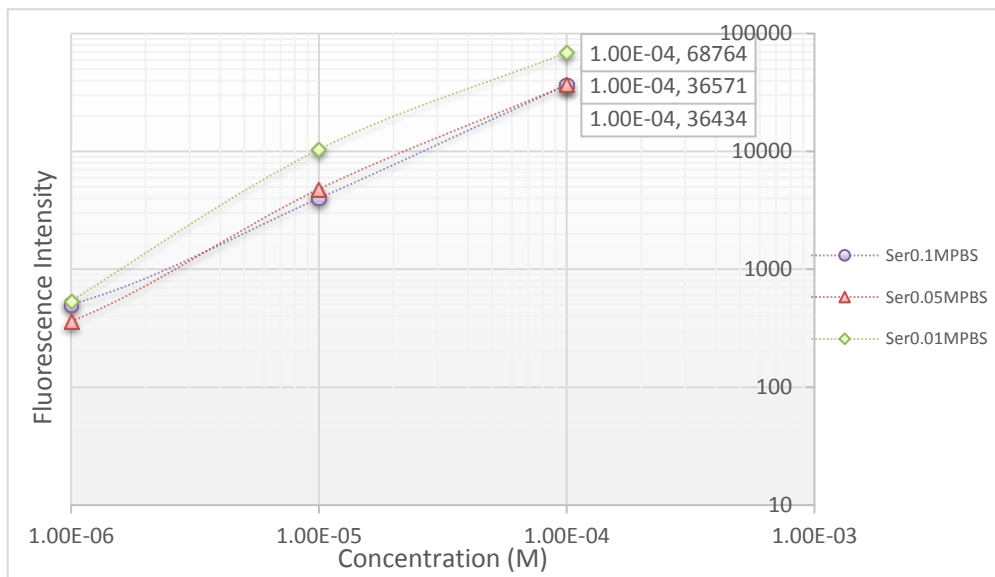


รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและค่าความแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.01 M (\diamond) 0.05 M (\triangle) และ 0.1 M (\circ) กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission 340 nm

จากกราฟ 3.14 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-9} – 10^{-4} M และค่าความแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 M ตามลำดับ กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission 340 nm พบว่า ซีโรโทนินใน 0.01 M PBS มีค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงตามความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินในช่วง 10^{-9} – 10^{-7} M เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปจนถึง 10^{-4} M พบว่าค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และซีโรโทนินใน 0.05 M PBS ที่ช่วงความเข้มข้น 10^{-9} – 10^{-8} M ค่าความแสงฟลูออเรสเซนซ์ไม่พบการเปลี่ยนแปลง พอเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 10^{-8} M ไปจนถึง 10^{-4} M ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ก็เพิ่มตามอย่างต่อเนื่อง ส่วนซีโรโทนินใน 0.1 M PBS นั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ก็เพิ่มตามอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-9} – 10^{-4} M

จากผลการทดลอง จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายในช่วง 10^{-9} – 10^{-7} M ซีโรโทนินใน 0.1 M PBS มีค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มากกว่า ซีโรโทนินใน 0.05 M PBS และ 0.01 M PBS ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของสารละลายในช่วง 10^{-6} – 10^{-4} M ผลที่ได้ตรงข้ามกันคือ ซีโรโทนินใน 0.01 M PBS มีค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุด รองลงมาคือซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ความเข้มข้น 0.05 M PBS และ 0.1 M PBS ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินสูงๆ ผลการวัดที่ได้เสถียรและให้ค่าสูงกว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ ดังนั้นจึงได้นำ

ผลการวัดของสารละลายซีโรโทนินที่ความเข้มข้นในช่วง 10^{-6} - 10^{-4} M ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันมาพิจารณา ดังรูป 3.15



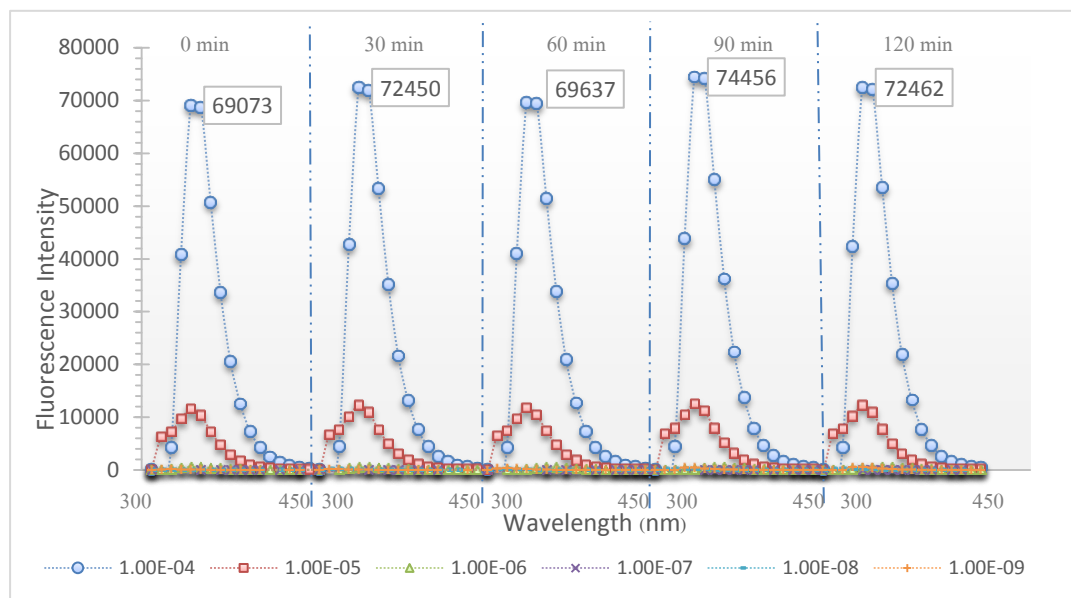
รูปที่ 3.15 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของสารละลาย serotonin ใน PBS ที่ความเข้มข้น 0.01 M (\blacklozenge) 0.05 M (\blacktriangle) และ 0.1 M (\bullet) กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission 340 nm

จากรูปที่ 3.15 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่มีความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 M กำหนดค่า excitation ที่ 280 nm และ Emission 340 nm ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน ที่ 10^{-4} M พบว่าค่าระหว่างสารละลายซีโรโทนินใน 0.05 M PBS และ 0.1 M PBS เห็นการเปลี่ยนแปลงน้อย ส่วนสารละลายซีโรโทนินใน 0.01 M PBS มีค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุด และที่ความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-4} M มีค่ามากกว่าสารละลายซีโรโทนินใน 0.05 M PBS และ 0.1 M PBS ประมาณ 2 เท่า

จากรูปข้างต้นจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์บัฟเฟอร์สูงจะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่ำๆ เนื่องจากที่ความเข้มข้นสารละลายบัฟเฟอร์สูงๆ จะมีความแรงไอออน (Ionic Strength) ที่สูง ซึ่งจะช่วยในการรักษาการเปลี่ยนแปลงของสารไว้ การใช้บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ จึงทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงได้มากกว่า

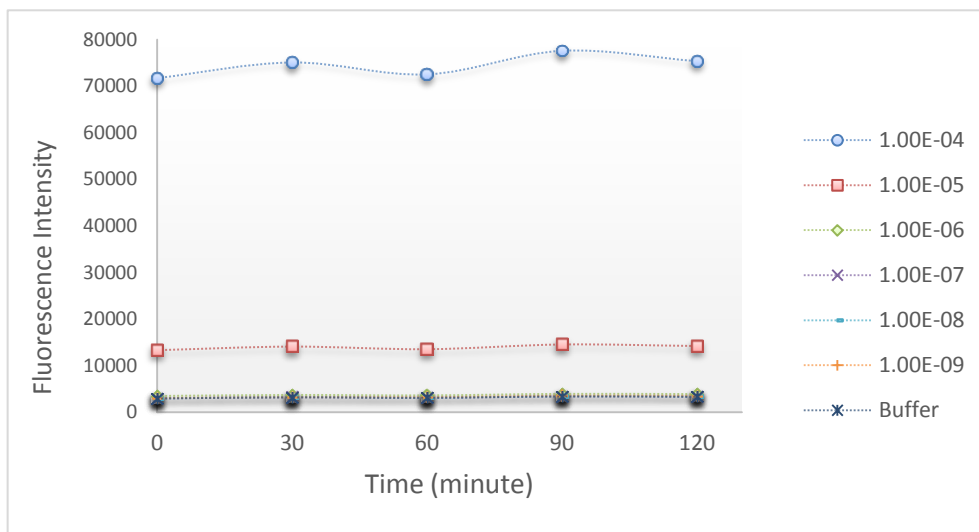
ดังนั้น ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่เหมาะสมในการใช้เป็นตัวทำละลายสารซีโรโทนิน เพื่อใช้ในการวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์คือความเข้มข้นที่ 0.01 M

4. ผลการทดลองเวลาที่ใช้ในการวัดสารละลายซีโรโทนิน



รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการวัดสารละลาย serotonin ใน 0.01 M PBS กับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยวัดแบบ Scan fluorescence spectrum กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm

จากรูปที่ 3.16 เป็นกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการวัดสารละลายซีโรโทนินความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-4} M กับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm พบว่าค่าความเข้มแสงที่วัดได้ทันทีหลังการเตรียมสารละลายหรือ 0 นาทีมีค่าใกล้เคียงกับการวัดที่ 30, 60, 90 และ 120 นาที โดยจะเห็นชัดที่สุดที่ความเข้มข้น 10^{-4} M ค่าที่วัดได้จะตกลงไปเล็กน้อยหรือสูงขึ้นเล็กน้อยหลังการวัดไป 30 นาที ตามรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.17 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการวัดสารละลาย serotonin ใน 0.01 M PBS กับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission 340 nm

จากรูปที่ 3.17 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการวัดสารละลายซีโรโทนินความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-4} M กับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission 340 nm พบว่าที่ความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-4} M หลังทำการวัดทุกๆ 30 นาที มีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์เล็กน้อยในลักษณะขึ้นลง และที่ความเข้มข้นระหว่าง 10^{-9} - 10^{-6} M เห็นการเปลี่ยนแปลงได้น้อย จึงได้นำข้อมูลของความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-4} M ที่ได้จากการวัดไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) เพื่อทดสอบว่าค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการวัดทุกๆ 30 นาทีไปจนถึง 120 นาทีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จากผลการทดลองวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ณ ความเข้มข้นของซีโรโทนิน 10^{-4} M เมื่อวัดทุกๆ 30 นาทีไปจนถึง 120 นาที กำหนด excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Row 1 (0 นาที)	16	312471.5	19529.4688	6.32E+08		
Row 2 (30 นาที)	16	327121	20445.0625	6.93E+08		
Row 3 (60 นาที)	16	315468.5	19716.7813	6.44E+08		
Row 4 (90 นาที)	16	337386.5	21086.6563	7.35E+08		
Row 5 (120 นาที)	16	328005	20500.3125	6.95E+08		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	25664431.3	4	6416107.84	0.00944	0.999819	2.493696
Within Groups	5.0976E+10	75	679685285			
Total	5.1002E+10	79				

จากตารางที่ 3.1 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) จากผลการทดลองวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน 10^{-4} M เมื่อวัดที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} > 0.05$)

ตารางที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จากผลการทดลองวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน 10^{-5} M เมื่อวัดทุกๆ 30 นาทีไปจนถึง 120 นาที กำหนด excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm

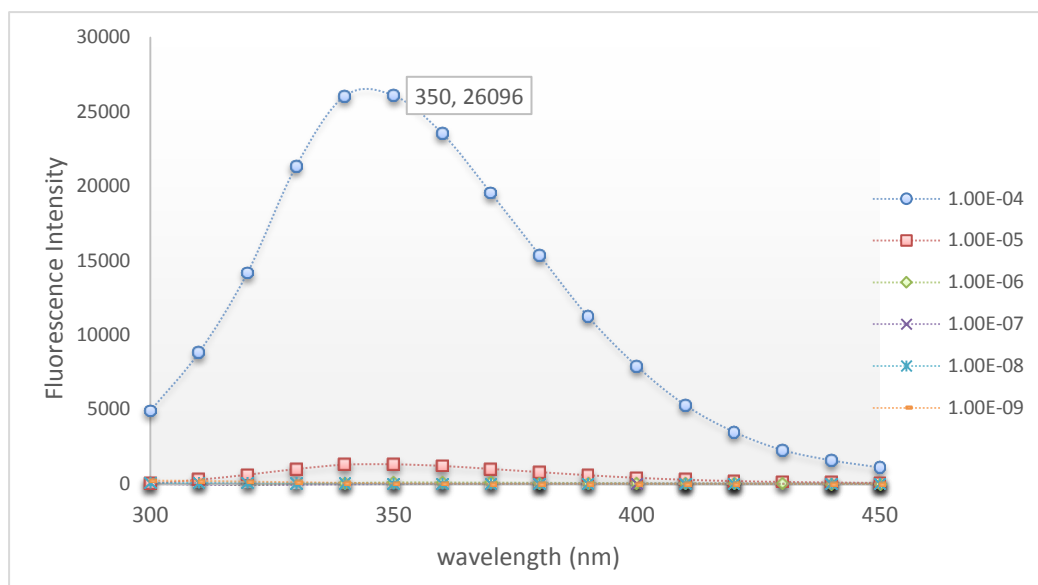
Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Row 1 (0 นาที)	16	64031	4001.938	17101450		
Row 2 (30 นาที)	16	67408	4213	18972699		
Row 3 (60 นาที)	16	64916.5	4057.281	17561755		
Row 4 (90 นาที)	16	69368	4335.5	20006705		
Row 5 (120 นาที)	16	67895.5	4243.469	19191045		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1209394	4	302348.6	0.016284	0.999468	2.493696
Within Groups	1.39E+09	75	18566731			
Total	1.39E+09	79				

จากตารางที่ 3.2 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) จากผลการทดลองวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน 10^{-5} M เมื่อวัดที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} > 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน สามารถสรุปได้ว่า เวลาในการวัดสารละลายซีโรโทนินทุกๆ 30 นาทีให้ค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ไม่แตกต่างกัน ภายในเวลา 120 นาที

5. ผลการวัดสารรบกวนที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับซีโรโทนิน

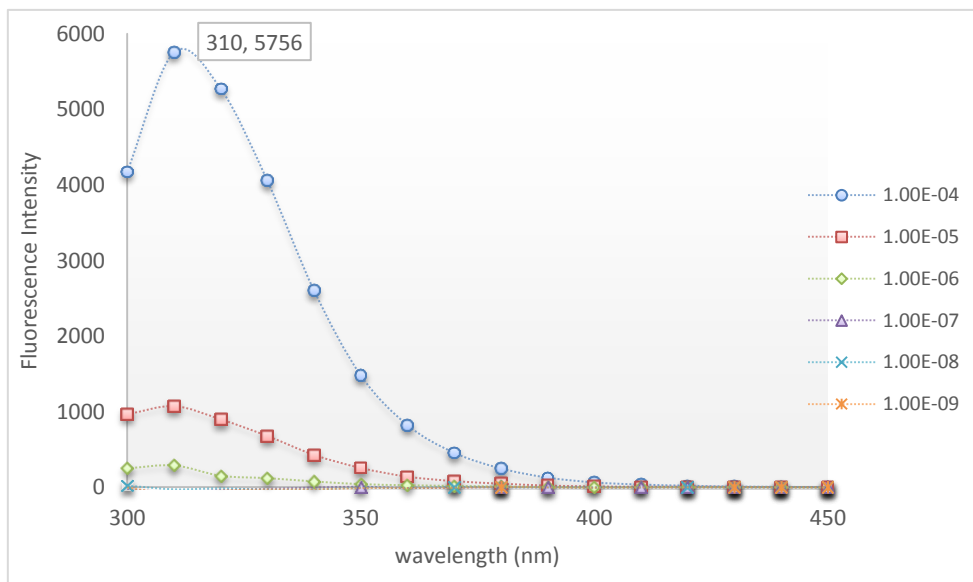
5.1 ทริปโตเฟน (Tryptophan)



รูปที่ 3.18 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายทริปโตเฟนใน 0.01 M PBS ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-4} M กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm

จากรูปที่ 3.18 เป็นกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายทริปโตเฟน ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-4} M กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm พบว่าตำแหน่งที่ให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด (Emission peak) อยู่ที่ความยาวคลื่น 350 nm และที่ความเข้มข้นของสารละลาย 10^{-4} M เห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างเห็นได้ชัด และให้ค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด รองลงมาคือความเข้มข้นที่ 10^{-5} M แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายทริปโตเฟนในช่วงความเข้มข้น 10^{-5} - 10^{-4} ส่วนช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-5} - 10^{-9} M พบการเปลี่ยนแปลงน้อย

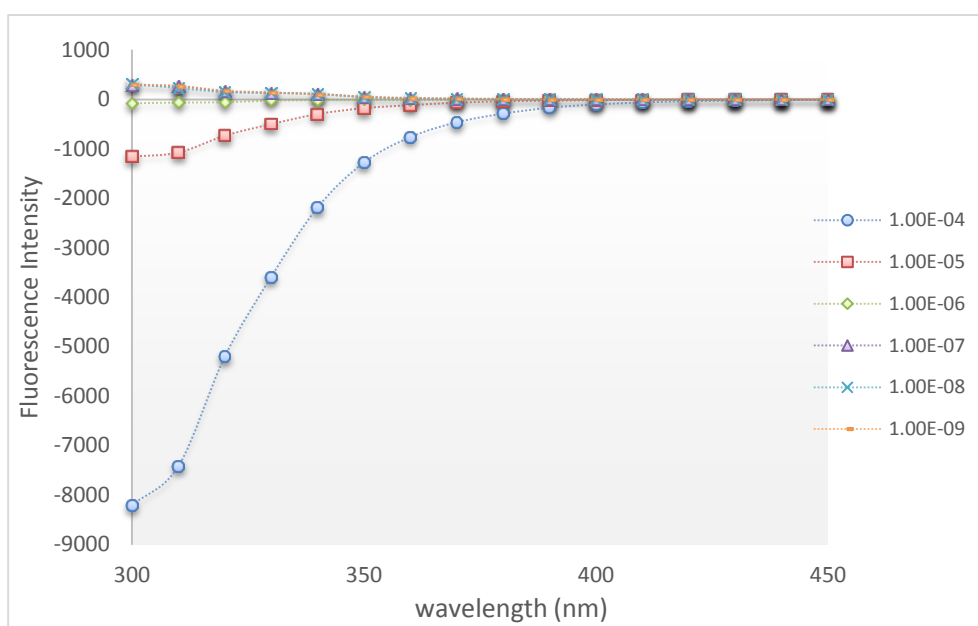
5.2 โดปามีน (Dopamine)



รูปที่ 3.19 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายโดปามีนใน 0.01 M PBS ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-4} M กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm

จากรูปที่ 3.19 เป็นกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายโดปามีนความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-4} M กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm พบว่าตำแหน่งที่ให้ Emission peak อยู่ที่ความยาวคลื่น 310 nm และในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M เห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่าสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10^{-4} M รองลงมาคือความเข้มข้นที่ 10^{-5} M และ 10^{-6} M ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายโดปามีนในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M ส่วนช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-6} M พบการเปลี่ยนแปลงน้อย

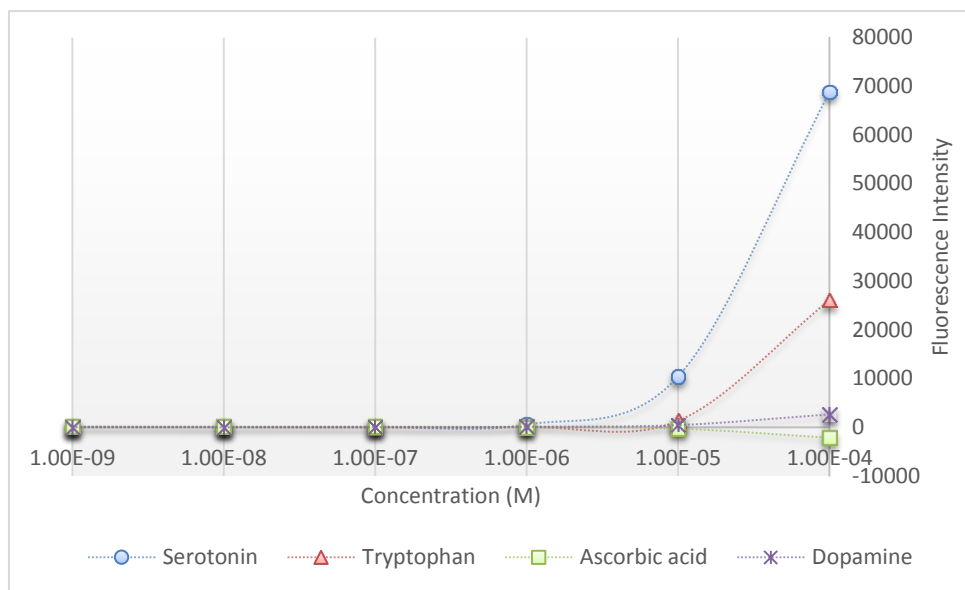
5.3 แอสคอร์บิก เอซิด (Ascorbic acid)



รูปที่ 3.20 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายแอสคอร์บิก เอซิดใน 0.01 M PBS ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-4} M กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm

จากรูปที่ 3.20 เป็นกราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum ของสารละลายกรดแอสคอร์บิก เอซิด ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-4} M กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm พบว่าในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} M สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ แต่ค่าที่ได้อยู่ในช่วงติดลบ โดยมีค่าติดลบสูงสุดที่ความเข้มข้น 10^{-4} M ตามมาด้วยความเข้มข้นที่ 10^{-5} M และ 10^{-6} M ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันตรงกับความเข้มข้นของสารละลายโดปามีนในช่วง 10^{-6} - 10^{-4} M ส่วนช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-6} - 10^{-9} M แม้จะอยู่ในช่วงค่าบวก แต่ก็พบการเปลี่ยนแปลงน้อย จึงไม่สามารถหาตำแหน่งที่ให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงที่สุดได้

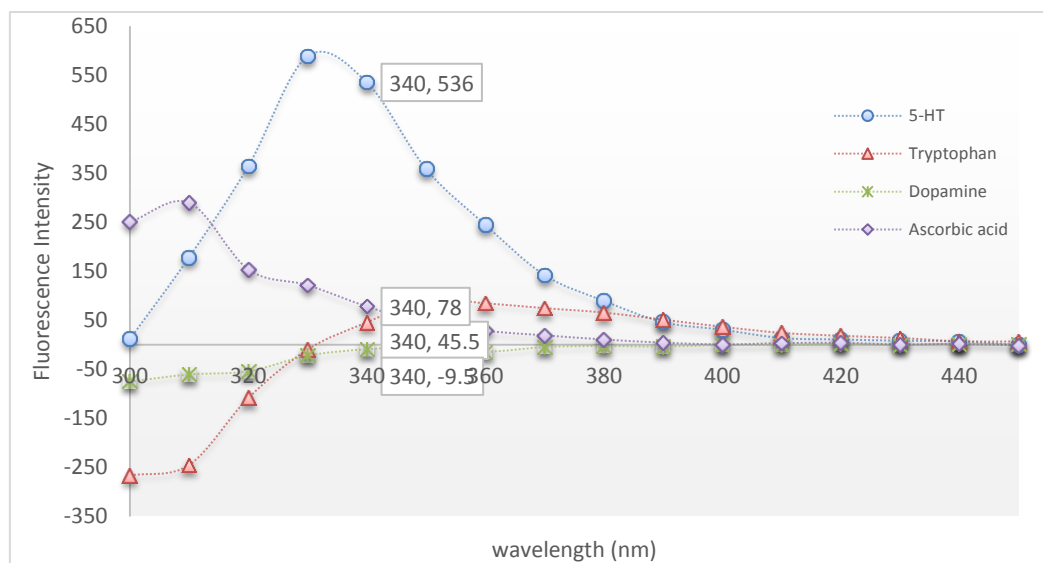
จากนั้น นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาถึงความแตกต่างระหว่างสารรบกวนในการวัดซีโรโทนิน ได้แก่ ทริปโตเฟน โดปามีน และกรดแอสคอร์บิก เอซิด โดยนำผลการวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 340 nm เนื่องจากเป็น emission peak ของซีโรโทนิน ตามรูปที่ 3.21



รูปที่ 3.21 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซีโรโทนินและสารรบกวน กับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission 340 nm

จากรูป 3.21 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซีโรโทนินและสารรบกวน ได้แก่ ทริปโตเฟน โดปามีน และแอสคอร์บิก เอซิด กับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าเมื่อทำการกระตุ้นแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 340 nm ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ emission peak ของการวัดซีโรโทนินสูงสุด พบว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงที่สุด และทริปโตเฟนมีผลการรบกวนการวัดซีโรโทนิน ส่วนโดปามีนและแอสคอร์บิก เอซิดให้ผลการรบกวนน้อย

จากนั้นพิจารณาผลรบกวนการวัดซีโรโทนินของสารรบกวนดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10^{-6} M ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของซีโรโทนินในร่างกายคนปกติ โดยกำหนดแกน x คือความยาวคลื่น 300-450 nm และแกน y คือค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ตามรูปที่ 3.22



รูปที่ 3.22 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum เปรียบเทียบ emission peak ของ สารละลาย serotonin, tryptophan, dopamine และ ascorbic acid ใน 0.01 M PBS ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm

รูปที่ 3.22 กราฟที่ได้จากการ Scan fluorescence spectrum เปรียบเทียบ emission peak ระหว่างสารละลายซีโรโทนิน สารละลายทริปโตเฟน สารละลายโดปามีนและสารละลายกรดแอสคอร์บิก เอซิดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ความเข้มข้น 0.01 M กำหนดค่า excitation 280 nm และ emission range 300-450 nm ณ ความเข้มข้น 10^{-6} M เนื่องจากระดับซีโรโทนินในเลือดของคนปกติมีค่าอยู่ระหว่าง $0.27 - 2.27 \times 10^{-6}$ M และเพื่อต้องการจะดูว่าในสภาวะร่างกายคนปกติซีโรโทนินในเลือดมีการรบกวนจากสารอื่นหรือไม่ ซึ่งระดับทริปโตเฟนและแอสคอร์บิก เอซิดในเลือดคนปกติมีค่าอยู่ในระดับเดียวกัน (ค่าปกติทริปโตเฟนเท่ากับ $23-77 \times 10^{-6}$ และค่าปกติแอสคอร์บิก เอซิดเท่ากับ $3.4 - 11.4 \times 10^{-6}$ M) (Mayo Medical Laboratories, USA) จึงสามารถนำสารทั้งสามตัวมาเปรียบเทียบกันได้ ส่วนระดับโดปามีนในเลือดคนปกติมีค่าน้อยกว่า 0.16×10^{-9} M น้อยกว่าระดับซีโรโทนินมาก จึงไม่รบกวนการวัดสารซีโรโทนินที่ความเข้มข้นนี้

เมื่อดูจากกราฟ เมื่อกระตุ้นที่ 280 nm พบว่า emiss peak ของซีโรโทนินที่ 340 nm มีค่าสูงสุด ขณะที่ทริปโตเฟนและแอสคอร์บิก เอซิดมีค่าน้อยกว่าเกือบ 10 เท่า เนื่องจาก excitation และ emission peak ที่วัดเป็นลักษณะเฉพาะสารซีโรโทนิน ซึ่งสารรบกวนอื่นๆ ก็จะมีคุณสมบัติการวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์แตกต่างกันไป ดังนั้น การวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์จึงเพิ่มความจำเพาะได้ในระดับหนึ่ง

3.5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

1. การวัดการดูดกลืนแสงของซีโรโทนิน Absorption peak ของสารละลายซีโรโทนินในช่วงความยาวคลื่น 200-230 nm และ 250-280 nm สามารถตรวจวัดระดับความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินได้ในช่วงความเข้มข้น 10^{-4} M - 10^{-3} M
2. การวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของซีโรโทนิน เมื่อกำหนด Excitation ที่ 250, 280, 336 และ 366 nm และ Emission range 300- 600 nm พบว่าตำแหน่งการกระตุ้นแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 340 nm และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ศึกษามาก่อนหน้า ได้แก่ De Benedetto มีรายงานว่าได้ทำการกระตุ้นซีโรโทนินในสมองของหนูด้วยแสงความยาวคลื่น 279 nm และทำการวัดที่ความยาวคลื่น 340 nm (De Benedetto และคณะ, 2014) และในงานวิจัยของ Bowman ได้ทำการกระตุ้นซีโรโทนินด้วยแสงความยาวคลื่น 295 nm และทำการวัดที่ 330 nm (Bowman และคณะ, 1955) จะเห็นว่าตำแหน่ง Excitation และ Emission ใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงได้เลือกได้การกระตุ้นแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm และทำการวัดที่ความยาวคลื่น 340 nm ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำระบบวัดซีโรโทนินต่อไป
3. ปริมาตรที่เหมาะสมในการวัดสารละลายซีโรโทนินโดยการวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่อง Spectro-microplate reader คือ 180 μ l
4. ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการใช้เป็นตัวทำละลายสารซีโรโทนิน เพื่อใช้ในการวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์คือความเข้มข้นที่ 0.01 M เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์เป็นสารละลายที่ต้านทานการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อมีการเจือจาง ทำให้สามารถรักษาระดับ pH ของสารละลายให้คงที่ และที่ความเข้มข้นสารละลายบัฟเฟอร์สูงๆ จะมีความแรงไอออน (Ionic Strength) ที่สูง ซึ่งจะช่วยในการรักษาการเปลี่ยนแปลงของสารไว้ การใช้บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ จึงทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงได้มากกว่า
5. เวลาในการวัดสารละลายซีโรโทนินทุกๆ 30 นาทีให้ค่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ไม่แตกต่างกันภายในเวลา 120 นาที ซึ่งผลการวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์แต่ละครั้งจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในลักษณะขึ้นลง เนื่องมาจากการเปล่งแสงของฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นกับความเข้มแสงที่มากระตุ้น ส่งผลให้อิเล็กตรอนของซีโรโทนินมีพลังงานสูงขึ้นตามระดับพลังงานที่ได้รับ ซึ่งสภาวะนี้จะไม่คงตัว การคายพลังงานออกมาในรูปแบบของแสงฟลูออเรสเซนซ์ จึงมีค่าเปลี่ยนแปลงขึ้นลงบ้างเล็กน้อย แต่ก็ไม่ได้ทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

6. สารรบกวนการวัดซีโรโทนิน ได้แก่ ทริปโตเฟน โดปามีน และกรดแอสคอร์บิก เอซิด เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดมาเปรียบเทียบกับซีโรโทนินที่ระดับความเข้มข้นที่พบในเลือดคนปกติ (μM) และทำการวัดที่ความยาวคลื่น 340 nm พบว่าทริปโตเฟนและแอสคอร์บิก เอซิดมีค่าน้อยกว่าซีโรโทนินเกือบ 10 เท่า ทว่าทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นในการผลิตซีโรโทนินในร่างกาย จึงอาจมีผลในการรบกวนการวัดซีโรโทนินมาก ส่วนโดปามีนที่ระดับปกติในเลือดมีค่าน้อยกว่าระดับปกติของซีโรโทนินมาก (ระดับปกติของโดปามีนในเลือด $< 0.16 \text{ nM}$) ดังนั้นจึงรบกวนการวัดของซีโรโทนินน้อย
7. Spectro-microplate reader (Synergy Mx monochromator-based multi-mode microplate reader เป็นเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ สามารถวัดได้ถึงระดับต่ำสุดที่ 10^{-6} M ($1.0 \mu\text{mol/L}$)

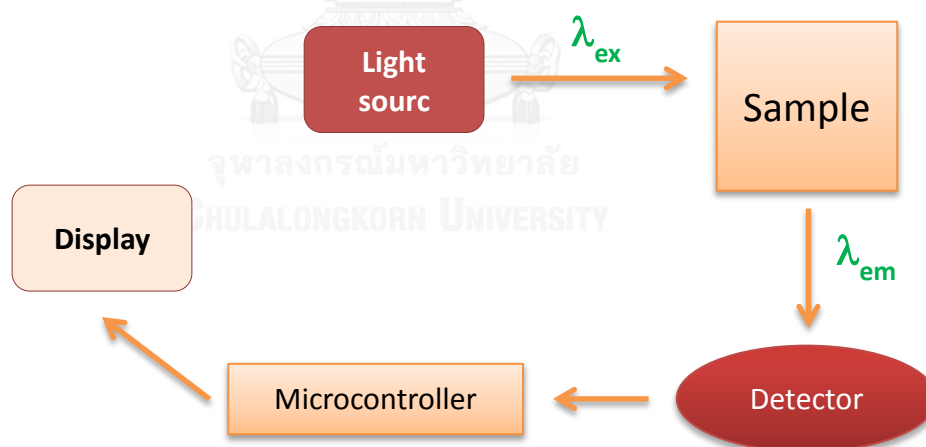


4. ออกแบบและพัฒนาเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา ด้วยเทคนิค Fluorometry

การออกแบบและพัฒนาเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพาด้วยเทคนิค Fluorometry โดยอาศัยคุณสมบัติการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของซีโรโทนินที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติของสารซีโรโทนินเบื้องต้น เพื่อนำมาใช้ในการพิจารณาออกแบบระบบให้สามารถตรวจวัดซีโรโทนินในสารละลายได้

4.1 หลักการทำงานของระบบตรวจวัดซีโรโทนินด้วยเทคนิค Fluorometry

รูปที่ 4.1 แสดงโครงสร้างของระบบวัด ซึ่งประกอบด้วย แหล่งกำเนิดแสง (Light source) แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะส่องผ่านไปยังสารตัวอย่างที่บรรจุอยู่ใน Cuvette แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เรืองออกมาจะถูกวัดโดยโฟโตดีเทคเตอร์ เพื่อลดการรบกวนของแสงจากแหล่งกำเนิดแสง จึงจัดเรียงวางให้โฟโตดีเทคเตอร์และแหล่งกำเนิดแสงทำมุมในแนวตั้งฉาก สัญญาณที่ได้จากโฟโตเดเทคเตอร์จะถูกส่งไปยังไมโครคอนโทรลเลอร์ (Microcontroller) เพื่อทำการประมวลผลสัญญาณและแปรผลให้ออกมาเป็นตัวเลขผ่านหน้าจอแสดงผล



รูปที่ 4.1 ระบบตรวจวัดซีโรโทนินด้วยเทคนิค Fluorometry

4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการประกอบเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา

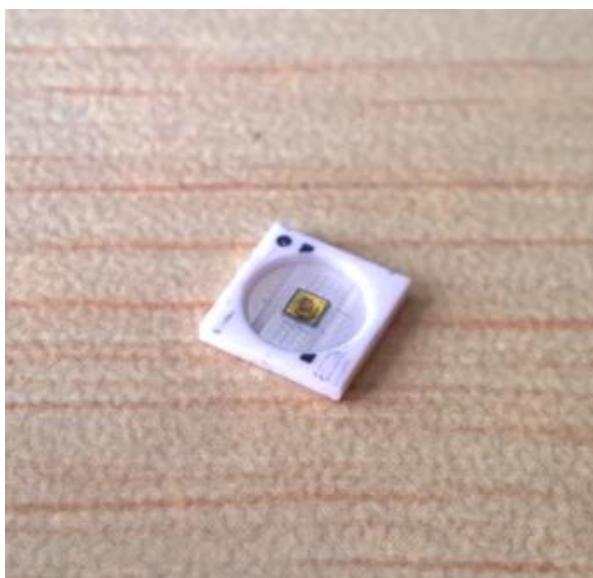
4.2.1 แหล่งกำเนิดแสง (Light source)

จากการศึกษาคุณสมบัติของสารซีโรโทนินเบื้องต้น ความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมในการกระตุ้นซีโรโทนินคือแสงที่มีความยาวคลื่น 280 nm ดังนั้นแหล่งกำเนิดแสงที่นำมาใช้ก็คือหลอด LED

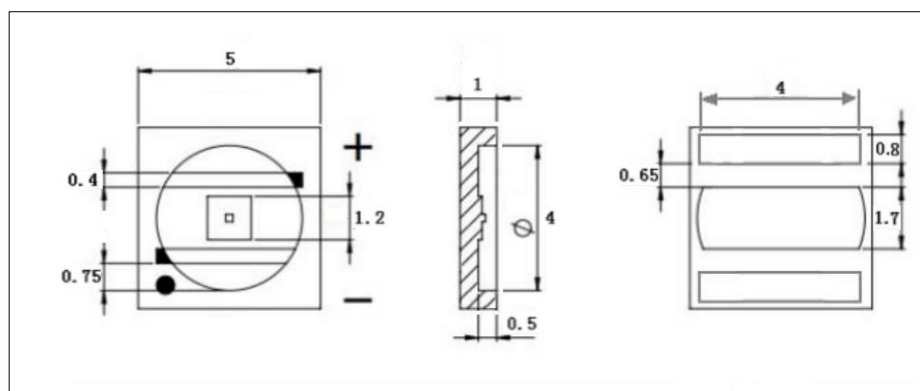
(Light-emitting diode) ซึ่งให้แสงในความยาวคลื่นนี้ได้ ในการศึกษาได้ทำการทดสอบหลอด LED ที่จะใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสง 2 ชนิด ได้แก่ LED HH-5050SMD-280 และ M35C1F01Z0

1. หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280

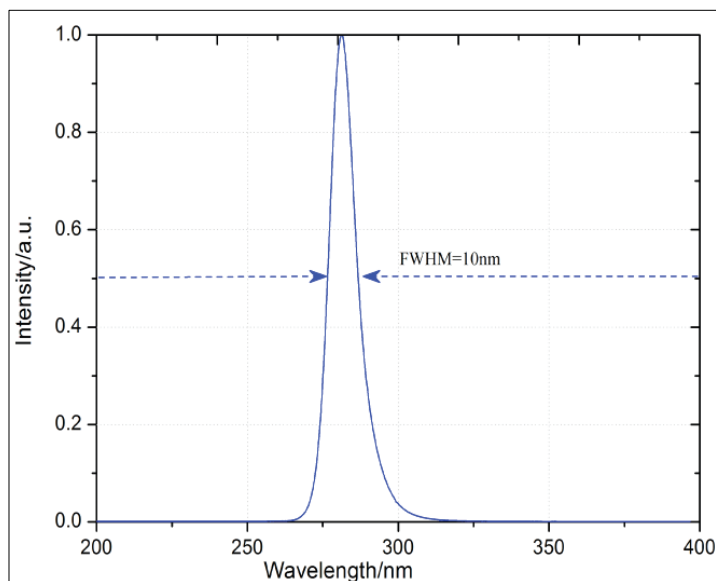
หลอด LED 280 nm รุ่น HH-5050SMD ให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 275 – 285 นาโนเมตร และสูงสุดที่ 280 nm ทำงานที่แรงดัน 5.0 – 7.0 โวลต์ (Volt) วัสดุฐานทำจากเซรามิก อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3 ceramics) มีขนาดเล็กเพียง 5 x 5 x 0.5 มิลลิเมตร สะดวกต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานที่มีขนาดเล็ก



รูปที่ 4.2 ภาพหลอด LED 280 nm รุ่น HH-5050SMD-280 (szsealand, China)



รูปที่ 4.3 Outline Dimensions (Unit : mm) (szsealand, China)



รูปที่ 4.4 Optical Characteristics ($T=25^{\circ}\text{C}$, $I_F=20\text{mA}$) (szsealand, China)

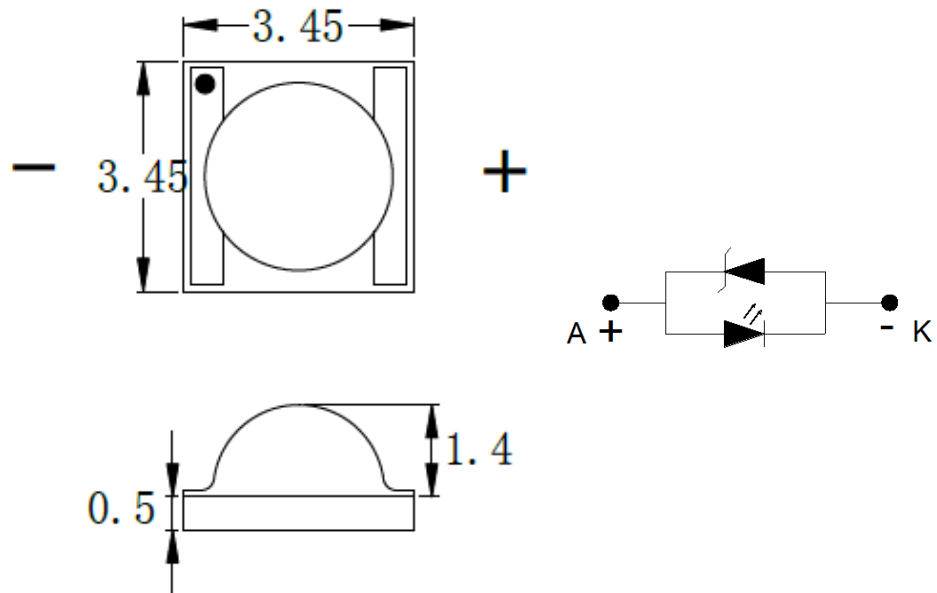
2. หลอด LED รุ่น M35C1F01Z0

หลอด LED 280 nm รุ่น M35C1F01Z0 จากบริษัท Bytech Electronics Co., Ltd. ซึ่งเป็นหลอด UV LED ที่ใช้เทคนิค CMH (CMH technology platform) ซึ่งเป็นเทคนิคการขึ้นรูปชิ้นส่วนอุปกรณ์โดยใช้เซรามิก (Ceramic) โลหะ (metal) และแก้วแข็ง (hard glasses) ทำให้ได้หลอด UV LED ที่มีความน่าเชื่อถือสูง และยังป้องกันไฟฟ้าสถิตย์ด้วย

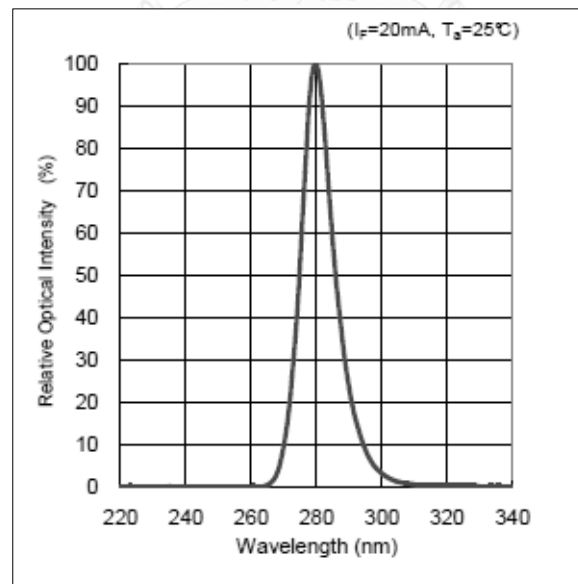
ตัวหลอด LED ให้พลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่น 270 – 290 นาโนเมตร และสูงสุดที่ 280 nm ทำงานที่แรงดัน 5.0 – 7.0 โวลต์ (Volt) มีขนาด 3.5 x 3.5 x 1.9 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.5 ภาพหลอด LED 280 nm รุ่น Deep UV LED M35C1F01Z0
(Bytech Electronics Co., Ltd., 2014)



รูปที่ 4.6 Outline Dimensions (Unit : mm) (Bytech Electronics Co., Ltd.,2014)



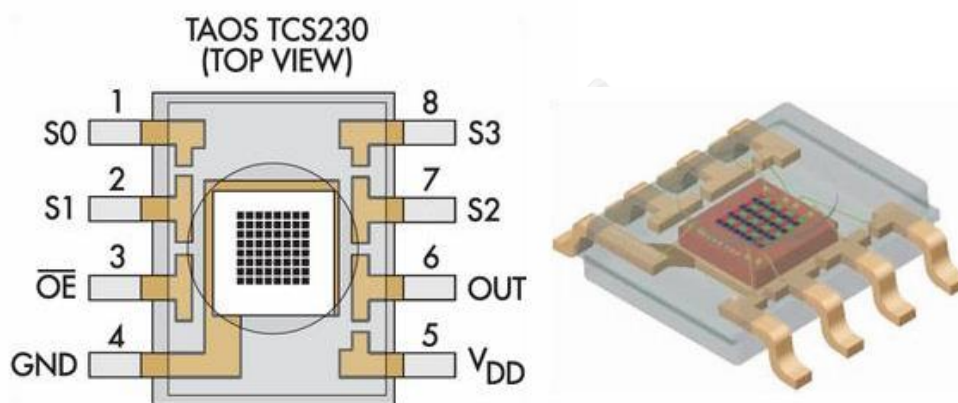
รูปที่ 4.7 Relative Spectrum Power Distribution ($T=25^\circ\text{C}$, $I_F= 20\text{mA}$)
(Bytech Electronics Co., Ltd.,2014)

4.2.2 โฟโตดีเทคเตอร์ (Photo detector)

จากการศึกษาคุณสมบัติของสารซีโรโทนินเบื้องต้น เมื่อซีโรโทนินถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 280 nm สามารถวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เรืองออกมาสูงสุด (Emission peak) ที่ความยาวคลื่น 340 nm ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้ตัวตรวจจับสัญญาณที่สามารถวัดย่านความยาวคลื่นในช่วงนี้ได้ ตัวตรวจจับสัญญาณที่นำมาใช้เป็นโฟโตดีเทคเตอร์ มี 2 แบบ ได้แก่ TCS230 และ ML8511

1. ET- TCS230

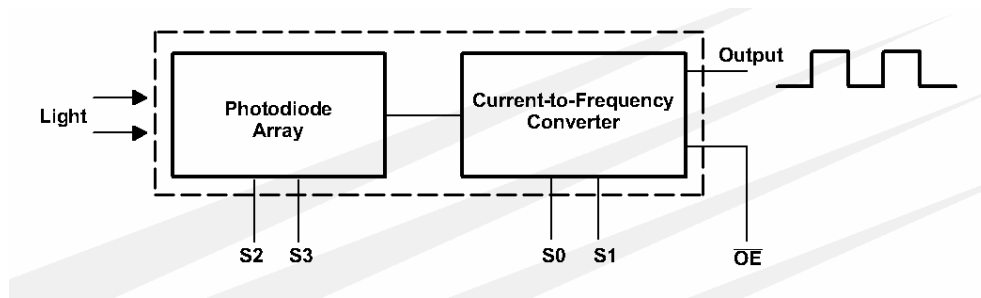
เป็นอุปกรณ์ที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสว่างของสีที่มากกระทบเซนเซอร์ และให้ค่าออกมาเป็นสัญญาณความถี่สี่เหลี่ยม (Square wave) โดยค่าความถี่จะมีผลความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าความเข้มแสงที่มากกระทบตัวเซนเซอร์ โดยโครงสร้างของ TCS230 นั้นจะประกอบไปด้วย โฟโตไดโอดขนาด 8x8 ตัว โดยสามารถเลือกใช้ฟิลเตอร์ได้ 4 กลุ่ม คือ ฟิลเตอร์สีแดง (Red) , เขียว (Green) , น้ำเงิน (Blue) และ แบบไม่มีฟิลเตอร์ (Clear : no filter) ซึ่งแต่ละกลุ่มก็จะตอบสนองต่อสนองต่อความสว่างของสีแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของฟิลเตอร์นั้นๆ



รูปที่ 4.8 ภาพ Top view ของเซนเซอร์ TCS230 (TAOS, 2003)

การทำงานของอุปกรณ์ตรวจวัดค่าสี

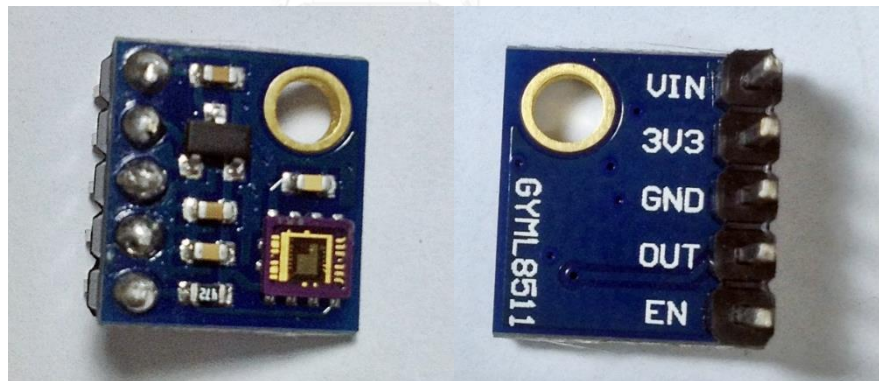
แสง(Light) จะเข้ามาตกกระทบที่โฟโตไดโอด (Photodiode Array) ซึ่งเราสามารถเลือกชนิดฟิลเตอร์ของโฟโตไดโอด ได้จากขาสัญญาณ S2 และ S3 โดยผลที่ได้จะอยู่ในรูปของกระแสไฟฟ้า และ จะถูกส่งไปยัง Current-to-Frequency Converter เพื่อทำหน้าที่แปลงกระแสไฟฟ้าให้เป็นสัญญาณความถี่ออกไปที่ขาสัญญาณ Output โดยมี S0 และ S1 เป็นตัวกำหนดช่วงของสัญญาณความถี่ที่เราต้องการ (ETT Co.,Ltd., 2005) ตามรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ภาพบล็อกไดอะแกรมการทำงานของเซนเซอร์ TCS230 (TAOS, 2003)

2. ML8511 (อุปกรณ์ตรวจวัดความเข้มแสงอุลตราไวโอเล็ต)

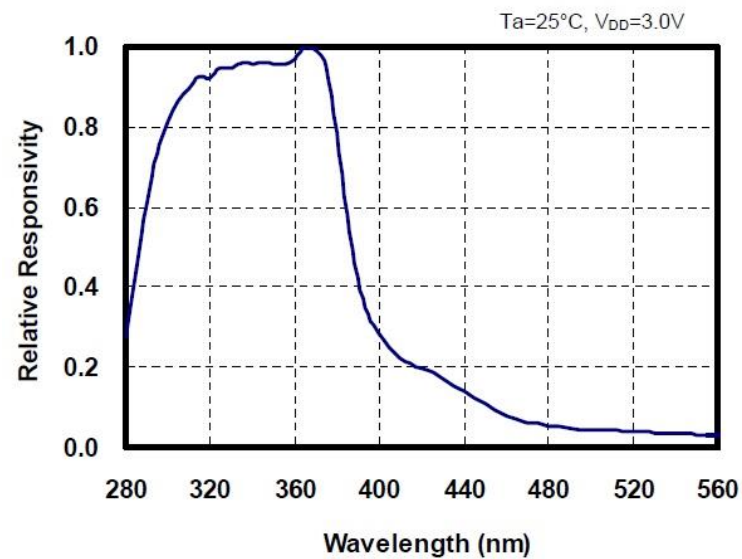
ML8511 เป็นเซนเซอร์ตรวจจับความเข้มแสงรังสีอุลตราไวโอเล็ต มีความไวในช่วง UV-A (315-365 nm) และ UV-B (280-315 nm) มี internal amplifier แปลงสัญญาณความเข้มแสงอุลตราไวโอเล็ตเป็นค่าแรงดันไฟฟ้าแบบแอนะล็อก ใช้ไฟน้อยเพียง 2.7 - 3.6 โวลต์ และมีขนาดเล็กเท่ากับ $4.0 \times 3.7 \times 0.73$ มิลลิเมตรเหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุปกรณ์ที่มีขนาดเล็ก



(ก) ด้านหน้า

(ข) ด้านหลัง

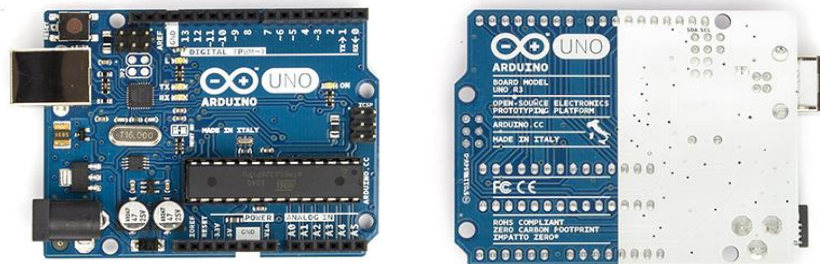
รูปที่ 4.10 ภาพ UV sensor (ML8511)



รูปที่ 4.11 Spectral responsivity characteristics ของ ML511
(LAPIS Semiconductor, 2003)

4.2.3 ไมโครคอนโทรลเลอร์ (Microcontroller)

ไมโครคอนโทรลเลอร์เป็นอุปกรณ์ควบคุมการทำงานขนาดเล็ก โดยสามารถเขียนโปรแกรมป้อนเข้าไปเพื่อควบคุมการทำงานอุปกรณ์ต่างๆ ได้ตามต้องการ ซึ่งภายในไมโครคอนโทรลเลอร์จะประกอบไปด้วย หน่วยความจำเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคำนวณ หน่วยประมวลผลและพอร์ตอินพุต Output โดยไมโครคอนโทรลเลอร์ที่นำมาใช้ในการควบคุมการทำงานของหลอด LED และ Detector รวมถึงการแสดงผลผ่านหน้าจอคือ Arduino Uno R



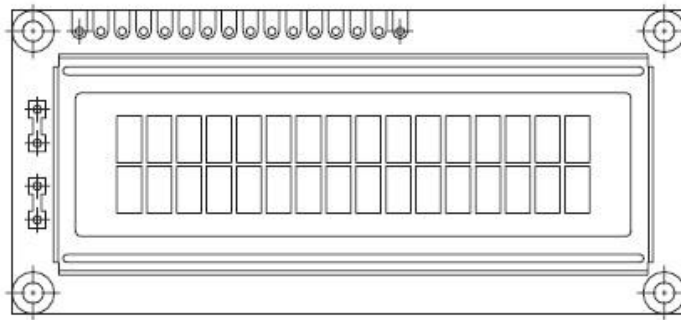
(ก) ด้านหน้า

(ข) ด้านหลัง

รูปที่ 4.12 Arduino Uno R3 (<http://www.arduino.cc/>)

4.2.4 หน้าจอ LCD (Liquid Crystal Display)

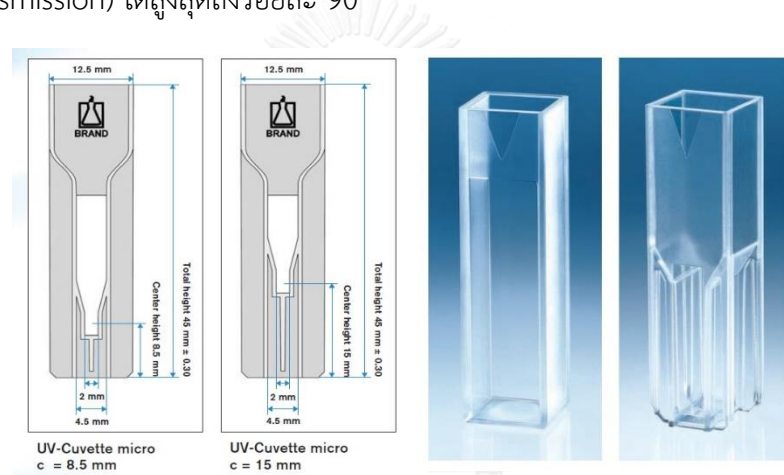
หน้าจอแสดงผลที่ใช้คือ หน้าจอ Character LCD ขนาด 16 ตัวอักษร จำนวน 2 บรรทัด มีการเชื่อมต่อแบบ I2C ใช้เชื่อมต่อกับบอร์ด Arduino ซึ่งจะนำค่าที่ได้จาก Detector มาแสดงที่หน้าจอแสดงผลตามคำสั่งที่เราป้อนเข้าไป



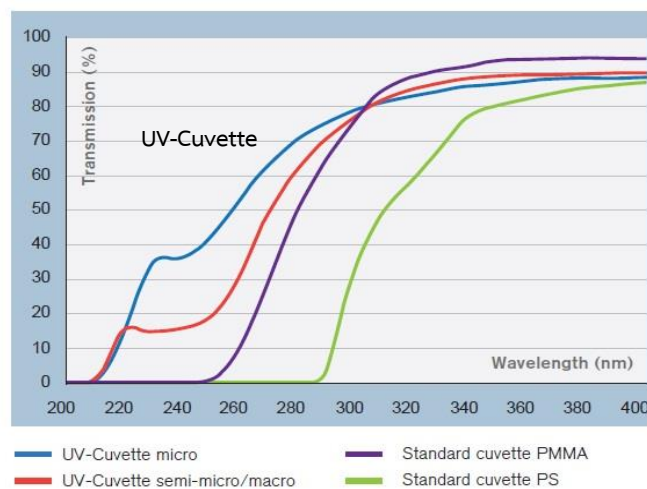
รูปที่ 4.13 ภาพจอ LCD ขนาด 16 ตัวอักษร จำนวน 2 บรรทัด

4.2.5 Cuvette

คิวเวตต์ (Cuvette) หรือภาชนะบรรจุสารตัวอย่างเพื่อใช้รับแสงกระตุ้นที่ส่องเข้ามาและผ่านแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกไปในแนวตั้งฉาก คิวเวตต์ที่เหมาะสมจะนำมาใช้งานที่มีแสงกระตุ้นอยู่ในช่วงแสงอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Radiation, UV) ในช่วงความยาวคลื่น 100–400 nm คือคิวเวตต์ที่ทำจากควอตซ์ (Quartz) เนื่องจากควอตซ์จะไม่ดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเล็ต แสงจึงสามารถส่องผ่านเข้าไปกระตุ้นสารตัวอย่างที่บรรจุอยู่ข้างในคิวเวตต์ได้ แต่เนื่องจากคิวเวตต์ที่ทำจากควอตซ์มีราคาสูง จึงได้เลือกใช้ UV-Cuvette micro ขนาด 12.5 x 12.5 x 45 มิลลิเมตร ที่สามารถบรรจุสารตัวอย่างได้ในช่วง 70 -850 μl ซึ่งสามารถใช้ในการวัดแสงในช่วงความยาวคลื่น 230-900 nm จากรูปที่ 4.15 จะเห็นว่า UV- Cuvette micro มีค่าแสงอุลตราไวโอเล็ตสามารถส่องผ่าน(% Transmission) ได้สูงสุดถึงร้อยละ 90



รูปที่ 4.14 ภาพขนาดของ UV-Cuvette micro (BRAND GMBH + CO KG)



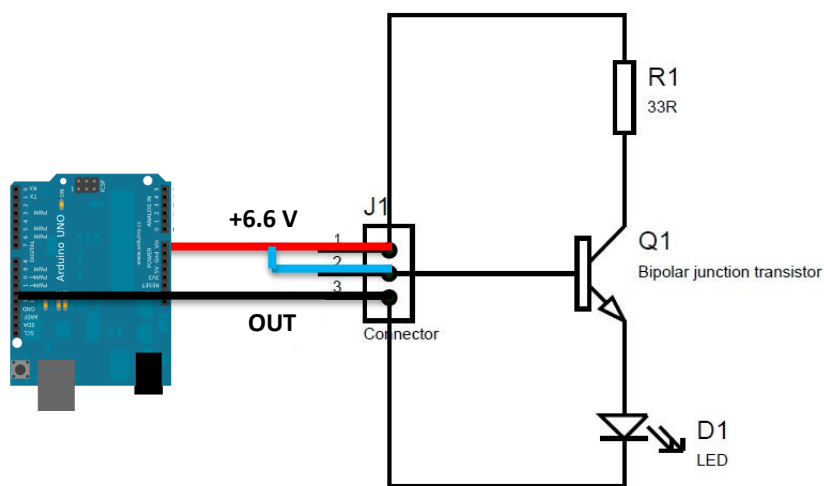
รูปที่ 4.15 Transmission curves of different cuvettes (BRAND GMBH + CO KG)

4.3 การประกอบระบบเครื่องตรวจวัด

ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงการเชื่อมต่ออุปกรณ์แต่ละส่วนเข้าเป็นระบบวัด โดยจะกล่าวถึงวงจรขับหลอด LED และ Detector จากนั้นจะกล่าวถึงโปรแกรมควบคุมการทำงานของ LED และ Detector ผ่าน Arduino Uno R3 และให้แสดงผลผ่านจอ LCD

4.3.1 วงจรขับหลอด LED

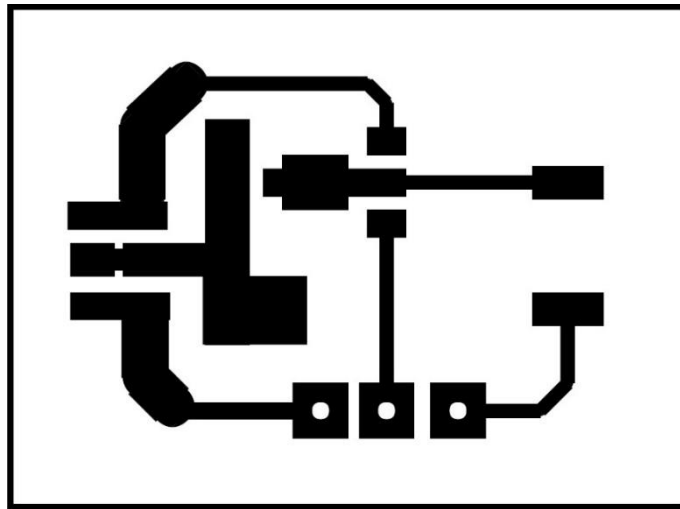
วงจรขับหลอด LED ทั้งรุ่น HH-5050SMD-280 และรุ่น M35C1F01Z0 มีการต่อวงจรคล้ายกันตามรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 วงจรขับหลอด LED

การขับหลอด LED ให้ทำงานนั้น ใช้วงจรที่ประกอบไปด้วย Transistor ชนิด Bipolar Junction Transistor (BJT) ซึ่งจะทำหน้าที่เปิดปิดวงจรตามคำสั่งที่ได้รับมาจาก Arduino เพื่อให้หลอด LED เปิดหรือปิด และตัวต้านทานที่ทำหน้าที่ควบคุมค่ากระแสไฟฟ้าที่ส่งไปยังหลอด LED เพื่อให้ได้กระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมใช้ในวงจร

จากรูปที่ 4.16 แสดงการเชื่อมต่อวงจรของหลอด LED และได้ทำการออกแบบแผ่นปริ้นต์ดังรูปที่ 4.17

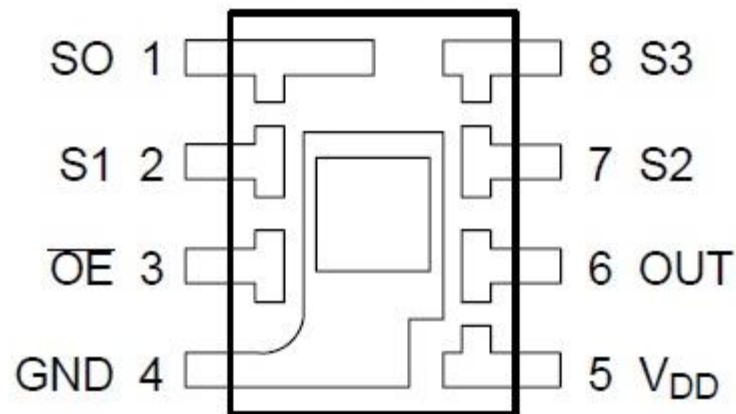


รูปที่ 4.17 วงจรแผ่นปริ้นส์ PCB แสดงการเชื่อมต่อหลอด LED

4.3.2 วงจรขับ Detector

1. วงจรขับ TCS230

TCS230 มีโครงสร้างของขาสัญญาณ ดังรูปที่ 4.18



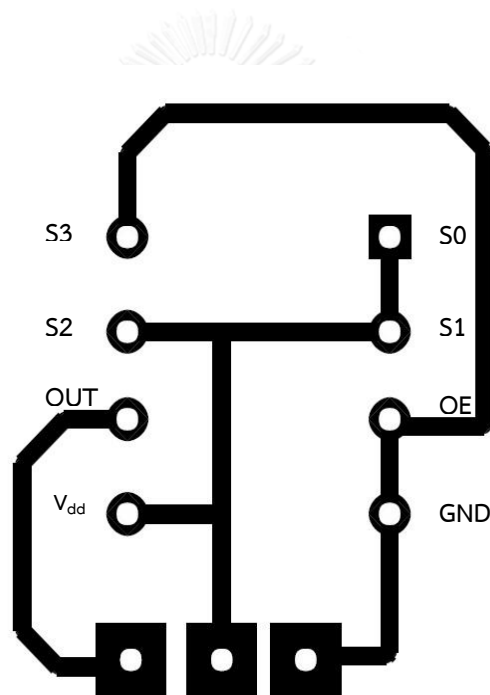
รูปที่ 4.18 ภาพขาสัญญาณต่างๆ ของ TCS230 (TAOS, 2003)

การกำหนดขาสัญญาณเพื่อให้เซนเซอร์ทำงานเป็นดังต่อไปนี้

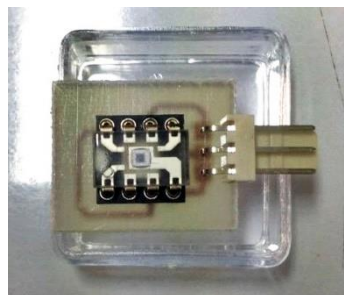
- ขาสัญญาณ S0 และ S1 เป็นขาสัญญาณเลือกกระดบของสัญญาณความถี่ Output (f_0) กำหนดลอจิกเป็น S0= 1 (High) และ S1= 1(High) เพื่อเลือกกระดบความถี่สูงสุด

- ขาสัญญาณ S2 และ S3 กำหนดชนิดของฟิลเตอร์โฟโตไดโอดที่เราต้องการอ่านค่า โดยจะกำหนด S2= 1 และ S3= 0 เลือกเป็นแบบไม่มีฟิลเตอร์ (Clear: no filter)
- ขาสัญญาณ OE เป็นขาสัญญาณ Enable สัญญาณความถี่ Output ทำงานที่ลอจิก 0
- ขาสัญญาณ 5 V_{dd} ต่อกับแหล่งจ่ายไฟ 5 โวลท์
- ขาสัญญาณ OUT ขาสัญญาณ Output ให้ค่าออกมาเป็นความถี่
- ขาสัญญาณ GND ต่อลง ground

เมื่อได้วงจรแล้วก็ออกแบบวงจรแผ่นปริ้นท์ PCB ด้วยโปรแกรม Proteus 8 Professional ดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 วงจรแผ่นปริ้นท์ PCB แสดงการเชื่อมต่อ TCS230

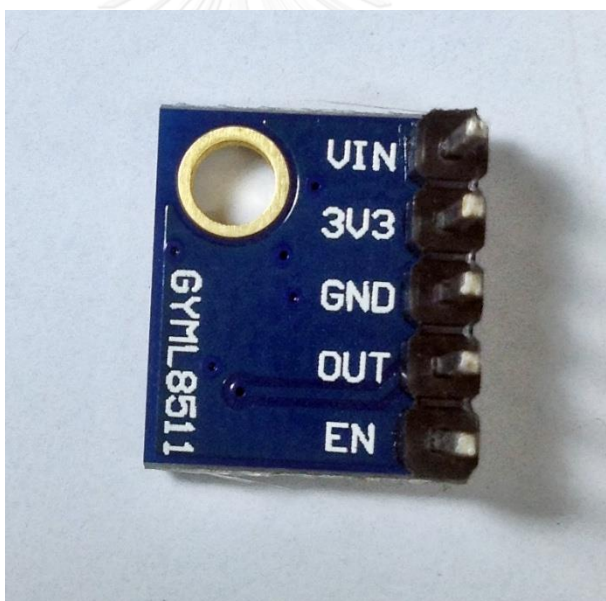


รูปที่ 4.20 วงจร TCS230

2. วงจรขับ ML8511

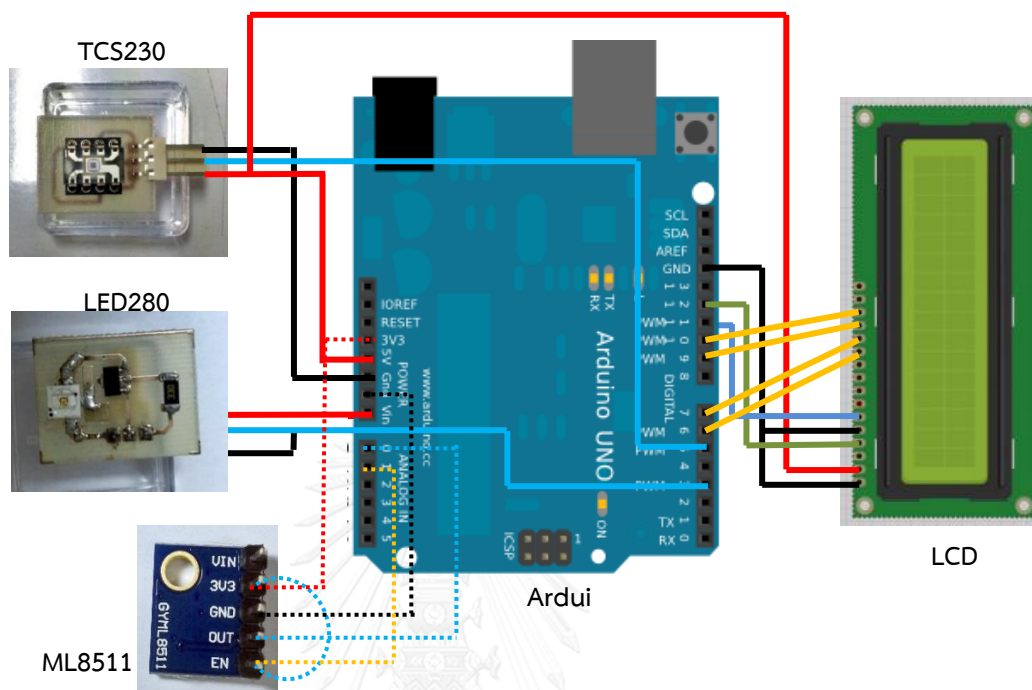
UV sensor ML8511 เป็นอุปกรณ์ที่พร้อมใช้งาน โดยกำหนดขาสัญญาณ 5 ขา ตามรูปที่ 4.21 เพื่อให้เซ็นเซอร์สามารถทำงานได้ ดังนี้

- Vin (Input Voltage) เป็นขาสำหรับป้อนแรงดันไฟฟ้าตั้งแต่ -0.3 to + 4.6 โวลต์
- 3V3 (Operating Voltage) เป็นขาสำหรับป้อนแรงดัน 3.3 โวลต์ โดยทั่วไป เซ็นเซอร์จะทำงานได้ที่แรงดัน 3.3 โวลต์ ไปจนถึงระดับที่แรงดันของ Vin สามารถรับได้
- GND ขาสัญญาณที่ต่อลง Ground
- OUT เป็นขาสัญญาณ output
- EN (enable pin) เป็นขาสัญญาณที่กำหนดให้เซ็นเซอร์ทำงาน (กำหนดเป็น High) หรือไม่ทำงาน (กำหนดเป็น Low)



รูปที่ 4.21 ภาพขาสัญญาณต่างๆ ของ ML8511

4.4 การเชื่อมต่อ Arduino กับอุปกรณ์ต่างๆ



รูปที่ 4.22 ภาพการเชื่อมต่อ Arduino กับอุปกรณ์ต่างๆ

4.4.1 การเชื่อมต่อ Arduino กับหลอด LED

วงจร LED มีขาสัญญาณควบคุม 3 ขา โดยขาสัญญาณ 1 เป็นขาที่ต่อกับแหล่งจ่ายไฟช่อง V_{in} ของ Arduino โดยช่อง V_{in} จะให้แรงดันตามที่จ่ายผ่าน External power supply ซึ่งจะป้อนแรงดันให้ที่ 6.6 โวลต์ ขาสัญญาณที่ 2 เป็นขา Base จาก Transistor ต่อกับ D3 ของ Arduino สำหรับรับคำสั่งเปิดปิดหลอดไฟ และขาที่ 3 ต่อกับ ground ตามรูปที่ 4.22

4.4.2 การเชื่อมต่อ Arduino กับ TCS230

วงจรของเซนเซอร์ TCS230 มีขาสัญญาณควบคุม 3 ขาเช่นเดียวกัน โดยมีขา Output ต่อกับช่อง D5 ของ Arduino ส่วนอีกสองขาต่อกับไฟ 5 โวลต์ และ ground ตามรูปที่ 4.22 วงจรจะส่งค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มแสง และส่งต่อให้กับ Arduino เพื่อนำไปประมวลผลและแสดงผลต่อไป

4.4.3 การเชื่อมต่อ Arduino กับหน้าจอ LCD

หน้าจอ Character LCD ขนาด 16 ตัวอักษร จำนวน 2 บรรทัด มีการเชื่อมต่อแบบ I2C ใช้เชื่อมต่อกับบอร์ด Arduino ซึ่งตำแหน่งของขาและหน้าที่การใช้งานของหน้าจอ LCD มีการเชื่อมต่อกับ Arduino ตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การเชื่อมต่อ Arduino กับหน้าจอแสดงผล LCD 12C

ขาที่	สัญลักษณ์	ตำแหน่งที่ต่อกับ Arduino port	รายละเอียด
1	VSS	Ground	ต่อลง Ground
2	VDD	+5V	ต่อกับ Power Supply
3	VO	-	ต่อกับ 10k potentiometer ปรับความเข้มของจอ
4	RS	D12	ติดต่อกับรีจิสเตอร์ข้อมูล (Data Register)
5	R/W	Ground	เขียนข้อมูลไปยัง LCD โมดูล
6	E	D11	Enable Signal
7 - 10	DB0-DB3	-	Data Bus
11	DB4	6	Data Bus
12	DB5	7	Data Bus
13	DB6	9	Data Bus
14	DB7	10	Data Bus
15	A	-	Back Light +5V (สำหรับรุ่นที่มี Back Light)
16	K	-	Back Light 0V (สำหรับรุ่นที่มี Back Light)

4.4.4 การเชื่อมต่อ Arduino กับ ML8511

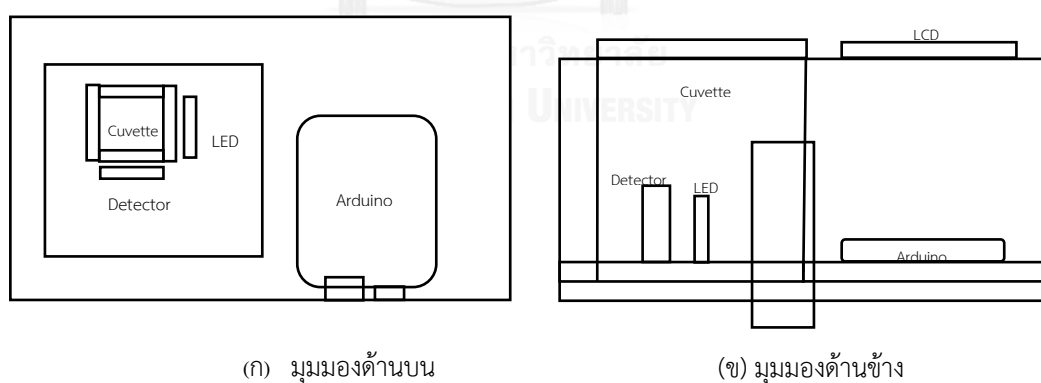
วงจรของเซนเซอร์ ML8511 มีขาควบคุมสัญญาณ 5 ขา โดยเชื่อมต่อกับบอร์ด Arduino ตามตารางที่ 4.2 โดยให้สัญญาณ Output เป็นแรงดันไฟฟ้าแบบแอนะล็อก โดยจะเปลี่ยนแปลงตามความเข้มแสง ซึ่งในสถานะที่ไม่มีแสง Output voltage จะอยู่ที่ 0.95-1.05 โวลท์

ตารางที่ 4.2 การเชื่อมต่อ Arduino กับ ML8511

ขาที่	สัญลักษณ์	ตำแหน่งที่ต่อกับ Arduino port	รายละเอียด
1	Vin	-	Input Voltage (-0.3 to +4.6 V)
2	3V3	+3.3V	ต่อกับ Power Supply
3	GND	Ground	ต่อลง Ground
4	OUT	A0	สัญญาณ Output เป็นแรงดันไฟฟ้าแบบแอนะล็อก
5	END	A1, +3.3V	Active high enable pin และต่อกับไฟ +3.3V เพื่อใช้เป็น Reference ให้กับสัญญาณขาออก

4.5 การสร้างกล่องเครื่องมือ

ในการตรวจวัดซีโรโทนินต้องทำในระบบปิดเพื่อป้องกันแสงรบกวนจากภายนอก โดยสร้างกล่องเครื่องมือด้วยแผ่นอะคริลิกสีดำทึบ (Acrylic) ขนาด 13 x 20 เซนติเมตร ภายในประกอบไปด้วยพื้นที่ใส่อุปกรณ์ตรวจวัด บอร์ด Arduino และช่องใส่ Cuvette โดยให้หลอด LED กับ Detector วางในลักษณะตั้งฉากกันและอยู่ติดกับช่องใส่ Cuvette เพื่อสามารถให้แสงไปกระตุ้นสารตัวอย่างและรับแสงที่ปล่อยออกมาได้โดยตรง



รูปที่ 4.23 ภาพแบบร่างกล่องเครื่องมือวัดซีโรโทนิน (ก) มุมมองด้านบน และ (ข) ด้านข้าง



รูปที่ 4.24 ภาพเครื่องตรวจวัดซีโรโตนินแบบพกพา



5. การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา ด้วยเทคนิค Fluorometry

5.1 ทดสอบการทำงานของระบบตรวจวัดซีโรโทนิน

5.1.1 ให้ Detector เป็น ML8511

กำหนดให้ Detector เป็น ML8511 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งแสงออกมาจากสารละลายซีโรโทนินที่ถูกกระตุ้นด้วย Light source ชนิดต่างๆ ดังนี้

1. UV จากแสงแดด
2. หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280
3. หลอด LED รุ่น M35C1F01Z0

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เชื่อมต่อวงจรขับ ML8511 นำไปวัดกับแสงแดด เพื่อทดสอบการทำงานของเซ็นเซอร์
2. เตรียมสารละลายซีโรโทนินความเข้มข้น 10^{-2} M
3. นำสารละลายซีโรโทนินที่เตรียมไว้ใส่ Cuvette นำไปวัดด้วยเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา โดยใช้ Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280
4. ทำซ้ำข้อ 3 แต่เปลี่ยน Light source เป็นหลอด LED รุ่น M35C1F01Z0

5.1.2 ให้ Detector เป็น TCS230

กำหนดให้โฟโตดีเทคเตอร์ TCS230 เป็น Detector และทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งแสงออกมาจากสารละลายซีโรโทนินที่ถูกกระตุ้นด้วย Light source ชนิดต่างๆ ดังนี้

1. หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280
2. หลอด LED รุ่น M35C1F01Z0
3. หลอด LED สองชนิดร่วมกัน
4. หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอด

ขั้นตอนการดำเนินงาน

เปรียบเทียบชนิดของหลอด LED ที่ใช้เป็น Light source

1. เตรียมสารละลายซีโรโทนินความเข้มข้น $10^{-9} - 10^{-2}$ M
2. นำสารละลายซีโรโทนินแต่ละความเข้มข้นใส่ cuvette นำไปวัดด้วยเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา โดยใช้ Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 โดยใช้ PBS buffer เป็น Blank วัดซ้ำ 3 ครั้งเพื่อนำไปหาค่าเฉลี่ย
3. ทำซ้ำข้อ 2 แต่เปลี่ยน Light source เป็นหลอด LED รุ่น M35C1F01Z0
4. ทำซ้ำข้อ 2 แต่เปลี่ยน Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 ร่วมกับหลอดรุ่น M35C1F01Z0
5. ทำซ้ำข้อ 2 แต่เปลี่ยน Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอด
6. บันทึกผล

5.2 ทดสอบประสิทธิภาพและการใช้งานที่เหมาะสมของระบบเครื่องวัดซีโรโทนินแบบพกพา

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เตรียมสารละลายซีโรโทนินความเข้มข้น $10^{-9} - 10^{-3}$ M
2. นำสารละลายซีโรโทนินที่เตรียมได้แต่ละความเข้มข้นใส่ cuvette 450 μ l นำไปวัดด้วยเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา โดยวัดเริ่มต้นจากความเข้มข้นต่ำไปความเข้มข้นสูง และวัดจากความเข้มข้นสูงไปต่ำ
3. เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการวัด โดยวัดทุก 5 นาที ไปจนถึง 25 นาที
4. เปรียบเทียบการวัดตัวอย่างด้วยเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบต่อเนื่อง 15 นาทีกับสลับปิด-เปิดเครื่องใหม่ในแต่ละรอบของการวัด
5. เปรียบเทียบการใช้ Cuvette ชนิด UV- Cuvette micro และ UV quartz ในการบรรจุสารตัวอย่างที่ใช้ในการวัด
6. ทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือ แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้
 - 6.1 ทดสอบความเที่ยงตรงในการวัดซ้ำหลายๆ ครั้ง ในสภาวะเดียวกัน วันเดียวกัน (Repeatability, Within day precision) โดยทำการวัดซ้ำ 10 ครั้งจากตัวอย่างเดียวกันภายในวันเดียว
 - 6.2 ทดสอบความเที่ยงตรงในการวัดระหว่างวัน (Intermediate precision, day to day precision) โดยทำการวัดซ้ำระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน
7. ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection) ของซีโรโทนิน และสารรบกวนอื่นได้แก่ทริปโตเฟน โดปามีน และแอสคอร์บิกแอซิด

5.3 ผลการทดสอบการทำงานของระบบตรวจวัดซีโรโทนิน

5.3.1 ผลการใช้ ML8511 เป็น Detector

ตารางที่ 5.1 Output ที่ได้จากการให้ detector เป็น ML8511 โดยแบ่งชนิดของ Light source ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ UV จากแสงแดด, LED รุ่น HH-5050SMD-280 และ LED รุ่น M35C1F01Z0

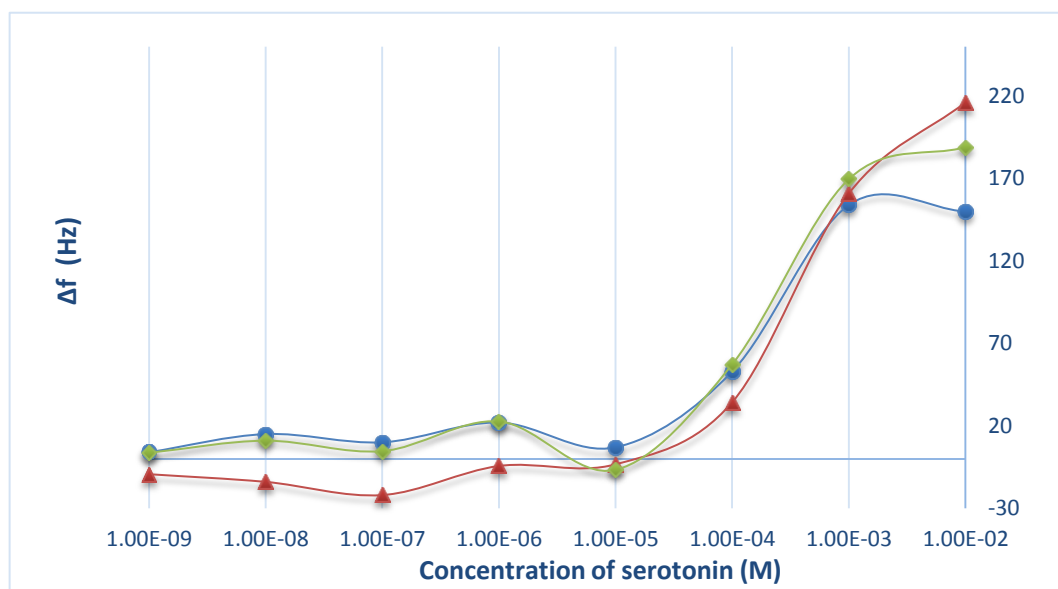
ชนิดของ Light source ที่ใช้	Output (Volt)
UV จากแสงแดด (ไม่ได้ใช้วัดร่วมกับสารตัวอย่าง)	1.6- 1.9
หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280	0.98
หลอด LED รุ่น M35C1F01Z0	0.98

จากตารางที่ 5.1 แสดงค่า Output ที่ได้จากการใช้ detector เป็น ML8511 เป็น โดยแบ่งชนิดของ Light source ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280, หลอด LED รุ่น M35C1F01Z0 และ UV จากแสงแดด (100-400 nm, CCOHS) จากนั้นนำไปวัดสารละลายซีโรโทนินความเข้มข้น 10^{-2} M โดยเริ่มจากการทดสอบการทำงานของ UV sensor โดยการนำไปวัดแสงอุลตราไวโอเล็ตจากแสงแดด โดยค่าเริ่มต้นของระบบมีค่าเท่ากับ 0.98 โวลท์ พบว่า สัญญาณ output มีค่าการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้น แสดงว่า UV sensor สามารถทำงานได้ แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นแสงแดดไม่ได้มีเพียงแสงอุลตราไวโอเล็ตเท่านั้น ยังมีแสงในช่วงที่มองเห็นได้ (Visible light) และแสงอินฟราเรด (Infrared) อีกด้วย ซึ่งค่าการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นนี้อาจจะไม่ได้มาจากแสงย่านอุลตราไวโอเล็ตเท่านั้น

จากนั้นนำหลอด LED ชนิด HH-5050SMD-280 และ รุ่น M35C1F01Z0 มากระตุ้นสารละลายซีโรโทนินพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นทั้งสองหลอด ทั้งนี้อาจเกิดจากเซ็นเซอร์ไม่สามารถตรวจวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เรืองออกมาจากซีโรโทนินซึ่งถูกกระตุ้นด้วยหลอด LED ทั้งสองรุ่นได้

5.3.2 ผลการใช้ Detector เป็นโฟโตดีเทคเตอร์ TCS230

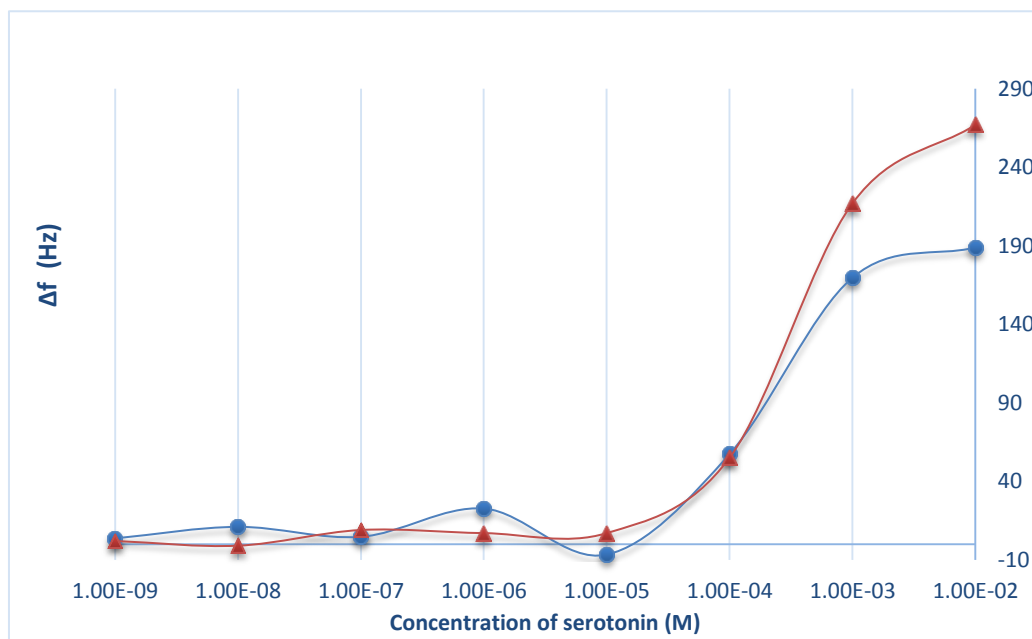
เมื่อให้ Detector เป็น TCS230 พบว่า output มีการเปลี่ยนแปลง จึงได้ทดสอบ light source ชนิดต่างๆ โดยแสดงผลดังรูป 5.1



รูปที่ 5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและ Δf (Hz) โดยใช้ Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 (●) หลอด LED รุ่น LED M35C1F01Z0 (▲) และใช้สองหลอดร่วมกัน (◆)

จากรูปที่ 5.1 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-2} M กับ Δf (Hz) ซึ่งเป็นค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่ได้จากการวัดสารละลายซีโรโทนิน 3 ครั้งและหาค่าเฉลี่ยลบด้วย Blank คือ cuvette ที่มี PBS buffer ซึ่งค่า output ที่ได้จะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มของแสงที่ตกกระทบเซ็นเซอร์ โดยเปรียบเทียบการใช้ Light source ระหว่างหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 , หลอด LED รุ่น M35C1F01Z0 และการใช้สองหลอดร่วมกัน พบว่า หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 และรุ่น M35C1F01Z0 ให้ผลการตอบสนองคล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะช่วงความเข้มข้น 10^{-5} - 10^{-3} M จะเห็นการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด แต่ถ้าต่ำกว่านั้นจะเห็นการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 10^{-2} M ค่าที่ได้จากหลอดรุ่น M35C1F01Z0 หลอดเดียวมีค่าสูงกว่าการใช้สองหลอด แต่เนื่องจากระบบตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพามีความประสงค์จะตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่าในช่วงความเข้มข้นของสารซีโรโทนินต่ำๆ หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 ให้ผลการวัดที่ดีกว่า จึงได้เลือกใช้หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 กระตุ้นสารซีโรโทนินในระบบ และจากกราฟ 5.1 พบว่าการใช้สองหลอดร่วมกัน

ให้ผลการวัดสูงขึ้นเล็กน้อย จึงได้ทดสอบให้ Light source เป็น 2 หลอด เปรียบเทียบระหว่างการใช้หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอด กับใช้หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 ร่วมกับรุ่น M35C1F01Z0 ให้ผลตามรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและ Δf (Hz) โดยใช้ Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอด (—▲—) เทียบกับการใช้หลอด LED 2 รุ่น (—●—)

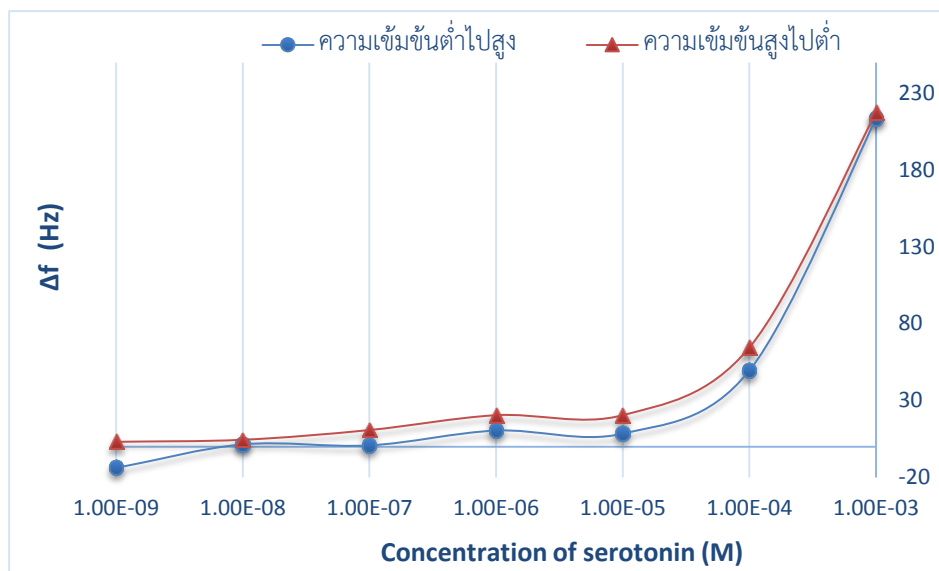
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 5.2 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} – 10^{-2} M กับ Δf (Hz) โดยใช้ Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอด เปรียบเทียบกับการใช้หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 ร่วมกับหลอดรุ่น M35C1F01Z0 พบว่า การใช้หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอดให้ผลการวัดสูงกว่าการใช้หลอด 2 ชนิดพร้อมกัน จึงได้เลือกใช้ Light source เป็นหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอดในการกระตุ้นสารซีโรโทนินในระบบ

จากผลการทดลองวัดสารละลายซีโรโทนินด้วยระบบตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา จะเห็นว่าสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงความเข้มข้น 10^{-5} – 10^{-2} M แต่ที่ความเข้มข้นต่ำกว่านั้นเห็นการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน

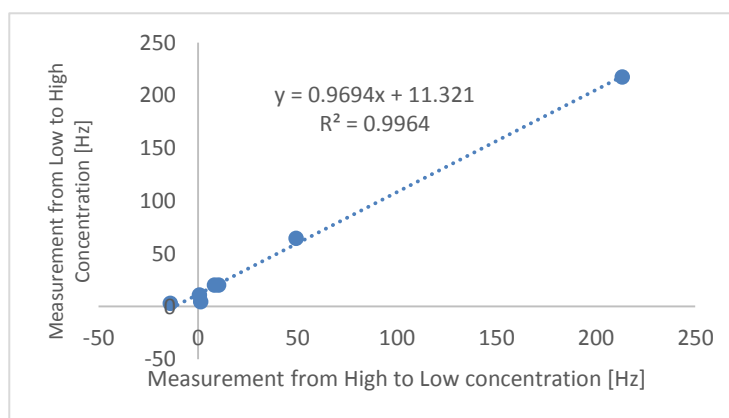
5.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพและการใช้งานที่เหมาะสมของระบบเครื่องวัดซีโรโทนินแบบพกพา

5.4.1 ผลการเปรียบเทียบขั้นตอนในการวัด



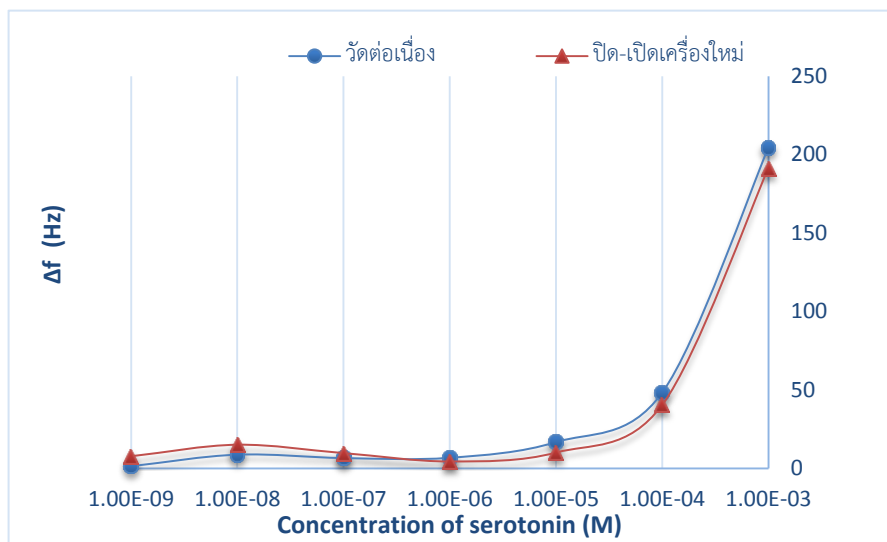
รูปที่ 5.3 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและ Δf (Hz) โดยเปรียบเทียบการวัดเริ่มต้นจากความเข้มข้นต่ำไปสูง (●) และความเข้มข้นสูงไปต่ำ (▲)

จากรูป 5.3 (ก) เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} – 10^{-3} M กับ Δf (Hz) โดยเปรียบเทียบการวัดเริ่มต้นจากความเข้มข้นต่ำไปสูงและความเข้มข้นสูงไปต่ำเพื่อทดสอบว่าผลการวัดที่ลดลงไม่ได้เป็นผลเนื่องมาจากเวลา จากรูปที่ 5.3 (ข) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการวัดทั้งสองแบบ จะเห็นได้ว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.99 และมีค่าความชันใกล้ 1.0 แสดงว่าไม่ว่าจะวัดจากค่าความเข้มข้นต่ำไปสูงหรือสูงไปต่ำก็ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกัน



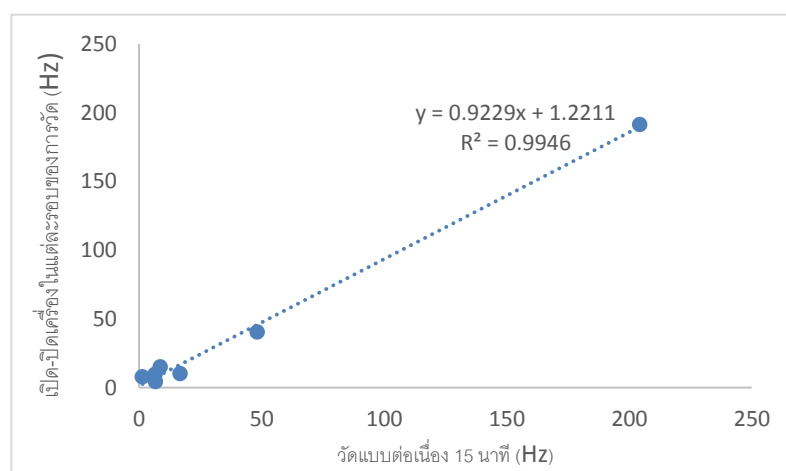
รูปที่ 5.3 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดจากความเข้มข้นสูงไปต่ำและวัดจากความเข้มข้นต่ำไปสูง

5.4.2 ผลการเปรียบเทียบความถี่เนื่องในการวัด



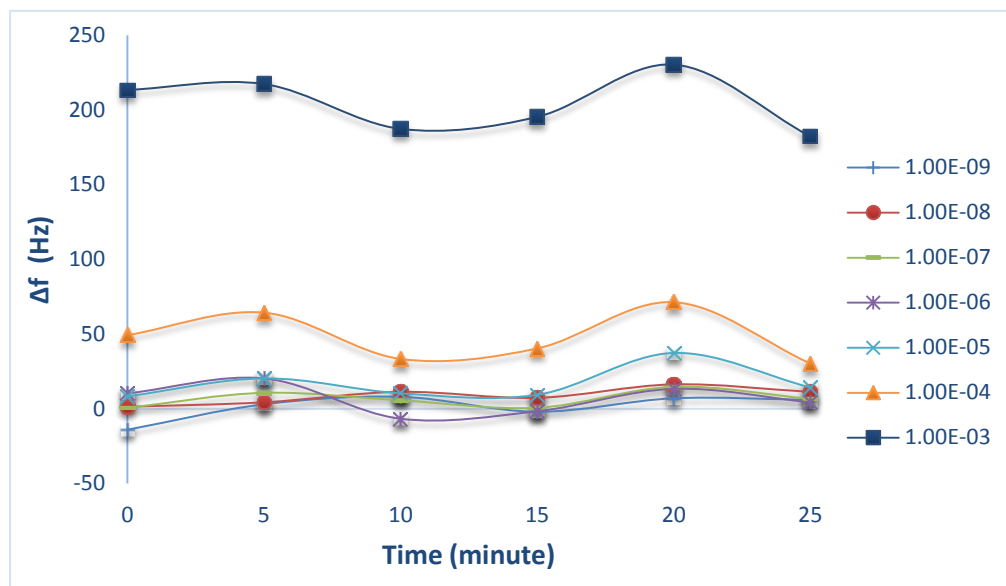
รูปที่ 5.4 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินและ Δf (Hz) โดยเปรียบเทียบการวัดค่าแบบต่อเนื่อง (●) และปิด-เปิดเครื่องใหม่ในแต่ละรอบของการวัด (▲)

จากรูป 5.4 (ก) เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน ตั้งแต่ 10^{-9} – 10^{-3} M กับ Δf (Hz) โดยเปรียบเทียบการวัดค่าแบบต่อเนื่อง 15 นาที และปิด-เปิดเครื่องใหม่ในแต่ละรอบของการวัดจำนวน 3 รอบเพื่อทดสอบว่าการปิดเปิดเครื่องใหม่มีผลต่อการวัดหรือไม่ จากรูปที่ 5.4 (ข) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการวัดทั้งสองแบบ จะเห็นได้ว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.99 และมีค่าความชันใกล้ 1.0 แสดงว่า การวัดสารแบบต่อเนื่อง 15 นาทีกับการเปิดปิดเครื่องในแต่ละรอบของการวัดให้ผลการทดลองใกล้เคียงกัน



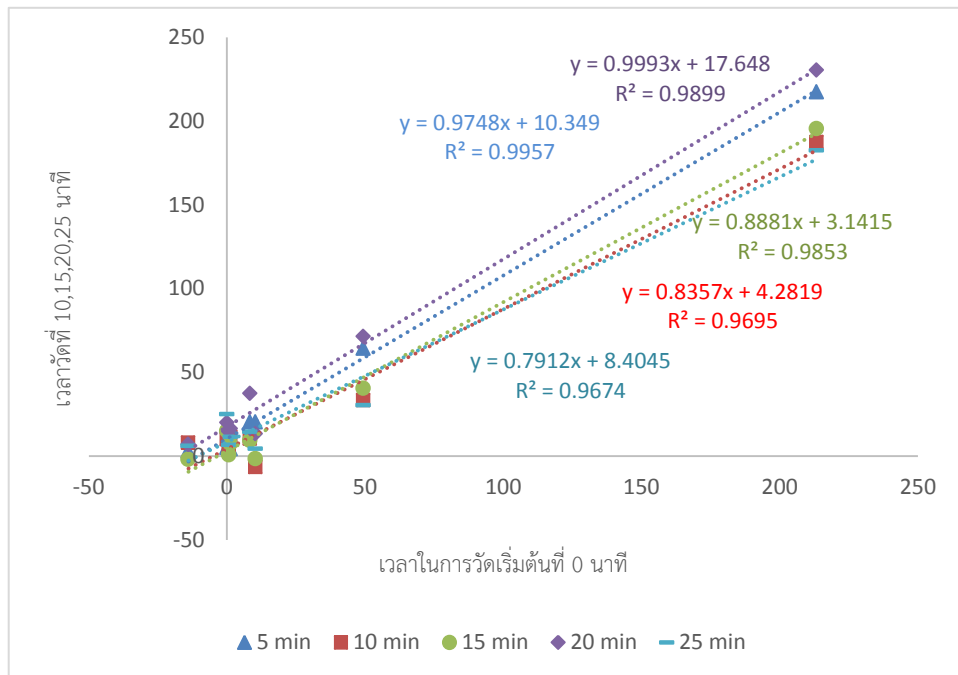
รูปที่ 5.4 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดแบบต่อเนื่อง 15 นาที กับวัดแบบเปิดปิดเครื่องในแต่ละรอบการวัด

5.4.3 ผลการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการวัด



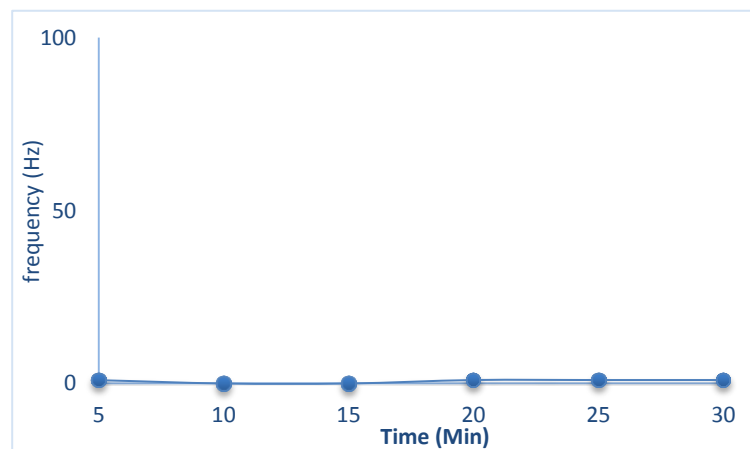
รูปที่ 5.5 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการวัดสารตัวอย่างและ Δf (Hz) ณ ความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-3} M

จากรูปที่ 5.5 (ก) เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการวัดสารตัวอย่างและ Δf (Hz) ณ ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-3} M โดยเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการวัดสารตัวอย่างทุก 5 นาที ไปจนถึง 25 นาที เพื่อทดสอบความสามารถของเครื่องมือในการวัดต่อเนื่องกัน รวมทั้งทดสอบว่าการวัดด้วยวิธีสเปกโตรฟลูออโรเมทรีนี้ เวลาที่ใช้วัดมีผลในการวัดสารละลายซีโรโทนินหรือไม่ จากรูปที่ 5.5 (ข) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการวัด 25 นาที จะเห็นได้ว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่มากกว่า 0.96 และมีค่าความชันใกล้ 1.0 แสดงว่าผลการวัดไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา



รูปที่ 5.5 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการวัดเริ่มต้นที่ 0 นาทีและวัดที่ 10,15,20 และ 25 นาที

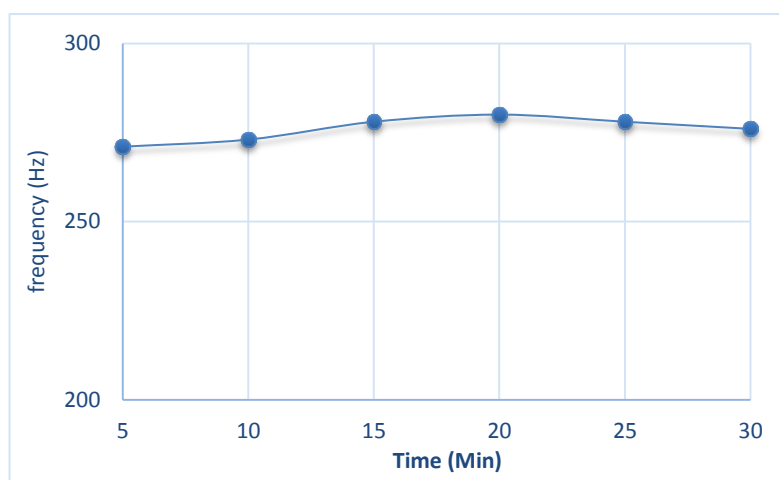
จากผลการทดลองจะเห็นว่าเวลาในการวัดสารซีโรโทนินทุก 5 นาทีไปจนถึง 25 นาทีมีค่าใกล้เคียงกันแต่มีลักษณะขึ้นลง ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจาก Detector, Light source หรือสารซีโรโทนินเอง จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเริ่มจากการทดสอบ Detector คือ Photodetector TCS230 ว่าค่าที่ได้จากการทดลองเป็นผลมาจากการจับสัญญาณของเซนเซอร์ TCS230 หรือไม่ โดยการปิดไฟจากหลอด Led แล้วให้ Detector วัดค่าไปเรื่อยๆ เป็นเวลา 30 นาที ให้ผลตามรูปที่ 5.6



รูปที่ 5.6 ผลการวัดค่าความถี่ของ TCS230 เมื่อปิดหลอด LED 30 นาที

จากรูป 5.6 เป็นผลการทดสอบการวัดค่าความถี่ของ Photodetector TCS230 ในกล่องเครื่องมือซึ่งเป็นระบบปิด ขณะที่ปิดไฟจาก Light source พบว่าค่าความถี่ที่วัดได้ทุกๆ 5 นาทีเป็นเวลา 30 นาที มีค่า 0-1 Hz ดังนั้น การตรวจวัดสัญญาณของ Photodetector TCS230 จึงมีความเสถียรสูง

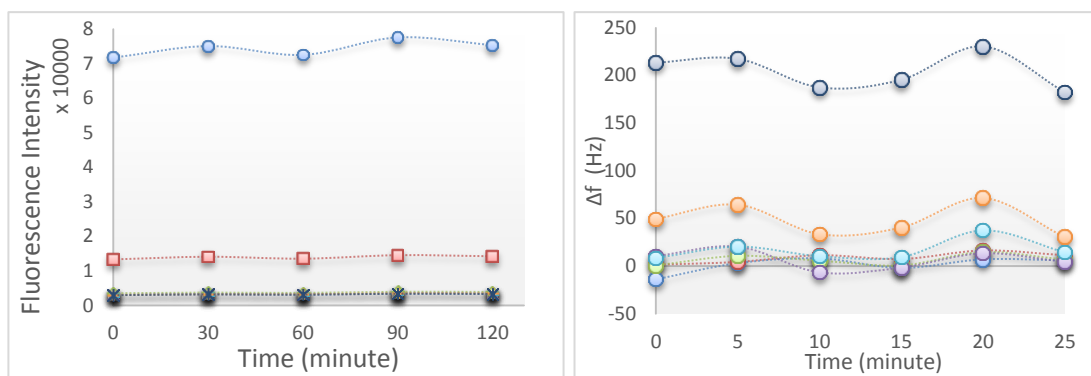
จากนั้นทดสอบแสงจาก Light source เพื่อทดสอบว่าค่าที่ได้จากการทดลองเป็นผลมาจากการกระตุ้นด้วยแสงจากหลอด LED หรือไม่ โดยการเปิดหลอดไฟให้ Detector วัดค่าโดยไม่ใส่ cuvette หรืออุปกรณ์ใดๆ ลงไปในกล่องเครื่องมือ ให้ผลการทดลองตามรูปที่ 5.7



รูปที่ 5.7 ผลการทดสอบการให้แสงกระตุ้นของหลอด LED เป็นเวลา 30 นาที

จากรูป 5.7 เป็นผลการทดสอบการให้แสงกระตุ้นของ Light source ซึ่งก็คือหลอด LED 2 หลอด ในกล่องเครื่องมือซึ่งเป็นระบบปิด และทำการวัดค่าความถี่ทุกๆ 5 นาทีเป็นเวลา 30 นาที พบว่ามีค่าเฉลี่ย 276 ± 3 Hz ดังนั้น Light source ให้แสงกระตุ้นค่อนข้างเสถียร

จากกราฟแสดงผลการทดลองเวลาที่ใช้ในการวัดที่ได้จากเครื่องวัดซีโรโทนินแบบพกพา เมื่อเทียบกับกราฟที่ได้จากการใช้เครื่อง Spectro-microplate reader ตามรูปที่ 5.8



(ก) ผลการวัดที่ได้จากเครื่อง Spectro-microplate reader

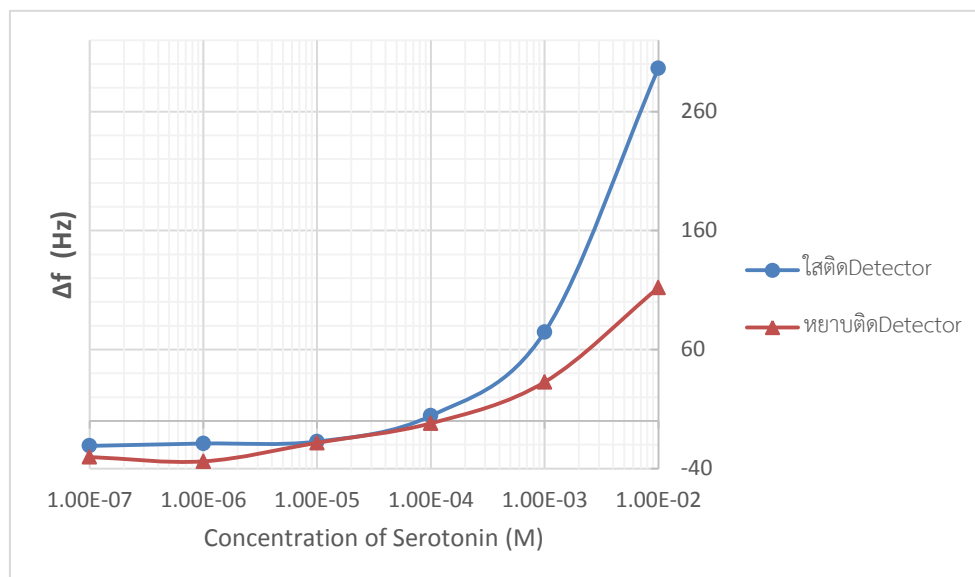
(ข) ผลการวัดที่ได้จากเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา

รูปที่ 5.8 ผลการทดลองเวลาที่ใช้ในการวัดจาก (ก) เครื่อง Spectro-microplate reader และ (ข) เครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา

จากรูป 5.8 แสดงผลการทดลองเวลาที่ใช้ในการวัดจากเครื่อง Spectro-microplate reader และเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา พบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ emission peak ของการวัดทุก 5 นาที มีลักษณะขึ้นลงเมื่อทำการวัดไปเรื่อยๆ ซึ่งผลของเวลาที่ใช้ในการวัดมีลักษณะขึ้นลงนี้ อาจจะเป็นผลมาจากสารซีโรโทนินที่เป็นคุณสมบัติการเรืองแสงเฉพาะตัว หรือเป็นผลมาจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงขณะทำการตรวจวัด ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

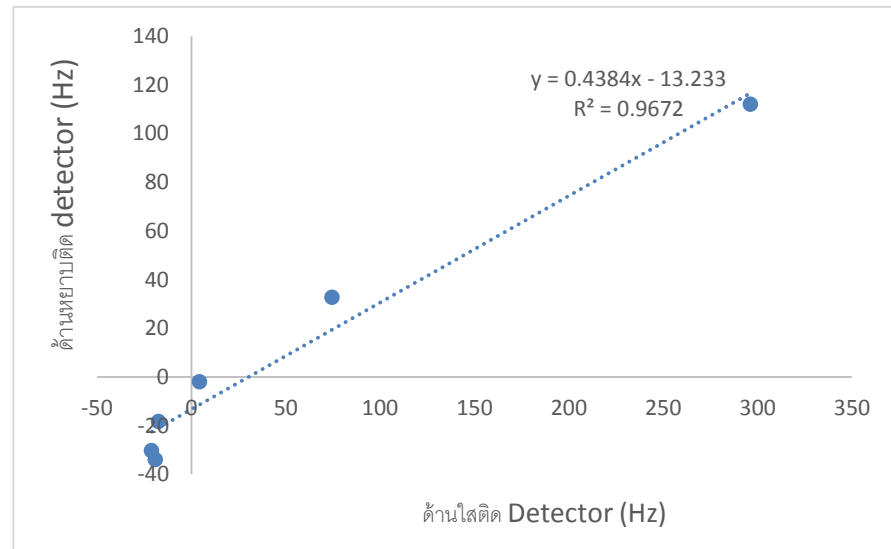
5.4.4 ผลการเปรียบเทียบชนิดของ Cuvette ที่ใช้ในการวัดสารตัวอย่าง

1. ผลการใช้ UV cuvette micro



รูปที่ 5.9 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับ Δf (Hz) ที่ได้จากการใช้ UV cuvette micro บรรจุสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบระหว่างการให้ด้านใสติด Detector (—●—) กับให้ด้านหยาบติด Detector (—▲—)

จากรูปที่ 5.9 (ก) เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน ความเข้มข้นที่ 10^{-7} - 10^{-2} M กับ Δf (Hz) ที่ได้จากการใช้ UV cuvette micro บรรจุสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบระหว่างการให้ด้านใสของ cuvette ติด detector กับให้ด้านหยาบของ cuvette ติด detector พบว่าการให้ด้านใสของ cuvette ติดกับ detector ให้ค่า Δf (Hz) สูงกว่าการให้ด้านหยาบในช่วงความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-4} - 10^{-2} M ส่วนในช่วงความเข้มข้นต่ำกว่านั้น ค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการพล็อตกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างการวัดโดยให้ cuvette ทั้งสองด้านติด detector ดังรูปที่ 5.9 (ข) จะเห็นได้ว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.96 และมีค่าความชันที่ 0.4 แสดงว่า สามารถใช้ cuvette ทั้งสองด้านติด detector ทำการวัดสารตัวอย่างได้เหมือนกัน แต่การให้ด้านใสของ cuvette ติด detector ให้ผลการวัดดีกว่า



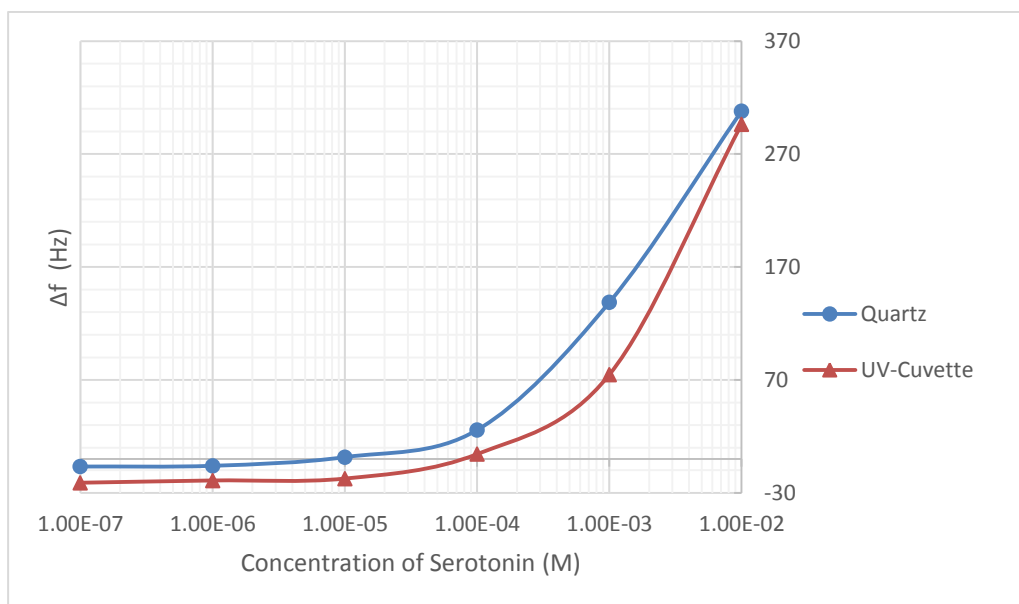
รูปที่ 5.9 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการใช้ cuvette ด้านใสและด้านหยาบติด detector

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าว เป็นผลมาจากคุณสมบัติของ UV cuvette micro ที่ให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 320-400 nm สามารถส่องผ่าน (% Transmission) ได้สูงสุดถึงร้อยละ 90 ซึ่ง cuvette ด้านหยาบกว่านั้นจะทำให้แสงที่ส่องผ่านหักเหออกไปได้ ตามหลักการการกระเจิงแสง (Scattering of light) ที่ว่าเมื่อแสงเดินทางผ่านโมเลกุลต่าง ๆ แสงนั้นจะกระจัดกระจายไปโดยรอบตามรูปที่ 5.10 ดังนั้น แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมาจากซีโรโทนินส่องผ่านด้านหยาบของ cuvette ไปยัง Detector ได้น้อย



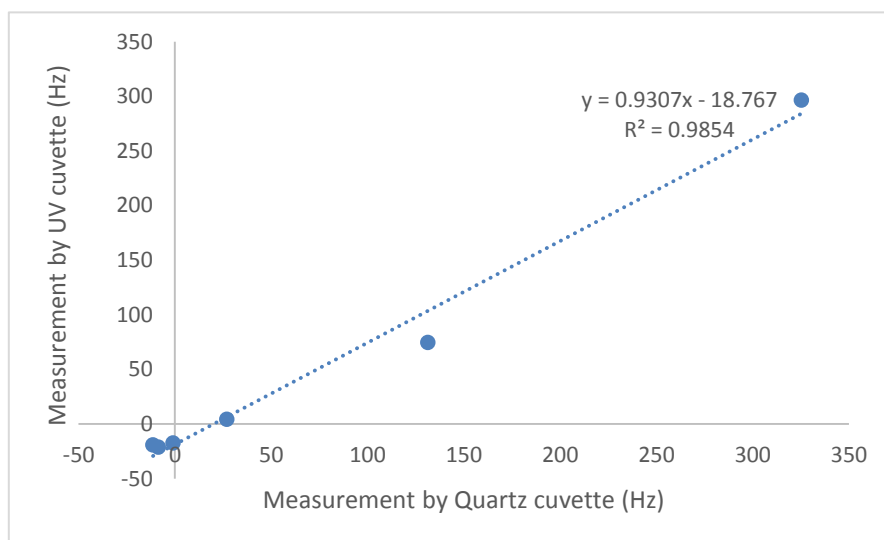
รูปที่ 5.10 การกระเจิงแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อผ่านด้านหยาบ (ก) กับด้านใส (ข) ของ cuvette

2. เปรียบเทียบการใช้ Cuvette ชนิด UV Quartz และ UV



รูปที่ 5.11 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับ Δf (Hz) ที่ได้จากการใช้ UV quartz (—●—) และ UV cuvette micro (—▲—) ในการบรรจุสารตัวอย่าง

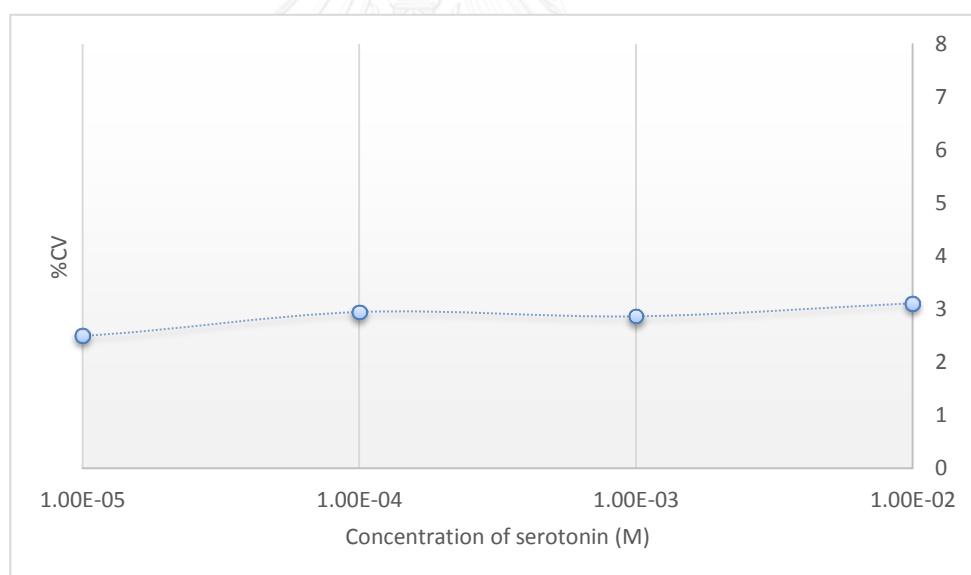
จากรูปที่ 5.11 (ก) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนินกับ Δf (Hz) ที่ได้จากการใช้ Cuvette ชนิด UV quartz และ UV cuvette micro ในการบรรจุสารตัวอย่าง ณ ความเข้มข้นที่ 10^{-7} - 10^{-2} M พบว่าการใช้ UV quartz cuvette ให้ผลการวัดสูงกว่าการใช้ UV cuvette micro เล็กน้อย และเมื่อพล็อตกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ cuvette ทั้งสองชนิดตามรูป 5.11 (ข) จะเห็นได้ว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.98 และมีค่าความชันใกล้ 1.0 แสดงว่าการใช้ UV cuvette ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับการใช้ Quartz ดังนั้นการใช้ UV cuvette micro จึงเพียงพอต่อการนำมาใช้บรรจุสารตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดด้วยเครื่องที่พัฒนาขึ้น



รูปที่ 5.11 (ข) ความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ Quartz และ UV micro cuvette บรรจุนสารในการวัด

5.4.5 ผลการทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือ

1. ทดสอบความแม่นยำในการวัดซ้ำหลายครั้งในวันเดียว (Repeatability, within day precision)

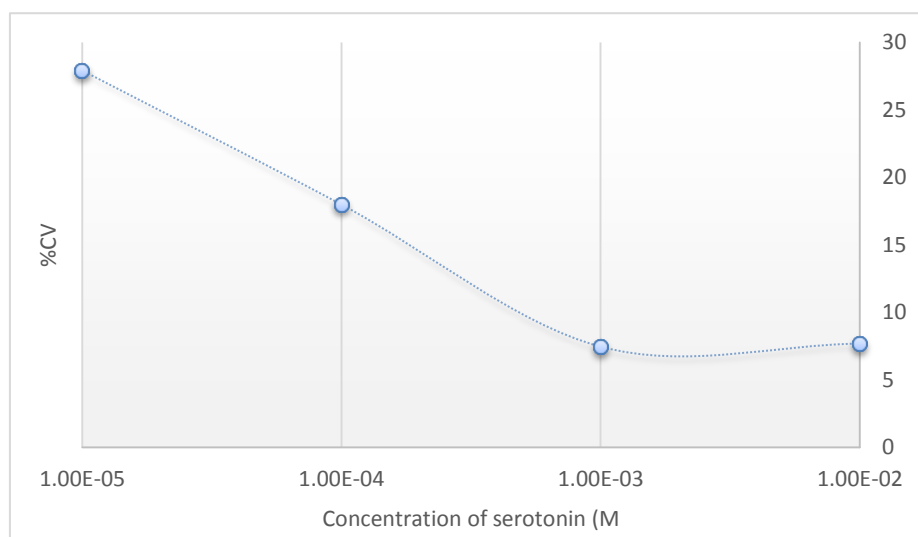


รูปที่ 5.12 %CV ที่ได้จากการทดสอบวัดสารซีโรโทนินซ้ำจำนวน 10 ครั้งในวันเดียวกัน ณ ความเข้มข้น $10^{-5} - 10^{-2}$ M

รูปที่ 5.12 เป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน ณ ความเข้มข้น $10^{-5} - 10^{-2}$ M กับ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, CV) ที่ได้จากการทดสอบวัดสารซีโรโทนินซ้ำจำนวน 10 ครั้งในวันเดียวกัน โดย %CV เป็นค่าการกระจายข้อมูลเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ย ซึ่งสามารถบอกได้ถึงความแม่นยำในการวัด ยิ่ง %CV น้อย ความเที่ยงตรงในการวัด

ก็สูง จากรูปที่ 5.12 ค่า %CV มีค่าน้อยกว่า 5 แสดงว่าการวัดซีโรโทนินหลายๆ ครั้งด้วยเครื่องวัดซีโรโทนินแบบพกพาในวันเดียวมีความเที่ยงตรงในการวัดสูง

2. ทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน (Intermediate precision, day to day precision)



รูปที่ 5.13 %CV ที่ได้จากการทดสอบวัดสารซีโรโทนินซ้ำระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน ณ ความเข้มข้น $10^{-5} - 10^{-2}$ M

รูปที่ 5.13 เป็นกราฟระหว่างความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซีโรโทนิน ณ ความเข้มข้น $10^{-5} - 10^{-2}$ M กับ %CV ที่ได้จากการทดสอบวัดสารซีโรโทนินซ้ำระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ %CV มีค่าเพิ่มขึ้น แต่ถ้าเทียบกับการวัดซ้ำในวันเดียว การวัดระหว่างวันก็ยังมีความแม่นยำน้อยกว่า

โดย %CV เป็นค่าการกระจายข้อมูลเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ย ซึ่งสามารถบอกได้ถึงความแม่นยำในการวัด ยิ่ง %CV น้อย ความเที่ยงตรงในการวัดก็สูง เป็นผลมาจากที่ความเข้มข้นต่ำ ค่าความถี่ output ที่ได้มีค่าน้อย เมื่อคิดเป็น %CV ซึ่งเทียบค่าการกระจายของข้อมูลกับค่าเฉลี่ย จึงทำให้มีค่าสูงขึ้น ข้อมูลตามตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าการกระจายของข้อมูล (SD) ที่ได้จากการวัดสารซีโรโทนินซ้ำเป็นเวลา 3 วัน

Conc.(M)	1.00E-05	1.00E-04	1.00E-03	1.00E-02
mean±SD	23±6	56±10	186±14	238±18

5.4.6 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection)

ตารางที่ 5.3 ข้อมูลค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าการกระจายของข้อมูล (SD) ที่ได้จากการวัดสารซีโรโทนิน ทริปโตเฟน โดปามีนและแอสคอร์บิก เอซิด (Hz)

ชนิดของสาร	Concentration (M)			
	1.00E-03	1.00E-04	1.00E-05	1.00E-06
5-HT	410±6	116±4	23±3	18±21
Tryptophan	344±9	122±3	19±3	4±12
Dopamine	54±4	10±2	9±9	20±12
Ascorbic acid	-7±6	7±2	0±10	33±0

จากตารางที่ 5.3 แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าการกระจายของข้อมูล (SD) ที่ได้จากการวัดสารซีโรโทนิน และสารรบกวนของซีโรโทนิน ได้แก่ ทริปโตเฟน โดปามีนและแอสคอร์บิก เอซิด ณ ความเข้มข้น $10^{-6} - 10^{-5}$ M โดยทำการวัดซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้งและทำการลบ Blank คือ cuvette ที่มี PBS buffer อยู่เพื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพาสามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection) พบว่าซีโรโทนินสามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10^{-5} M และมีผลการรบกวนจากทริปโตเฟนมากที่สุด ดังนั้น หากต้องการตรวจซีโรโทนินด้วยเครื่องตรวจวัดนี้ ควรจะทำการแยกสารซีโรโทนินออกจากสารรบกวนอื่นก่อน ถึงจะสามารถตรวจวัดซีโรโทนินได้

5.5 สรุปผลการทดลอง

1. UV sensor ML8511 ไม่สามารถตรวจวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของซีโรโทนินเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่น 280 nm ที่ได้จากหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 และหลอด M35C1F01Z0 ได้
2. โฟโตดีเทคเตอร์ TCS230 สามารถตรวจวัดความเข้มแสงที่เปล่งออกมาจากสารตัวอย่างและเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นจึงกำหนดให้ Detector เป็นโฟโตดีเทคเตอร์ TCS230 ของเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา
3. หลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นซีโรโทนินได้ดีกว่าหลอด M35C1F01Z0 และพบว่าการใช้ 2 หลอดเป็น Light source ยิ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นซีโรโทนิน เนื่องจากความเข้มแสงเพิ่มขึ้น
4. การวัดสารตัวอย่างจากความเข้มชั้นสูงไปความเข้มชั้นต่ำ หรือสลับวัดจากความเข้มชั้นต่ำไปความเข้มชั้นสูงมีค่าใกล้เคียงกัน
5. การวัดสารตัวอย่างโดยการเปิดเครื่องวัดต่อเนื่องกับการเปิด-ปิดเครื่องถูกรอบของการวัดมีค่าใกล้เคียงกัน
6. เวลาที่ใช้ในการวัดสารตัวอย่างทุก 5 นาทีเป็นเวลา 25 นาที Emission peak ของการวัดทุก 5 นาทีมีลักษณะขึ้นลง แต่ค่าที่ได้ก็ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากคุณสมบัติของสารซีโรโทนิน ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป
7. การใช้ UV cuvette micro ในการบรรจุสารตัวอย่างที่ใช้วัด พบว่าการใช้ด้านใสติดกับ Detector ให้ผลการทดลองดีกว่าการใช้ด้านหยาบ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้ UV cuvette micro และ UV Quartz พบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจาก UV Quartz มีราคาสูงมาก ดังนั้น จึงใช้ UV cuvette micro สำหรับเป็นภาชนะบรรจุสารในการวัด
8. การทดสอบความเที่ยงตรงในการวัดซ้ำหลายๆ ครั้ง ในสภาวะเดียวกัน วันเดียวกัน (Repeatability, Within day precision) โดยทำการวัดซ้ำ 10 ครั้งพบว่า %CV มีค่าน้อยกว่า 5 การวัดซ้ำภายในวันเดียวกันจึงมีความเที่ยงตรงสูง
9. การทดสอบความเที่ยงตรงในการวัดระหว่างวัน (Intermediate precision, day to day precision) โดยทำการวัดซ้ำระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน พบว่า %CV มีค่าสูงเมื่อความเข้มชั้นของสารซีโรโทนินลดลงเนื่องจากค่าความถี่ output ที่ได้มีค่าน้อย การกระจายของข้อมูลเมื่อเทียบค่าเฉลี่ยจึงสูง

10. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพาสามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection) พบว่าสามารถวัดซีโรโทนินได้ถึงระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10^{-5} M และมีผลการรบกวนจากทริปโตเฟนมากที่สุด ดังนั้น หากทำการตรวจวัดซีโรโทนินด้วยเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา ควรทำการแยกซีโรโทนินออกจากสารรบกวนอื่นก่อนวัด



6. ข้อเสนอปฏิบัติงานวิจัย

งานวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติทางแสงของซีโรโทนิน เพื่อออกแบบและพัฒนาเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา ซึ่งได้ข้อเสนอปฏิบัติงานวิจัยดังต่อไปนี้

6.1 การศึกษาคูณสมบัติทางแสงของซีโรโทนิน

เมื่อวัดสารละลายซีโรโทนินด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสง (UV measurement) และวิธีวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence measurement) พบว่าการวัดด้วยวิธีวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ให้ผลดีกว่า

6.2 การศึกษาเบื้องต้นซีโรโทนินด้วยเทคนิค Fluorometry

1. แนะนำให้ใช้แสงกระตุ้นที่มีความยาวคลื่น 280 nm และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 340 nm
2. การวัดซีโรโทนินด้วยเครื่อง spectro microplate reader สามารถวัดได้ถึงระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 1 μM
3. PBS buffer ที่เหมาะสมในการละลายซีโรโทนินคือ 0.01 M
4. สารรบกวนซีโรโทนินได้แก่ ทริปโตเฟน โดปามีน แอสคอร์บิก เอซิด ที่ความเข้มข้น 1 μM มีการรบกวนน้อย

6.3 เครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพา

1. Light source ที่ใช้ในระบบคือหลอด LED รุ่น HH-5050SMD-280 2 หลอด และ Photodetector ที่ใช้ในระบบคือ TCS230
2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection) คือ 10^{-5} M
3. การวัดจากความเข้มข้นต่ำไปสูงและความเข้มข้นสูงไปต่ำให้ค่าใกล้เคียงกัน
4. ผลการทดลองไม่ขึ้นกับเวลาภายใน 25 นาที
5. การวัดสารต่อเนื่อง 15 นาทีกับการเปิดปิดเครื่องในแต่ละรอบให้ผลใกล้เคียงกัน
6. การใช้ UV cuvette micro ให้ด้านใสติด detector ให้ผลการวัดดีกว่าใช้ด้านหยาบ
7. การใช้ UV quartz ให้ผลใกล้เคียงกับการใช้ UV cuvette micro
8. ความแม่นยำในการวัดซ้ำ 10 ครั้งในวันเดียวมีความแม่นยำสูง (%CV < 5)
9. ความแม่นยำในการวัดระหว่างวัน 3 วัน ค่า %CV เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสารลดลง

10. สารรบกวนซีโรโทนินได้แก่ ทริปโตเฟน โดปามีน แอสคอร์บิก เอซิด ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M โดยทริปโตเฟนมีการรบกวนมากที่สุด ส่วนโดปามีนและแอสคอร์บิก เอซิดมีการรบกวนน้อย

6.4 ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้วัดเฉพาะสารละลายซีโรโทนินใน PBS buffer เท่านั้น จึงจำเป็นต้องพัฒนาการตรวจวัดให้สามารถวัดกับสารตัวอย่างจริง เช่น เลือดหรือปัสสาวะของคนได้ ซึ่งในตัวอย่างจริงจะมีสารรบกวนอื่นๆ เช่น ทริปโตเฟน โดปามีน แอสคอร์บิก เอซิด ฯลฯ ซึ่งเครื่องตรวจวัดซีโรโทนินแบบพกพายังไม่สามารถแยกสารรบกวนเหล่านี้ออกจากซีโรโทนินได้ จึงต้องมีการพัฒนาเครื่องตรวจวัดให้มีความจำเพาะเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มเทคนิคการแยกสารซีโรโทนินออกจากสารรบกวนอื่นด้วยวิธี Capillary electrophoresis หรือวิธี Chromatography ก่อนทำการวัดด้วยโฟโตดีเทคเตอร์ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป
2. ความไวของระบบที่พัฒนาขึ้นจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาเพื่อให้สามารถวัดสารซีโรโทนินที่มีค่าต่ำระดับ μM ในร่างกายคนปกติได้ แม้ว่าเครื่องที่พัฒนาขึ้นจะมีราคาต่ำกว่าเครื่อง spectro microplate reader ราว 100 เท่า แต่ยังคงมีความไวน้อยกว่า 10 เท่า จึงต้องมีการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดให้มีความไวเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มความเข้มแสงที่มากระตุ้นโดยการให้แรงดันเพิ่มเป็น 7 Volt และใส่ filter ที่ detector กรองเฉพาะความยาวคลื่นที่ต้องการวัด อาจทำให้ระบบการวัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น

รายการอ้างอิง

1. Anderson, G.M. and J.G. Young, *Applications of liquid chromatographic-fluorometric systems in neurochemistry*. Life Sciences, 1981. **28**(5): p. 507-517.
2. Audhya, T., J.B. Adams, and L. Johansen, *Correlation of serotonin levels in CSF, platelets, plasma, and urine*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2012. **1820**(10): p. 1496-1501.
3. Bowman RL, C.P., Udenfriend S., *pectrophotofluorometric assay in the visible and ultraviolet*. Science, 1955. **122**: p. 32-33.
4. Bracamonte, A.G. and A.V. Veglia, *Spectrofluorimetric determination of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine with different cyclodextrin media*. Talanta, 2011. **83**(3): p. 1006-1013.
5. Crespi, F., et al., *In vivo autofluorescence spectrofluorometry of central serotonin*. J Neurosci Methods, 2004. **140**(1-2): p. 67-73.
6. Crespi, F., et al., *Autofluorescence Spectrofluorometry of central nervous system (CNS) neuromediators*. Lasers in Surgery and Medicine, 2004. **34**(1): p. 39-47.
7. De Benedetto, G.E., et al., *A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **98**(0): p. 266-270.
8. Delgado, P.L., et al., *Neuroendocrine and behavioral effects of dietary tryptophan restriction in healthy subjects*. Life Sciences, 1989. **45**(24): p. 2323-2332.
9. Diggory, G.L. and W.R. Buckett, *An automated method to measure monoamines and metabolites using elevated temperature reversed phase HPLC with electrochemical detection: Application to striatal dopamine and hippocampal serotonin turnover*. Journal of Pharmacological Methods, 1984. **11**(3): p. 207-217.

10. Gao, Z., et al., *The association of serotonin transporter gene polymorphism and geriatric depression: A meta-analysis*. Neuroscience Letters, 2014. **578**: p. 148-152.
11. Hassan, S.F., et al., *Comparison of noradrenaline, dopamine and serotonin in mediating the tachycardic and thermogenic effects of methamphetamine in the ventral medial prefrontal cortex*. Neuroscience, 2015. **295**: p. 209-20.
12. Hirowatari, Y., et al., *High-performance liquid chromatographic method with column-switching and post-column reaction for determination of serotonin levels in platelet-poor plasma*. Clinical Biochemistry, 2004. **37**(3): p. 191-197.
13. Hu, L., et al., *Detection of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in vitro using a hippocampal neuronal network-based biosensor with extracellular potential analysis of neurons*. Biosens Bioelectron, 2015. **66**: p. 572-8.
14. Iovieno, N., et al., *Second-tier natural antidepressants: Review and critique*. Journal of Affective Disorders, 2011. **130**(3): p. 343-357.
15. Kema, I.P., E.G.E. de Vries, and F.A.J. Muskiet, *Clinical chemistry of serotonin and metabolites*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2000. **747**(1-2): p. 33-48.
16. Le Floch, N., W. Otten, and E. Merlot, *Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications*. Amino Acids, 2011. **41**(5): p. 1195-1205.
17. Le François, B., et al., *Chronic mild stress and antidepressant treatment alter 5-HT_{1A} receptor expression by modifying DNA methylation of a conserved Sp4 site*. Neurobiology of Disease.
18. Liu, C.-C., et al., *Plasma-metabolite-biomarkers for the therapeutic response in depressed patients by the traditional Chinese medicine formula Xiaoyaosan: A 1H NMR-based metabolomics approach*. Journal of Affective Disorders, 2015. **185**: p. 156-163.
19. Lu, S.-h., et al., *Effects of Kaixin Powder on Expression of 5-HT Receptor in Hippocampus of Depressed Rats Induced by CUMS*. Chinese Herbal Medicines, 2015. **7**(2): p. 150-154.
20. Maes, M., et al., *The new '5-HT' hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to*

- lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression.* Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011. **35**(3): p. 702-721.
21. McHugh, P.C. and D.A. Buckley, *Chapter Eleven - The Structure and Function of the Dopamine Transporter and its Role in CNS Diseases*, in *Vitamins & Hormones*, L. Gerald, Editor. 2015, Academic Press. p. 339-369.
 22. Mohammad-Zadeh, L.F., L. Moses, and S.M. Gwaltney-Brant, *Serotonin: a review.* J Vet Pharmacol Ther, 2008. **31**(3): p. 187-99.
 23. Musumeci, G., et al., *Importance of serotonin (5-HT) and its precursor l-tryptophan for homeostasis and function of skeletal muscle in rats. A morphological and endocrinological study.* Acta Histochem, 2015. **117**(3): p. 267-74.
 24. Olivier, B., *Serotonin: a never-ending story.* Eur J Pharmacol, 2015. **753**: p. 2-18.
 25. Peters, M.A., et al., *Dopamine and serotonin regulate tumor behavior by affecting angiogenesis.* Drug Resist Updat, 2014. **17**(4-6): p. 96-104.
 26. Schumacher, F., et al., *Highly sensitive isotope-dilution liquid-chromatography-electrospray ionization-tandem-mass spectrometry approach to study the drug-mediated modulation of dopamine and serotonin levels in Caenorhabditis elegans.* Talanta, 2015. **144**: p. 71-79.
 27. Seo, D., C.J. Patrick, and P.J. Kennealy, *Role of Serotonin and Dopamine System Interactions in the Neurobiology of Impulsive Aggression and its Comorbidity with other Clinical Disorders.* Aggression and violent behavior, 2008. **13**(5): p. 383-395.
 28. Siangcham, T., et al., *The effects of serotonin, dopamine, gonadotropin-releasing hormones, and corazonin, on the androgenic gland of the giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii.* General and Comparative Endocrinology, 2013. **193**: p. 10-18.

29. Talati, A., et al., *Genetic variants within the serotonin transporter associated with familial risk for major depression*. *Psychiatry Research*, 2015. **228**(1): p. 170-173.
30. Thanephatisuk, L. and T. Tencomnao, *Fluorescence of Senna simea Lam. leaf extracts*. *Journal of Chemical & Pharmaceutical Research*, 2013. **5**(5): p. 105-110.
31. Udenfriend, S., *5 - AMINO ACIDS, AMINES, AND THEIR METABOLITES*, in *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, S. Udenfriend, Editor. 1969, Academic Press. p. 195-247.
32. Umeda, S., et al., *A reverse-phase HPLC and fluorescence detection method for measurement of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in Planaria*. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2005. **51**(1): p. 73-76.
33. Young, S.N. and M. Leyton, *The role of serotonin in human mood and social interaction: Insight from altered tryptophan levels*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2002. **71**(4): p. 857-865.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาคผนวก
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิศาชล หวานดี เกิดวันเสาร์ที่ 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2531 ณ จังหวัดหนองบัวลำภู สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะสหเวชศาสตร์ สาขาเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 และศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา หลักสูตรวิศวกรรมชีวเวช คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555

