

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเมตร เพื่อตรวจวัดระดับครีเอตินีน

Synthesis of Gold Nanoparticles to Measure Creatinine Level

วรรณวิภา นามสุวรรณ (Wanvipa Namsuwan)* ดร.ฤทธิ มีสัตย์ (Dr.Ridthee Meesat)**

บทคัดย่อ

ปัจจุบันอนุภาคทองคำนาโนเมตรได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับการใช้เป็นตัวรับรู้ทางชีวภาพ เนื่องจากมีคุณสมบัติพิเศษทางกายภาพ และทางเคมีของพื้นผิวของอนุภาคที่มีขนาดนาโน รวมถึงยังเข้ากันได้เป็นอย่างดีในระบบชีววิทยา วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาอนุภาคทองคำนาโนที่มีการกระจายตัวสม่ำเสมอโดยสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีและการฉายรังสี เพื่อการประยุกต์ใช้เป็นสารสำหรับการตรวจวัดระดับครีเอตินีน ซึ่งระดับของสารครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะสามารถใช้บ่งชี้ภาวะการทำงานของไตในทางคลินิกได้ หลักการวิเคราะห์พื้นฐานคือใช้การเปรียบเทียบการเปลี่ยนสีของสารละลายทองซึ่งถูกสังเคราะห์และเคลือบด้วยกลูตาไธโอนเพื่อคงความเสถียรของอนุภาคทอง ลักษณะสัณฐานและรูปร่างของอนุภาคทองสามารถวิเคราะห์ด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน สำหรับการตรวจวัดระดับครีเอตินีนสามารถใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้นของครีเอตินีนสามารถตรวจวัดได้ระดับช่วงความเข้มข้นที่ 0 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ ค่าน้อยสุดของครีเอตินีนที่สามารถตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 4.6 ไมโครโมลาร์ (0.5 มิลลิกรัม/ลิตร) เมื่อใช้อนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้นเท่ากับ 0.13 มิลลิโมลาร์

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNPs) have recently attracted great attentions in biosensor applications due to their improved physical and chemical properties on their surfaces, including superb compatibility with biological objects. The aim of this work was to develop a uniform distribution of colloidal AuNPs using two different methods: chemical and radiolytic synthesis, in order to determine creatinine level, in which its level in urine was an important indicator for clinical assay of renal function. The basic colorimetric method was based on a gold solution (HAuCl_4), which was synthesized and coated with glutathione (GSH) molecules to stabilize AuNPs. The morphology and shape of AuNPs were analyzed using Transmission Electron Microscope (TEM) images. To determine creatinine levels, the procedure was performed in buffer solutions (pH = 7.0) at room temperature (25°C) and could determine the creatinine levels in a range of 0 – 25 μM with a detection limit of 4.6 μM (0.5 mg/L) using 0.13 mM AuNPs.

คำสำคัญ: อนุภาคทองคำนาโน ครีเอตินีน กลูตาไธโอน

Keywords: Gold nanoparticles, Creatinine, Glutathione

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

** อาจารย์ ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทนำ

โรคไตเป็นโรคไม่ติดต่อแต่ก็ถือว่าเป็นโรคที่อันตราย เนื่องจากไม่มีอาการบ่งชี้ให้ทราบล่วงหน้า พบได้มาก และเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สาเหตุหลักมาจากโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูงซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกๆปี (กองบรรณาธิการ, 2558) อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคไตจากรายงานของ USRDS ในปี 2539 ประมาณ 35 % ของผู้ป่วยโรคไต และมีแนวโน้มลดลง ข้อมูลในปี 2554 ลดลงอยู่ที่ 26.5 % เพราะมีการตรวจพบในระยะเริ่มต้นและระบบการบำบัดที่ดี (Collins et al., 2015) ดังนั้นการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตในระยะเริ่มต้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อเป็นการป้องกันหรือชะลอไม่ให้เข้าสู่ภาวะไตวายระยะสุดท้าย การตรวจคัดกรองและดูแลรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องให้การพิจารณา

การตรวจวัดเพื่อหาความเสี่ยงที่สามารถบ่งบอกถึงภาวะโรคไตในทางคลินิกโดยทั่วไป ทำได้โดยการตรวจวัดระดับครีเอตินิน (Creatinine) ในเลือดและในปัสสาวะ ครีเอตินินเป็นของเสีย (waste product) ที่ได้จากการสลายของสาร Creatine phosphate ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานในการทำงานของกล้ามเนื้อ จึงสามารถบ่งบอกให้เห็นถึงอัตราการสร้าง การหลั่ง การกรอง และการขับครีเอตินินออกมาทางไตได้ ถ้าหากครีเอตินินมีมากในเลือดหรือในปัสสาวะ ก็แสดงว่าไตมีการทำงานผิดปกติ ดังนั้นการทราบค่าสารนี้ในเลือดหรือในปัสสาวะจึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไตได้ ปัจจุบันนี้วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวัดครีเอตินินของห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกทั่วไป ทำโดยการวัดปฏิกิริยาระหว่างครีเอตินินกับ picric acid ตามวิธีของ Jaffe (B.D, G, 2002) แต่ค่อนข้างยุ่งยากที่จะวิเคราะห์ความเข้มข้นของครีเอตินินให้ได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากเกิดสารประกอบอื่น ๆ ที่รบกวนการวัดครีเอตินินขึ้นด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ให้ความสนใจการวัดปริมาณของครีเอตินิน โดยเลือกใช้วิธีพื้นฐานของการเปลี่ยนสีของสารละลายหรือ colorimetric (Jarinya, Fuangfa, 2015, Yi et al., 2015) หลักการของวิธีการนี้คือการทำให้ครีเอตินินเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับอนุภาคทองระดับนาโนและทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนไปตั้งแต่สีชมพูแดงจนถึงสีม่วงเป็นที่ทราบกันว่าอนุภาคทองนาโนได้รับความสนใจในการประยุกต์ใช้เป็นตัวรับรู้ทางชีววิทยา หรือ ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensor) เพื่อตรวจวัดสารชีวภาพชนิดต่างๆ สำหรับวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ใช้วิธีสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมีและการฉายรังสีแกมมา การสังเคราะห์จะใช้สารคงความเสถียรทางชีวภาพอย่างกลูตาไธโอน (Glutathione) ในการช่วยคงความเสถียรของอนุภาคทองนาโนเนื่องจากกลูตาไธโอนมีหมู่ไทออล (-SH) ที่สามารถจับกับผิวของอนุภาคทองนาโนได้อย่างแข็งแรง (Au-S bonding) (Seema et al., 2015, Su et al., 2015)

จากที่ได้มีการรายงานว่าทองนาโนมีความสามารถในการจับกับสารที่มีหมู่อะมิโนได้เป็นอย่างดีโดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโซเดียมซัลไฟด์ที่เคลือบบนผิวของอนุภาคทองนาโนกับครีเอตินิน หมู่ -NH ของครีเอตินินสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับสารคงความเสถียรที่เคลือบอยู่บนผิวของอนุภาคทองนาโนได้ ทำให้เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคทองนาโน และได้สารละลายทองนาโนที่มีสีชมพูเกิดขึ้น จึงเป็นสมบัติเฉพาะที่ทำให้สามารถนำไปใช้ในการออกแบบหรือประยุกต์ใช้งานในการตรวจสอบที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพของการตรวจวัดปริมาณของครีเอตินินเบื้องต้นในทางคลินิกได้ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคทองขนาดนาโนเมตรที่มีความเสถียร โดยวิธีการทางเคมีและรังสี
2. เพื่อสังเคราะห์อนุภาคทองขนาดนาโนเมตรที่เหมาะสม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัดครีเอตินินในปัสสาวะโดยวิธีพื้นฐานของการเกิดสีของสารละลาย
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของอนุภาคทองนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี และรังสี

วิธีการวิจัย

1. สารเคมี

ออริกคลอไรด์ (auric chloride) ในรูป $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O}$, ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-Sodium citrate), กลูต้าไธโอน (Glutathione), ครีเอตินีน (Creatinine), Britton-Robin buffer (BR) 40 มิลลิโมลาร์ (Joseph et al., 2013), ไอโซโพรพานอล (2-propanol) สารเคมีเหล่านี้เป็นของ Sigma-Aldrich (USA)

2. การสังเคราะห์อนุภาคทองขนาดนาโนเมตร

2.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองขนาดนาโนเมตรด้วยวิธีทางเคมี

การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนจากสารละลายออริกคลอไรด์ (auric chloride) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ไอออนของทองจะรีดิวซ์ด้วย 1.12 มิลลิโมลาร์ ไตรโซเดียมซิเตรท (Kimling et al., 2006) ภายใต้การปั่นเหวี่ยงอย่างแรงที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีการรีฟลักซ์ (Reflux) ใช้เวลาประมาณ 20 นาที เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เติม 0.03 ไมโครโมลาร์ กลูต้าไธโอน เพื่อเคลือบอนุภาคทอง ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงเวลา 15 นาที ศึกษาเปรียบเทียบกับสารละลายทองนาโนที่ปราศจากการเติมกลูต้าไธโอน โดยเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากการสังเคราะห์

2.2 การสังเคราะห์อนุภาคทองขนาดนาโนเมตรด้วยวิธีทางรังสี

การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนจากสารละลาย 0.25 มิลลิโมลาร์ ออริกคลอไรด์ (auric chloride) 1.12 มิลลิ-โมลาร์ ไตรโซเดียมซิเตรท และ 0.2 โมลาร์ ไอโซโพรพานอล สารละลายนี้ถูกทำให้อิ่มตัวด้วยไนโตรเจนเพื่อกำจัดออกซิเจน (Arnim, Dan, 1998) นำสารละลายไปฉายรังสีแกมมาจากต้นกำเนิดโคบอลต์-60 (Gamma chamber 5000) ที่อัตราปริมาณรังสี 3.2 กิโลเกรย์ต่อชั่วโมง อัตรารังสีนี้วัดโดยวิธี Fricke dosimetry สารละลายทองเมื่อฉายรังสีแล้ว เติม 0.03 ไมโครโมลาร์ กลูต้าไธโอน โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสารละลายที่มีกลูต้าไธโอนกับไม่มีกลูต้าไธโอน หลังการสังเคราะห์ทำการเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาสมบัติ และลักษณะพื้นฐานของอนุภาคทองนาโน

นำสารละลายทองนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีและวิธีทางรังสีที่มีและไม่มีกลูต้าไธโอนมาวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-spectrometer (Biochrom Libra S32, UK) ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ศึกษาลักษณะทางพื้นฐานและขนาดของอนุภาคทองนาโนด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM (SEM-Hitachi SU 8020, Japan) โดยขนาดของอนุภาควิเคราะห์จากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่วัดจาก 20 ถึง 200 อนุภาค

4. การตรวจวัดระดับครีเอตินีนโดยสารละลายอนุภาคทองขนาดนาโนเมตร

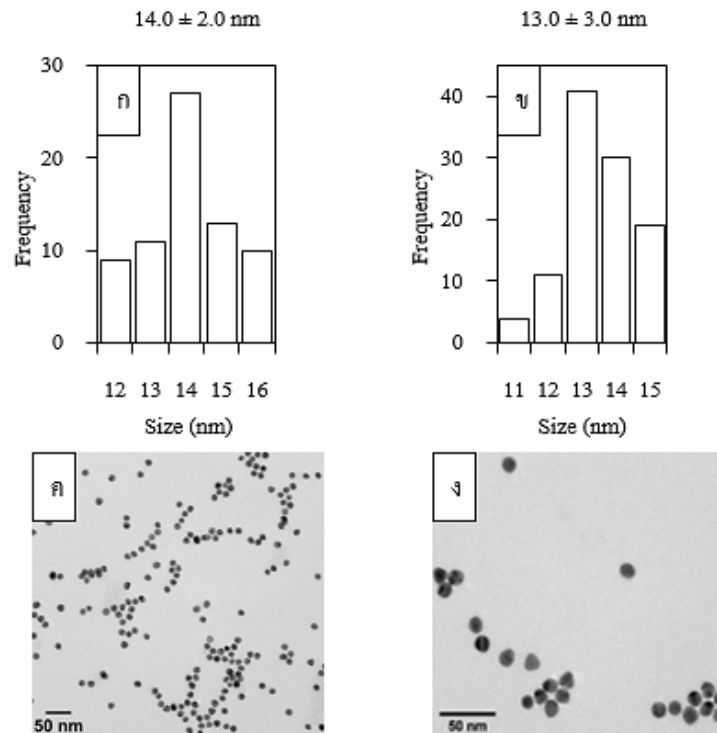
การตรวจวัดระดับครีเอตินีนในสารละลายเตรียมสารละลายครีเอตินีนที่มีความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครโมลาร์ ใช้สารละลายอนุภาคทองนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นของทอง 0.13 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย Britton-Robinson buffer ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ pH เท่ากับ 7.0 เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้สารละลายทำปฏิกิริยา 30 นาที (Yi et al., 2015) นำสารละลายวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis Spectrophotometer

ผลการวิจัย

1. การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน

1.1. การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยวิธีทางเคมี

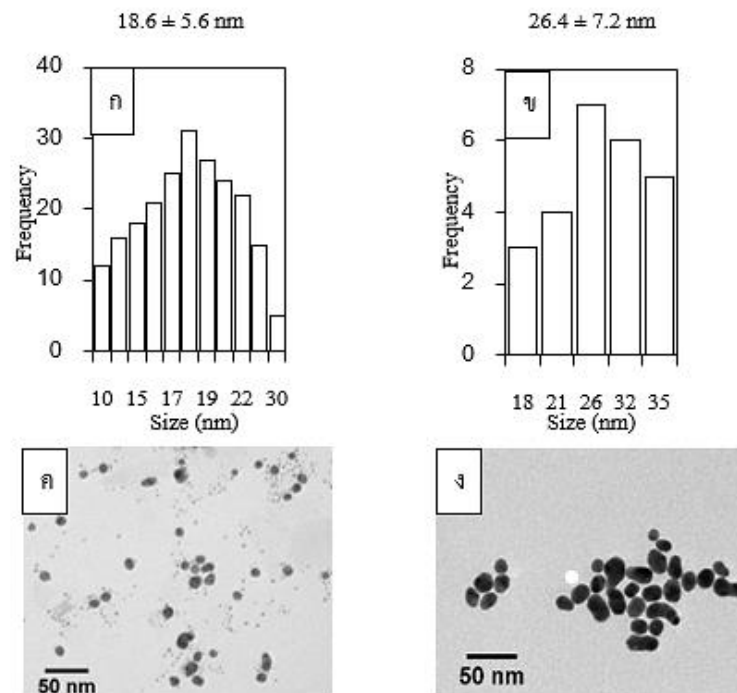
สารละลายอนุภาคทองขนาดนาโนดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (Harihar et al., 2014) ส่วนการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคทองนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้เทคนิค TEM พบว่าอนุภาคทองนาโนที่มีและไม่มีกลูต้าไธโอนเคลือบมีรูปร่างเป็นทรงกลม และมีขนาดใกล้เคียงกัน ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคเท่ากับ 14.0 ± 2.0 และ 13.0 ± 3.0 นาโนเมตร ตามแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กราฟการกระจายขนาดของอนุภาคนาโน และภาพถ่าย TEM แสดงรูปร่างของอนุภาคทองนาโน ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี โดย (ก, ข) อนุภาคทองนาโนที่ไม่ได้เคลือบด้วยกลูต้าไธโอน และ (ข, ง) อนุภาคทองนาโนที่มีเคลือบด้วย 0.03 ไมโครโมลาร์ กลูต้าไธโอน

1.2. การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนโดยวิธีฉายรังสี

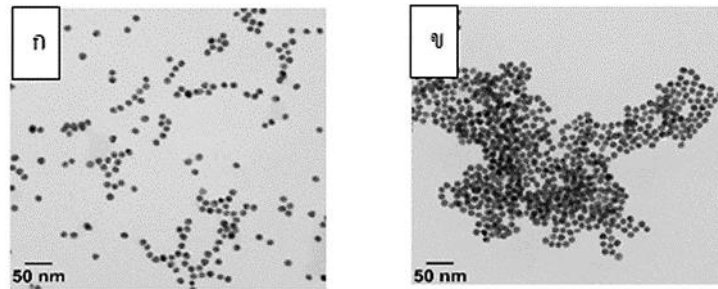
สารละลายอนุภาคทองขนาดนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีการฉายรังสีพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 520 ถึง 530 นาโนเมตร เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคทองนาโน ด้วยเทคนิค TEM พบว่าอนุภาคทองนาโนที่เคลือบและไม่ได้เคลือบด้วยกลูต้าไธโอนมีรูปร่างทรงกลม เมื่อเปรียบเทียบกับ การสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 18.6 ± 5.6 และ 26.4 ± 7.2 นาโน-เมตร ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟการกระจายตัวของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการฉายรังสี และภาพถ่าย TEM แสดงรูปร่างของอนุภาคทองนาโน โดย (ก, ค) อนุภาคทองนาโนที่ไม่มีกลูต้าไธโอนเคลือบ และ (ข, ง) อนุภาคทองนาโนที่เคลือบด้วย 0.03 ไมโครโมลาร์ กลูต้าไธโอน

2. การตรวจวัดครีอะตินีน โดยวิธีการเปลี่ยนสีของสารประกอบเชิงซ้อนกับอนุภาคทองขนาดนาโน

อนุภาคทองขนาดนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธีทางเคมีและรังสี เมื่อนำมาใช้ในการตรวจวัดระดับครีอะตินีนที่เตรียมขึ้นมีความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคทองขนาดนาโนเมตรที่ 0.13 มิลลิโมลาร์ พบว่า ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเติมครีอะตินีนผสมกับสารละลายอนุภาคทองขนาดนาโนเมตรสารละลายผสมนี้จะค่อย ๆ เปลี่ยนสีจากสีชมพูแดงเป็นสีม่วงแดง และสีม่วง ตามความเข้มข้นของสารครีอะตินีนที่เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนสีนี้แสดงถึงการรวมกลุ่มของอนุภาคทองที่เกิดพันธะกับครีอะตินีน (Yi et al., 2015) ยังมีครีอะตินีนมากขึ้นขนาดของอนุภาคทองที่รวมตัวกันจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อสารละลายทองนาโนทำปฏิกิริยากับครีอะตินีน โมเลกุลของครีอะตินีนจะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนตรงตำแหน่งของออกซิเจน และ -NH กับผิวของอนุภาคทองนาโนได้ ทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงชมพูเป็นสีม่วงแดงจนถึงม่วงอย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า กระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ทราบถึงการทำปฏิกิริยากันอย่างจำเพาะของครีอะตินีนต่ออนุภาคทองนาโน แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ภาพถ่ายจาก TEM อนุภาคทองที่ไม่มีครีอะตินิน (ก) และมีครีอะตินิน (ข)

ปรากฏการณ์การรวมตัวของอนุภาคทองนี้สามารถสังเกตได้จากภาพที่ 4, 6 และ 8 ซึ่งแสดงกราฟช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุภาคทองนาโนที่ 530 นาโนเมตร จะค่อย ๆ ลดลงในขณะที่การดูดกลืนแสงในช่วง 600 ถึง 650 นาโนเมตร จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งหมายถึงอนุภาคทองขนาดนาโนนี้เกิดการรวมตัวกันมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังนั้นสามารถสังเกตจากค่าสูงสุดของการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น และความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดเพิ่มขึ้น (Blue shift) (Jarinya, Fuangfa, 2015) และความสัมพันธ์ของค่าดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง 530 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของครีอะตินินมีแนวโน้มลดลง เป็นแบบเส้นตรงดังแสดงในภาพที่ 5, 7 และ 9

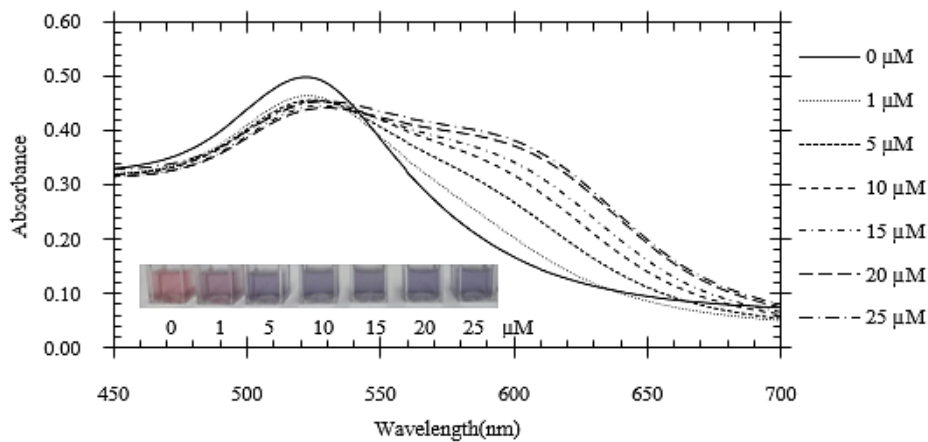
ในกรณีของอนุภาคทองที่ไม่มีการเคลือบผิวด้วยกลูต้าไรโอน การตรวจวัดระดับครีอะตินินมีความไว (Sensitivity) ในการตรวจวัดมากกว่าอนุภาคทองที่มีการเคลือบผิวด้วยกลูต้าไรโอน สังเกตได้จากค่าความชันของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของครีอะตินิน แสดงในภาพที่ 5 มีความชันมากกว่าการใช้อนุภาคทองที่มีการเคลือบผิวด้วยกลูต้าไรโอน ดังแสดงในภาพที่ 7 อย่างไรก็ตามค่าความคลาดเคลื่อนของการตรวจวัดระดับครีอะตินินที่ใช้อนุภาคทองที่ไม่มีการเคลือบผิวด้วยกลูต้าไรโอนมีค่ามากกว่าอนุภาคทองที่มีการเคลือบด้วยกลูต้าไรโอน ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 7 ตามลำดับ และภาพที่ 10

การตรวจวัดระดับครีอะตินินด้วยอนุภาคทองที่มีการเคลือบผิวด้วยกลูต้าไรโอนประสิทธิภาพในการตรวจวัดลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานของ Xiaopeng et al. 2015 ซึ่งพบว่า กลูต้าไรโอนสามารถป้องกันการเกิดการรวมตัวของอนุภาคทองได้ โดยกลูต้าไรโอนก่อให้เกิดการป้องกันการครีอะตินินในการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุภาคทอง (Xiaopeng et al., 2015) ในกรณีที่อนุภาคทองที่ไม่มีกลูต้าไรโอน การเข้าทำปฏิกิริยาของครีอะตินินจึงทำได้ดีกว่าการเคลือบผิวด้วยกลูต้าไรโอน นอกจากนี้ พบว่าเมื่อขนาดของโมเลกุลที่ใช้เป็นสารเคลือบอนุภาคทองมีขนาดใหญ่ขึ้น ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสีของสารละลายที่มีครีอะตินินจะลดลง ดังนั้นการตรวจวัดระดับครีอะตินินในตัวอย่างจึงขึ้นอยู่กับพื้นผิวของอนุภาคทอง

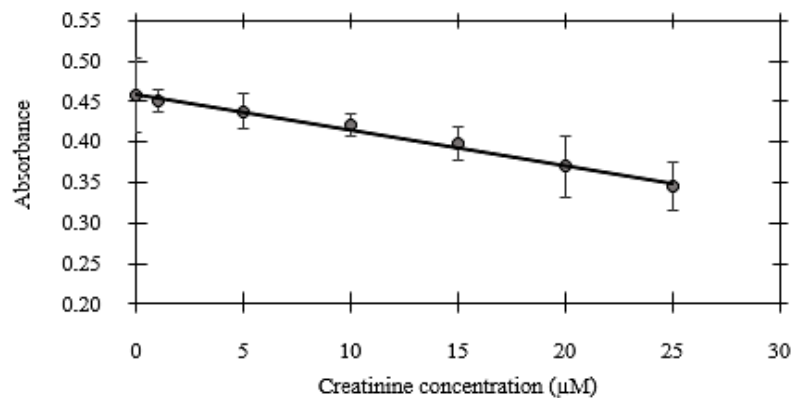
อนุภาคทองขนาดนาโนที่ได้จากสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมีและการฉายรังสี สามารถใช้สำหรับการตรวจวัดระดับปริมาณครีอะตินิน ทั้งนี้อนุภาคทองที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีการฉายรังสีนั้นมีขนาดใหญ่กว่าการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี การกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีการทางเคมีที่มีกลูต้าไรโอนและไม่มีกลูต้าไรโอนมีค่าแตกต่างกัน คือ 23 % และ 14 % ตามลำดับ ส่วนอนุภาคทองที่ได้จากการฉายรังสีที่มีกลูต้าไรโอนและไม่มีกลูต้าไรโอน มีการกระจายตัวของขนาดแตกต่างกัน คือ 27 % และ 32 % ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าขนาดของอนุภาคทองที่ได้จากการฉายรังสีมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคมากกว่า ดังแสดงในภาพที่ 1 ก, ค และ 2 ก, ค การตรวจวัดระดับครีอะตินินด้วยอนุภาคทองขนาดนาโนที่สังเคราะห์ได้จากวิธีการทางเคมีมีความไวในการตรวจวัดมากกว่าการใช้อนุภาคทองขนาดนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีการฉายรังสี สังเกตได้จากค่าความชันของ

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของครีเอตินีน ดังแสดงการเปรียบเทียบอนุภาคทองที่สังเคราะห์จากวิธีการทางเคมี และการฉายรังสี ในภาพที่ 10

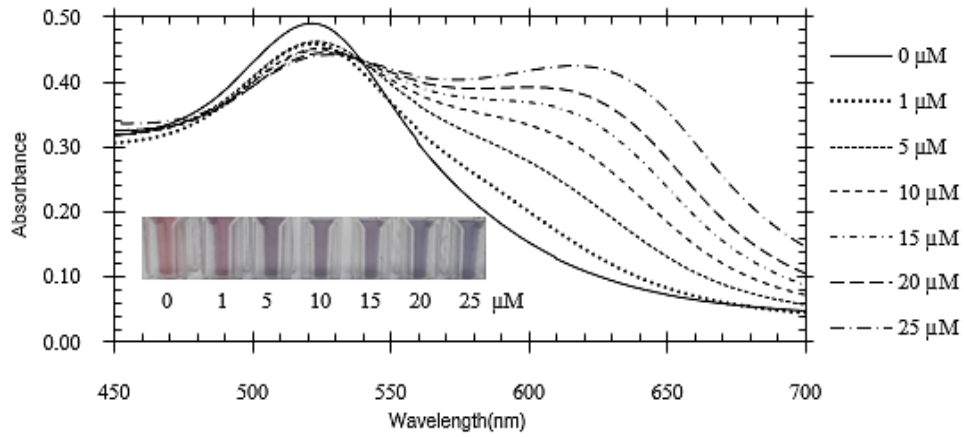
สีของสารละลายอนุภาคทองขนาดนาโนเมตรเกิดจากปรากฏการณ์เชิงแสงที่เรียกว่า surface plasmon resonance (SPR) ซึ่งเกิดจากอันตรกิริยาของแสงในช่วงที่ตามองเห็นกับอิเล็กตรอนในระดับชั้นนำไฟฟ้าของอนุภาคทองขนาดนาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงโดยรอบของอนุภาคทองขนาดนาโนเมตร เช่น ขนาด พื้นผิว การรวมตัวของอนุภาค และตัวกลางที่ละลายในสารละลาย เป็นต้น ซึ่งจะก่อให้เกิดการปรากฏการณ์เชิงแสง SPR เปลี่ยนไป (Catherin et al., 2008) เมื่อพิจารณาสีของสารละลายที่แตกต่างกัน การตรวจวัดระดับครีเอตินีนด้วยสารละลายอนุภาคทองซึ่งเกิดจากการรวมตัวของอนุภาคทองขนาดนาโนในสารละลาย ทำให้การดูดกลืนแสงเลื่อนไปทางความยาวคลื่นที่มากขึ้น (blue shift) หรือ อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น และ SPR เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นอนุภาคทองขนาดนาโนจึงมีการกระจายตัวของขนาด และให้ความไวในการตรวจวัดที่ต่างกัน ดังแสดงเปรียบเทียบในภาพที่ 10



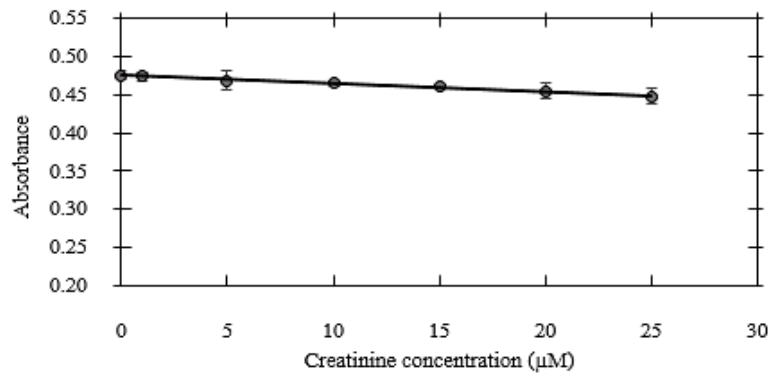
ภาพที่ 4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคทองนาโนที่ 0.13 มิลลิโมลาร์ ไม่มีกลูต้าไธโอน ซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี ทำปฏิกิริยากับครีเอตินีนที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 25 μM ที่ pH 7.0



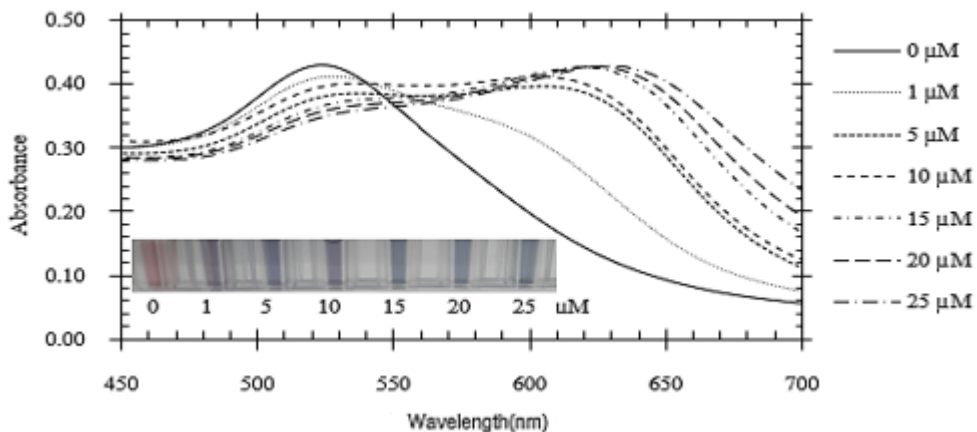
ภาพที่ 5 กราฟเส้นตรงแสดงค่าการลดลงของการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคทองนาโนที่ 0.13 มิลลิโมลาร์ ที่ไม่มีกลูต้าไธโอน ซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของครีเอตินีนที่เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ ที่ pH 7.0



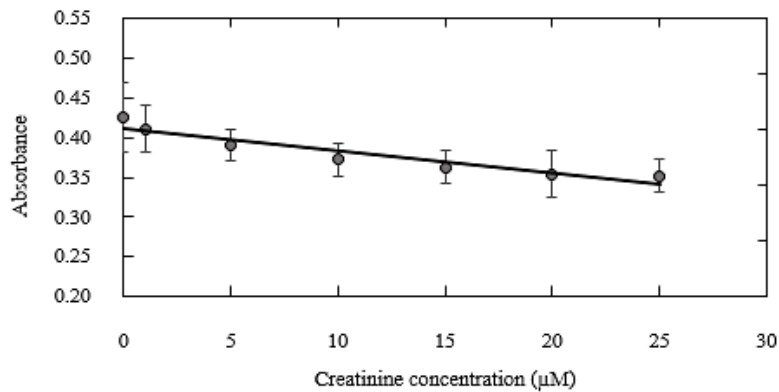
ภาพที่ 6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย 0.13 มิลลิโมลาร์ อนุภาคทองขนาดนาโนเมตร ที่มีกลูต้าไรโอน จากวิธีการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีทำปฏิกิริยากับครีอะตินีนที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ ที่ pH 7.0



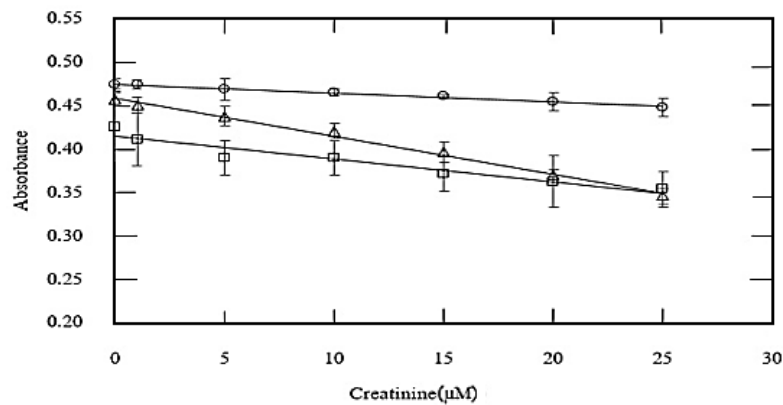
ภาพที่ 7 กราฟเส้นตรงแสดงค่าการลดลงของการดูดกลืนแสงของสารละลาย 0.13 มิลลิโมลาร์ อนุภาคทองขนาดนาโนเมตร มีกลูต้าไรโอน ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมีที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของครีอะตินีนที่เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ ที่ pH 7.0



ภาพที่ 8 การดูดกลืนแสงของสารละลาย 0.13 มิลลิโมลาร์ อนุภาคทองขนาดนาโนเมตรที่ไม่มีกลูต้าไรโอนจากวิธีการสังเคราะห์ด้วยการฉายรังสีทำปฏิกิริยากับครีอะตินีนที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ ที่ pH 7.0



ภาพที่ 9 กราฟเส้นตรงแสดงค่าการลดลงของการดูดกลืนแสงของสารละลาย 0.13 มิลลิโมลาร์ อนุภาคทองขนาดนาโนเมตรที่ไม่มีกลุ่มตัวไฮดรอกซิล ซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีการฉายรังสี ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของครีเอตินินที่เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ ที่ pH 7.0



ภาพที่ 10 กราฟเส้นตรงแสดงค่าการลดลงของการดูดกลืนแสงของสารละลาย 0.13 มิลลิโมลาร์ อนุภาคทองขนาดนาโนเมตรที่ไม่มีกลุ่มตัวไฮดรอกซิล (Δ) และ มีกลุ่มตัวไฮดรอกซิล (O) ซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี และอนุภาคทองขนาดนาโนเมตรที่ไม่มีกลุ่มตัวไฮดรอกซิล ซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีการฉายรังสี (□) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของครีเอตินินที่เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ ที่ pH 7.0

สรุปผลการวิจัย

อนุภาคทองขนาดนาโนสามารถสังเคราะห์ได้ด้วยวิธีการทางเคมีและวิธีการฉายรังสี อนุภาคทองขนาดนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมีโดยใช้สารไตรโซเดียมไซเตรตเป็นสารรีดิวซ์มีขนาดของอนุภาคทองที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าวิธีการสังเคราะห์ด้วยวิธีการฉายรังสี อนุภาคทองขนาดนาโนทั้งสองวิธีสามารถใช้สำหรับการตรวจวัดระดับปริมาณครีเอตินินได้ การตรวจวัดระดับครีเอตินินขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคทอง และความใกล้เคียงกันของอนุภาค ซึ่งจะส่งผลให้ความแม่นยำในการการตรวจวัดมีมากขึ้น นอกจากนี้การตรวจวัดระดับครีเอตินินยังขึ้นอยู่กับสภาพพื้นผิวของอนุภาคทองขนาดนาโนอีกด้วย การตรวจวัดครีเอตินินด้วยวิธีการที่กล่าวมานี้สามารถใช้ในการตรวจวัดระดับครีเอตินินได้ ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 4.6 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ ดังแสดงข้อมูลเปรียบเทียบในตารางที่ 1 (Present method) ดังนั้นด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถที่จะประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัดระดับของครีเอตินินในปัสสาวะในระดับที่ต่ำมากๆ ได้ต่อไป

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการตรวจวัดครีเอตินินโดยใช้เทคนิค ช่วงของการตรวจวัด และขีดจำกัดการตรวจวัด

วิธีการตรวจวัด	ช่วงการตรวจวัด (mM)	ขีดจำกัดการ ตรวจวัด (LOD)	อ้างอิง
Jaffe'-based procedure	0 – 6mM	0.72 mM	(Edward et al., 2013)
Glutathione (GSH) - protected gold nanoparticles	10–1000 μ M	1.21 μ M	(Xiaopeng et al., 2015)
Citrate-stabilized Gold nanoparticles	15 – 40 mg/L	13.7 mg/L	(Jarinya, Fuangfa, 2015)
Colorimetric method	0.1 – 20 mM	0.08 mM	(Yi et al., 2015)
Present method (Colorimetric method)	0 – 25 μ M	4.6 μ M	Present work

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนการดำเนินการวิจัย และขอขอบพระคุณภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป และสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ และงานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี ๒๕๖๑

เอกสารอ้างอิง

- กองบรรณาธิการ. Hall of Fame: นายแพทย์ประเสริฐ รัตนกิจจารุ. วารสารกรมการแพทย์ [วารสารออนไลน์] 2558; (กันยายน-ตุลาคม): 56-59.
- Arnim H, Dan M. Radiolytic control of the size of colloidal gold. *Langmuir* 1998; 14: 7392-7396.
- B.D. T. & G. R. Measurement of creatinine by Jaffe's reaction-determination of concentration of sodium hydroxide required for maximum color development in standard, urine and protein free filtrate of serum. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2002; 40: 352-354.
- Catherin JM, Anand MG, John WS, Patrick NS, Alaaldin MA, Edie C. G, Sarah C. B. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Accounts of Chemical Research* 2008; 41(12): 1721-1730.
- Collins AJ, Foley RN, Gilbertson DT, Chen SC. United states renal data system public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Kidney International Supplements* 2015; 5(1): 2-7.
- Edward PR, Dimitrios KK, Craig EB. An improved electrochemical creatinine detection method via a Jaffe-based procedure. *Analyst* 2013; 138(21): 6565-72.
- Harihar NV, Praveen S, R. M. C. Gold nanoparticle: synthesis and characterization. *Veterinary World* 2014; 7(2): 72-7.
- Jarinya S, Fuangfa U. Detection of urinary creatinine using gold nanoparticles after solid phase extraction. *Spectrochim Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015; 138: 381–386.
- Joseph E. Reynolds III, Mira J, Russell BV, Kyril MS. Spectral and redox properties of the GFP synthetic chromophores as a function of pH in buffered media. *The Royal Society of Chemistry*. 2013.

- Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B.* 2006; 110: 15700-15707.
- Seema G, Arnab D, Subho M. pH-dependent immobilization of urease on glutathione-capped gold nanoparticles. *Society for Biomaterials.* 2015; 103(5): 1771-83.
- Su X, Jiang H, Wang X. Thiols-induced rapid photoluminescent enhancement of glutathione-capped gold nanoparticles for intracellular thiols imaging applications. *Anal Chem.* 2015; Oct 20; 87(20): 10230-6.
- Xiaopeng H, Yingjie L, Jiahong P, Fushen L, Yaowen C, Wenhua G. Glutathione-protected hierarchical colorimetric response. *plasmonics* 2015; 10: 1107–1114.
- Yi H, Xianhui Z, Haili Y. Gold nanoparticles-based colorimetric and visual creatinine assay. *Microchim Acta.* 2015; 182: 2037–2043.