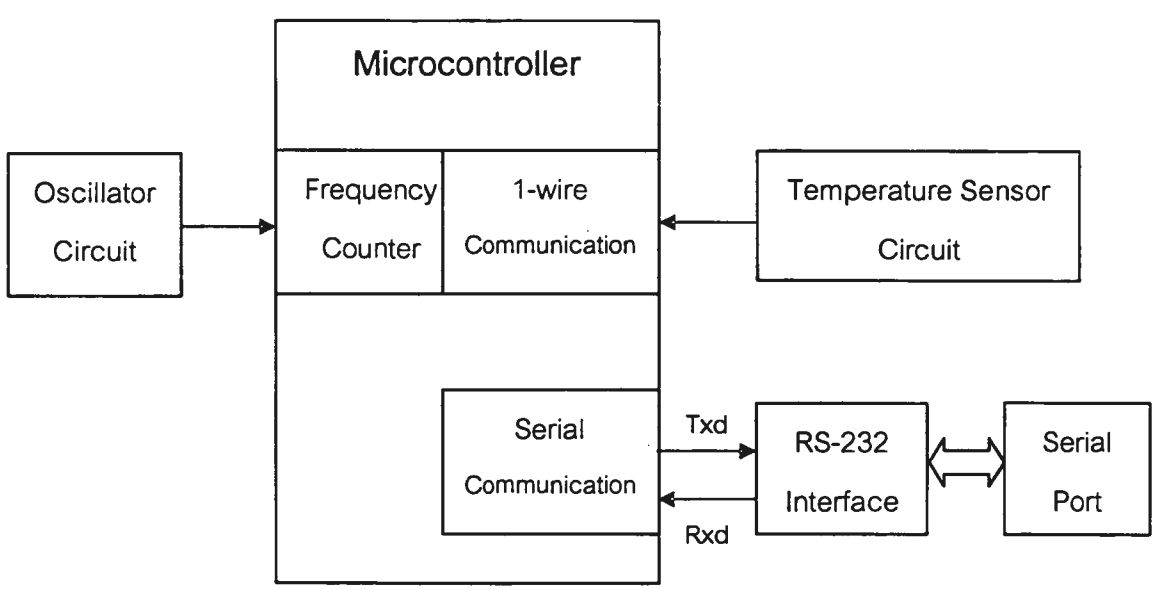
บทที่ 3

ระบบวัดและวิธีการทดลอง

เนื้อหาในบทนี้จะกล่าวถึงระบบวัดและวิธีการทดลอง โดยแบ่งเนื้อหาออกเป็น 3 ส่วนหลัก ส่วนแรก คือ ระบบวัดที่ใช้ในการทดลองซึ่งจะกล่าวถึงวงจรต่างๆที่ใช้ในการทดลอง รวมถึงตัวประมวลผลและจัดการข้อมูลที่ใช้ในการทดลอง ส่วนที่สองจะกล่าวถึงความสามารถของระบบวัด ซึ่งจะพิจารณาจากความไว (sensitivity) และความสามารถในการทำซ้ำ (repeatability) ของระบบวัด และส่วนสุดท้ายเป็นส่วนของวิธีการทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้

3.1 ระบบวัดที่ใช้ในการทดลอง

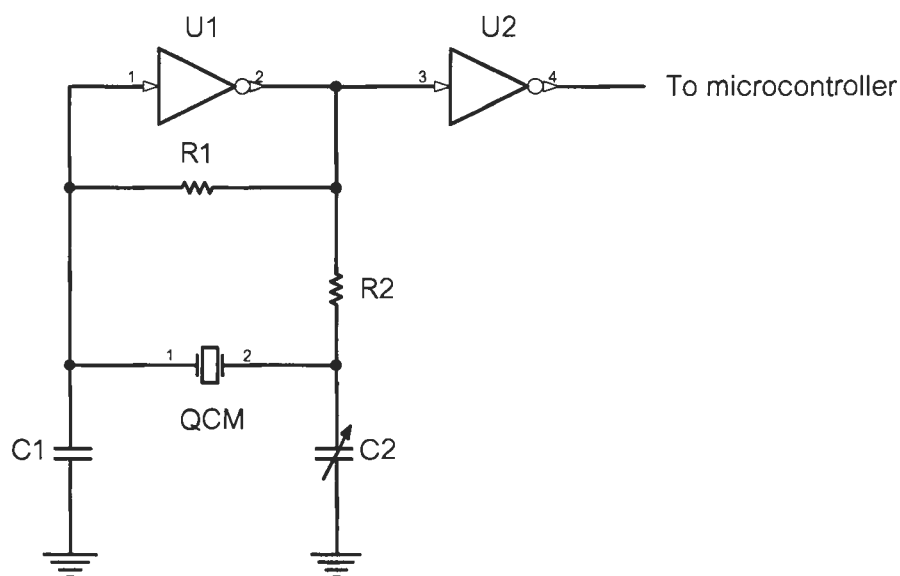
ระบบวัดที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วนหลัก คือ วงจรออสซิลเลเตอร์ วงจรวัดอุณหภูมิ วงจรเชื่อมต่อระหว่างระบบวัดกับคอมพิวเตอร์ และตัวประมวลผลและจัดการข้อมูล บล็อกไดอะแกรมของระบบวัดที่ใช้ในการทดลองแสดงไว้ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 บล็อกไดอะแกรมของระบบวัดที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 วงจรออสซิลเลเตอร์

วงจรออสซิลเลเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นวงจรออสซิลเลเตอร์แบบใช้เกตที่มีมุมเลื่อนเฟสเท่ากับ π ดังแสดงในรูปที่ 3.2 จากรูป QCM จะทำหน้าที่เสมือนเป็นวงจรเรโซแนนซ์ที่มีมุมเฟสประมาณ 180 องศา อินเวอร์เตอร์ U1 จะทำหน้าที่ขยายสัญญาณและเลื่อนมุมเฟสไปอีกประมาณ 180 องศา อินเวอร์เตอร์ U2 ใช้เพื่อปรับรูปร่างสัญญาณที่ได้ให้มีลักษณะคล้ายสัญญาณรูปสี่เหลี่ยมมากขึ้นและยังทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์อีกด้วย เนื่องจากการใช้วงจรออสซิลเลเตอร์แบบใช้เกตนี้อาจทำให้เกิดความถี่เรโซแนนซ์ที่ฮาร์มอนิกอื่นได้ถ้าใช้อินเวอร์เตอร์ที่มีความเร็วสูงและมีการป้อนกลับมากเกินไป ดังนั้น จึงต้องมีตัวต้านทาน R2 อยู่ในวงจรเพื่อทำหน้าที่ตัดความถี่เรโซแนนซ์ที่ฮาร์มอนิกอื่นออกไป ความถี่เรโซแนนซ์ของวงจรนี้สามารถปรับได้โดยการปรับค่าตัวเก็บประจุปรับค่าได้ C2



รูปที่ 3.2 วงจรออสซิลเลเตอร์แบบใช้เกทที่มีมุมเลื่อนเฟสเท่ากับ π เรเดียน

3.1.2 วงจรวัดอุณหภูมิ

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นตัวแปรที่สำคัญที่มีผลต่อความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนจะทำให้ความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM เปลี่ยนไปได้ ดังนั้น ระบบวัดจึงจำเป็นต้องมีวงจรวัดอุณหภูมิเพื่อใช้เปรียบเทียบอุณหภูมิที่วัดได้ในแต่ละขั้นตอนของการทดลองว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

เซนเซอร์วัดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนี้คือ วงจรรวมดีเอส 1820 (IC DS1820) ซึ่งเป็นวงจรรวมวัดอุณหภูมิแบบดิจิตอลที่ใช้การติดต่อสื่อสารแบบระบบบัส 1 สาย (1-wire bus)

3.1.3 วงจรเชื่อมต่อระหว่างระบบวัดกับคอมพิวเตอร์

เนื่องจากระดับแรงดันและการแทนความหมายของระดับลอจิกที่ใช้ในไมโครคอนโทรลเลอร์และที่ใช้ในคอมพิวเตอร์มีความแตกต่างกัน จึงจำเป็นที่จะต้องมีวงจรเชื่อมต่อเพื่อใช้เป็นตัวกลางในการติดต่อระหว่างไมโครคอนโทรลเลอร์กับคอมพิวเตอร์ วงจรเชื่อมต่อระหว่างระบบวัดกับคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ วงจรรวม MAX 232 ซึ่งทำหน้าที่แปลงแรงดันจากไมโครคอนโทรลเลอร์ซึ่งเป็นสัญญาณแบบ TTL ไปเป็นระดับสัญญาณ RS-232 เมื่อมีการส่งข้อมูลไปยังคอมพิวเตอร์ และแปลงระดับสัญญาณ RS-232 ไปเป็นสัญญาณแบบ TTL เมื่อมีการรับข้อมูลจากคอมพิวเตอร์

3.1.4 ตัวประมวลผลและจัดการข้อมูล

ในงานวิจัยนี้จะใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์ PIC16F628 เป็นตัวประมวลผลและจัดการข้อมูลทั้งหมดของระบบวัด โดยไมโครคอนโทรลเลอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวนับสัญญาณความถี่ที่ได้จากวงจรออสซิลเลเตอร์ ติดต่อสื่อสารผ่านระบบบัส 1 สายกับเซนเซอร์วัดอุณหภูมิ และส่งข้อมูลไปแสดงผลยังคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ตอนุกรม

สัญญาณความถี่ที่ได้จากวงจรออสซิลเลเตอร์จะถูกส่งไปยังไมโครคอนโทรลเลอร์เพื่อนับความถี่โดยใช้ไทเมอร์ที่มีอยู่ภายในไมโครคอนโทรลเลอร์ ในการนับสัญญาณความถี่นั้นจะเขียนโปรแกรมเพื่อสร้างสัญญาณเวลาฐานขนาด 1 วินาที แล้วใช้ไทเมอร์ภายในไมโครคอนโทรลเลอร์เป็นตัวนับ ความถี่ที่นับได้จะถูกเก็บไว้ในหน่วยความจำของไมโครคอนโทรลเลอร์แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยจากความถี่ 4 ค่าก่อนส่งค่าไปยังพอร์ตอนุกรมเพื่อแสดงผลผ่านคอมพิวเตอร์

สำหรับการวัดอุณหภูมินั้น วงจรรวมดีเอส 1820 ซึ่งเป็นวงจรรวมวัดอุณหภูมิแบบดิจิตอลจะรับและส่งข้อมูลผ่านระบบบัส 1 สายกับไมโครคอนโทรลเลอร์ ไมโครคอนโทรลเลอร์จะทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของวงจรรวม อ่านค่าอุณหภูมิที่เก็บไว้ในหน่วยความจำของวงจรรวม และส่งค่าอุณหภูมิไปยังพอร์ตอนุกรมเพื่อแสดงผลผ่านคอมพิวเตอร์

การรับและส่งข้อมูลระหว่างไมโครคอนโทรลเลอร์และคอมพิวเตอร์สามารถทำได้ผ่านพอร์ตอนุกรมเนื่องจากไมโครคอนโทรลเลอร์ที่ใช้นั้นมีโครงสร้างที่สนับสนุนการติดต่อกับอุปกรณ์

อื่นผ่านทางพอร์ตอนุกรมอยู่แล้ว โดยการรับและส่งข้อมูลจะรับและส่งผ่านทางขา RxD และ TxD ของไมโครคอนโทรลเลอร์

3.2 ความสามารถของระบบวัด

ความสามารถของระบบวัดที่จะกล่าวถึงในหัวข้อนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ความไวของ QCM และความสามารถในการทำซ้ำของการวัด โดยความไวของ QCM จะเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณ ในขณะที่สภาวะทำซ้ำได้ของการวัดจะเป็นค่าที่ได้จากการทดลอง

3.2.1 ความไว

ความไวของ QCM ในวิทยานิพนธ์นี้ หมายถึง ค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ต่อการเปลี่ยนแปลงของมวลที่มาเกาะที่ผิว QCM 1 นาโนกรัม ดังนั้น หน่วยของความไวของ QCM จึงเป็นเฮิรตซ์ต่อนาโนกรัม ในงานวิจัยนี้หาค่าความไวของ QCM ได้จากการคำนวณด้วยสมการของ Sauerbrey

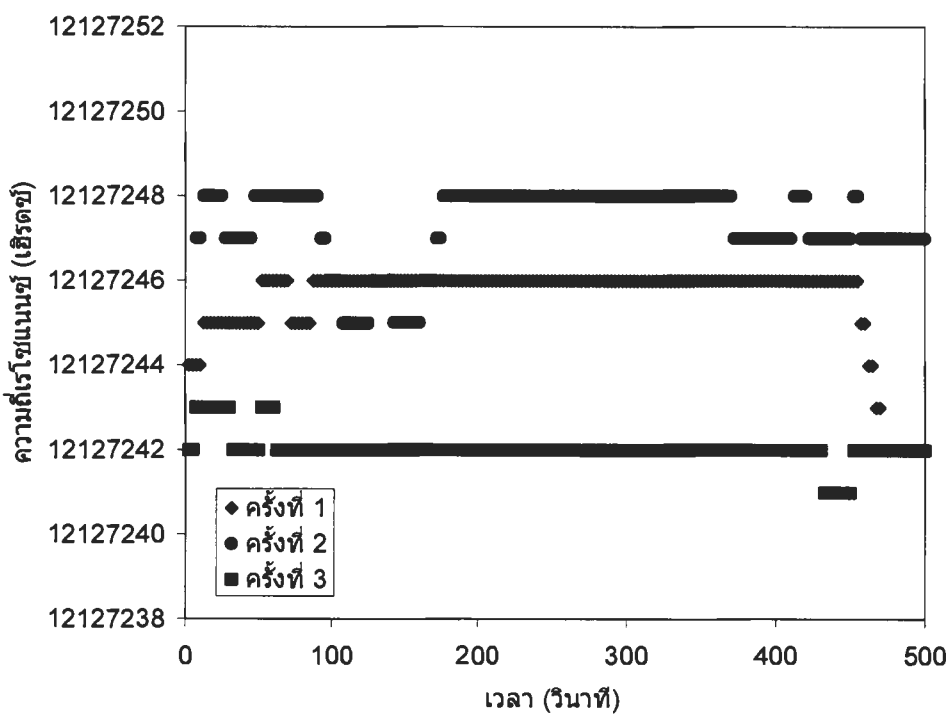
การทดลองทั้งหมดในวิทยานิพนธ์นี้ จะตรึงแอนติบอดีลงบนผิว QCM ในบริเวณที่เป็นผิวทองเท่านั้น เนื่องจากผิวทองของ QCM ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีรัศมี 2 มิลลิเมตร QCM ที่ใช้มีความถี่เรโซแนนซ์ 12 เมกะเฮิรตซ์ เมื่อแทนค่าความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM พื้นที่ผิวของทองซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.126 ตารางเซนติเมตร ความหนาแน่นของผลึกควอตซ์ซึ่งมีค่า 2.648 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และ shear modulus ซึ่งมีค่าเป็น 2.947 x 10^{11} กรัมต่อเซนติเมตรต่อวินาที^{2} ลงในสมการของ Sauerbrey ดังแสดงไว้ในสมการที่ 4.1 จะสามารถคำนวณความไวของ QCM ได้เท่ากับ -2.56 เฮิรตซ์ต่อนาโนกรัม

$$\Delta f = -\frac{2{f_0}^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} \qquad (4.1)$$

สมการที่ 4.1 นี้แสดงให้เห็นว่ายิ่งความถี่ f_0 มีค่าสูง QCM จะยิ่งมีความไวสูงขึ้น โดยเมื่อ f_0 มีค่าเพิ่มขึ้น 2 เท่าจะทำให้ความไวเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า

3.2.2 ความสามารถในการทำซ้ำ (repeatability)

ความสามารถในการทำซ้ำของการวัดในวิทยานิพนธ์นี้ หมายถึง ช่วงการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ ของ QCM ที่อยู่ในสภาวะเดียวกันเมื่อวัดซ้ำกันหลายครั้ง ระบบวัดที่ดีเมื่อนำไปวัดความถี่เรโซแนนซ์ ของ QCM ที่อยู่ในสภาวะเดียวกันซ้ำหลายครั้งควรจะวัดความถี่เรโซแนนซ์ได้ค่าเดิมหรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยๆ นั่นคือ ควรมีความสามารถในการทำซ้ำที่ดีเพราะจะแสดงให้เห็นว่าระบบวัดสามารถวัดซ้ำได้ ความสามารถในการทำซ้ำในวิทยานิพนธ์นี้เป็นค่าที่ได้จากการทดลองวัดความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM ที่อยู่ในสภาพเดิมตลอด คือ ไม่มีมวลมาเกาะที่ผิวเพิ่มขึ้น และควบคุมอุณหภูมิในการวัดให้คงที่ตลอด



รูปที่ 3.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์กับเวลาเมื่อมีการวัดซ้ำกันหลายครั้ง

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ ของ QCM กับเวลาเมื่อมีการวัดซ้ำกันหลายครั้งแสดงไว้ดังรูปที่ 3.3 ในการทดลองนี้ได้ทดสอบหาความสามารถในการทำซ้ำของการวัดโดยการวัดความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM ตัวเดิมต่อเนื่องนาน 500 วินาที เป็นจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 ชั่วโมง จากรูปจะเห็นว่าความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM ค่าต่ำสุดที่วัดได้ คือ 12.127241 เมกะเฮิรตซ์ และความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM ค่าสูงสุดที่วัดได้ คือ 12.127248 เมกะเฮิรตซ์ เมื่อ

คำนวณหาช่วงการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์จะพบว่าความสามารถในการทำซ้ำของการวัดมีค่าอยู่ในช่วง 7 เฮิรตซ์

นอกจากนี้ กราฟรูปที่ 3.3 ยังแสดงให้เห็นว่าระบบวัดมีเสถียรภาพระยะสั้นที่ดี เนื่องจากความถี่เรโซแนนซ์ที่วัดได้ในช่วงเวลา 500 วินาทีของการวัดแต่ละครั้งนั้นมีค่าการแกว่งอยู่ในช่วง +/- 3 เฮิรตซ์ เท่านั้น

3.3 การประดิษฐ์ตัวตรวจรู้ที่ใช้ในงานวิจัย

ขั้นตอนการประดิษฐ์ตัวตรวจรู้ที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้สามารถแบ่งออกได้เป็นการทำความสะอาดผิว การปรับสภาพผิวด้วยโพลีสไตรีน การตรึงแอนติบอดี และการวัดแอนติเจน การวัดความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM ในวิทยานิพนธ์นี้เป็นการวัดความถี่เรโซแนนซ์หลังจากการทดลองทีละขั้นตอนจากนั้นนำความถี่เรโซแนนซ์ที่วัดได้จากแต่ละขั้นตอนที่ทำต่อเนื่องกันมาคำนวณหาความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไป จากค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปจะทำให้สามารถคำนวณมวลที่มาเกาะเพิ่มที่ผิว QCM จากการทดลองในแต่ละขั้นตอนได้ ผังงานวิธีการทดลองที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้แสดงไว้ดังรูปที่ 3.4

3.3.1 การทำความสะอาดผิว QCM

ความสะอาดของ QCM มีผลต่อการเกาะของโพลีสไตรีนบนผิว QCM ดังนั้น ก่อนการใช้ QCM ทุกครั้งจึงต้องทำความสะอาดผิว QCM ก่อน ถึงแม้ว่า QCM ที่ใช้จะเป็น QCM ใหม่ที่ไม่เคยผ่านการใช้มาก่อนก็ตาม การทำความสะอาดผิว QCM ที่ใช้ในการทดลองจะใช้การจุ่ม QCM ในสารละลาย piranha ที่มีอัตราส่วนของกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสามต่อหนึ่ง ใช้เวลานาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำปราศจากอิออนและเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

3.3.2 การปรับสภาพผิวของ QCM ด้วยโพลีสไตรีน

การปรับสภาพผิวของ QCM ด้วยโพลีสไตรีนเป็นการปรับสภาพให้ผิวของ QCM เหมาะสมแก่การตรึงแอนติบอดี โดยจะปรับสภาพผิว QCM ทันทีหลังจากที่ทำความสะอาด QCM เสร็จเรียบร้อยเพื่อป้องกันสิ่งสกปรกที่อาจตกลงไปบนผิวซึ่งอาจจะทำให้ผิวของโพลีสไตรีนที่ได้ไม่

เรียบ สาเหตุที่เลือกใช้โพลีสไตรีนนั้น เนื่องจากโพลีสไตรีนเป็นพอลีเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ ELISA และใช้ในการตรึงแอนติบอดีทั่วไป ในการปรับสภาพผิวของ QCM ด้วยโพลีสไตรีนนั้น ทำได้โดยการใช้ไมโครปิเปตต์หยดสารละลายโพลีสไตรีนในเบนซีนความเข้มข้นประมาณ 1% ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนผิว QCM แล้วหมุนเหวี่ยง (spin) ด้วยเครื่องหมุน (spinner) ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 วินาที QCM ทั้งสองด้านจะถูกปรับสภาพผิวด้วยวิธีการเดียวกัน

3.3.3 การตรึงแอนติบอดีลงบนผิว QCM

แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 777 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร การเจือจางความเข้มข้นของแอนติบอดีเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการจะใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 M และมีค่า pH เท่ากับ 7 เป็นตัวทำละลาย และจะตรึงแอนติบอดีลงบนผิว QCM ที่เคลือบโพลีสไตรีนแล้วโดยการใช้ไมโครปิเปตต์หยดแอนติบอดีปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบน QCM เฉพาะบริเวณที่เป็นผิวทองเท่านั้น ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (สำหรับการทดลองที่ใช้เวลาและอุณหภูมิในการตรึงที่ต่างไปจากนี้จะระบุเงื่อนไขที่ใช้ในการทดลองไว้ในหัวข้อนั้น) เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้วจะล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ได้เกาะบน QCM ออกโดยการแช่ QCM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 M และมีค่า pH เท่ากับ 7 พร้อมทั้งเขย่าด้วยเครื่องเขย่าออร์บิทัล (orbital shaker) ความเร็ว 75 รอบต่อนาที นาน 3 นาที และแช่ QCM ต่อในน้ำปราศจากอิออน พร้อมทั้งเขย่าด้วยเครื่องเขย่าออร์บิทัล ความเร็ว 75 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จากนั้นเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

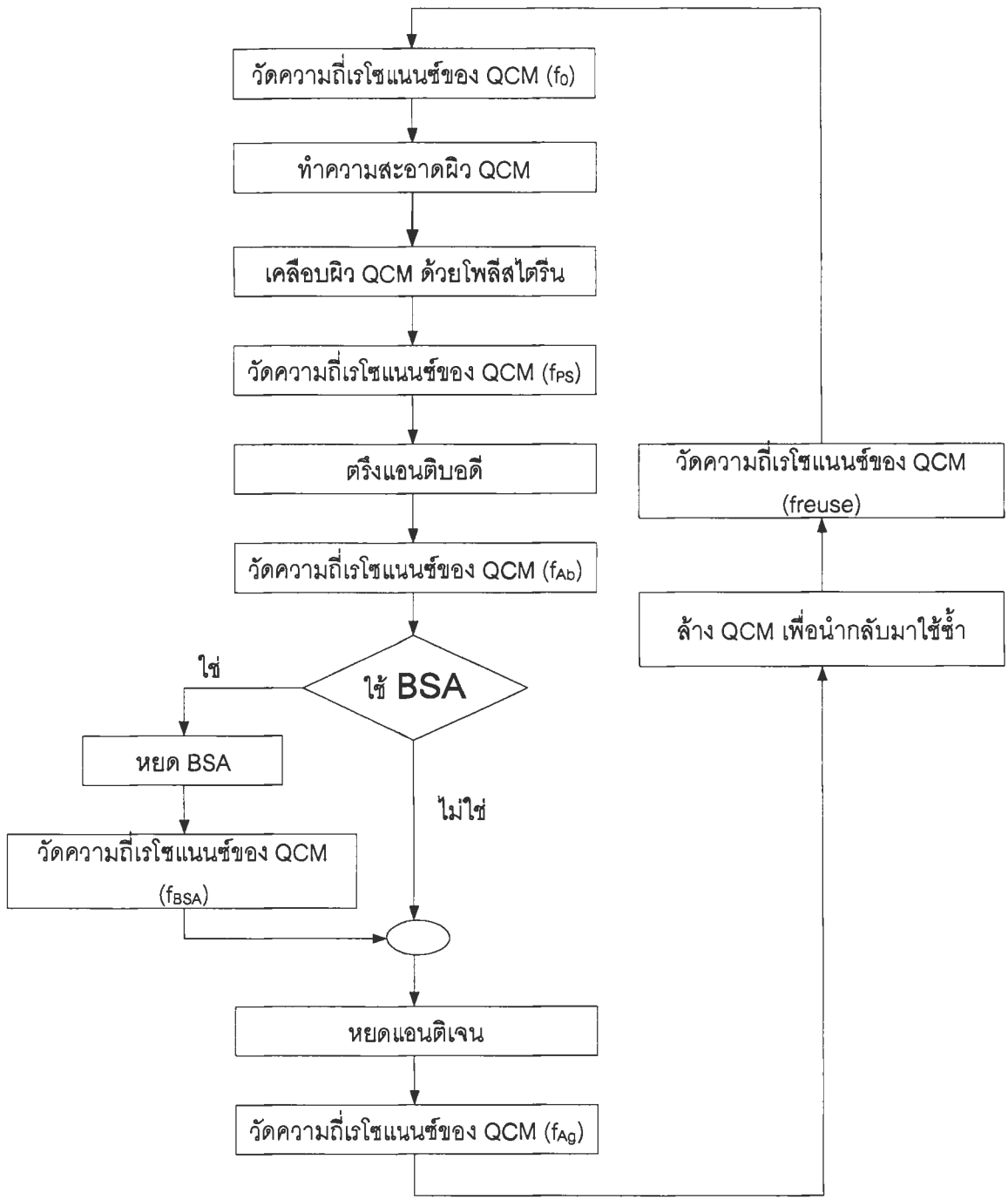
3.3.4การวัดแอนติเจนด้วย QCM

แอนติเจนที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 404 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร การเจือจางความเข้มข้นของแอนติเจนทำได้โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 M และมีค่า pH เท่ากับ 7 เป็นตัวทำละลาย ในการวัดแอนติเจนนั้นจะหยดแอนติเจนที่มีความเข้มข้นตามที่ต้องการลงบน QCM ที่ตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนตัวนั้นไว้เรียบร้อยแล้ว จากนั้นทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้แอนติเจนจับกับแอนติบอดี เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว แอนติเจนส่วนเกินจะถูกล้างออกโดยการแช่ QCM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พร้อมทั้งเขย่าด้วยเครื่องเขย่าออร์บิทัล ความเร็ว 75 รอบต่อนาที นาน 3 นาที และแช่ QCM ต่อในน้ำ

ปราศจากอิออน พร้อมทั้งเขย่าด้วยเครื่องเขย่าออร์บิทัล ความเร็ว 75 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จากนั้นเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

3.3.5 การล้าง QCM เพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ

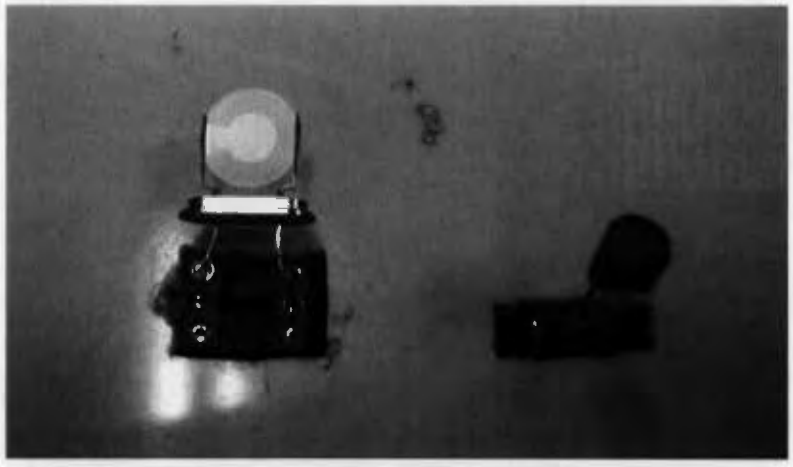
การล้าง QCM ที่เคยใช้แล้วและต้องการนำกลับมาใช้ซ้ำนั้นจะใช้เบนซีนเป็นตัวละลายโพลีสไตรีนที่เกาะอยู่บนผิว QCM ให้หลุดออกไป โดยในการล้างจะแช่ QCM ในเบนซีนแล้วโซนิเคต (sonicate) โดยใช้โซนิเคเตอร์ (sonicator) นาน 5 นาที เปลี่ยนเบนซีนใหม่แล้วโซนิเคตอีกครั้ง จากนั้นแช่ QCM ในแอลกอฮอล์และน้ำปราศจากอิออน พร้อมทั้งโซนิเคตด้วยโซนิเคเตอร์นาน 5 นาทีทุกครั้ง จากนั้นเป่า QCM ให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน



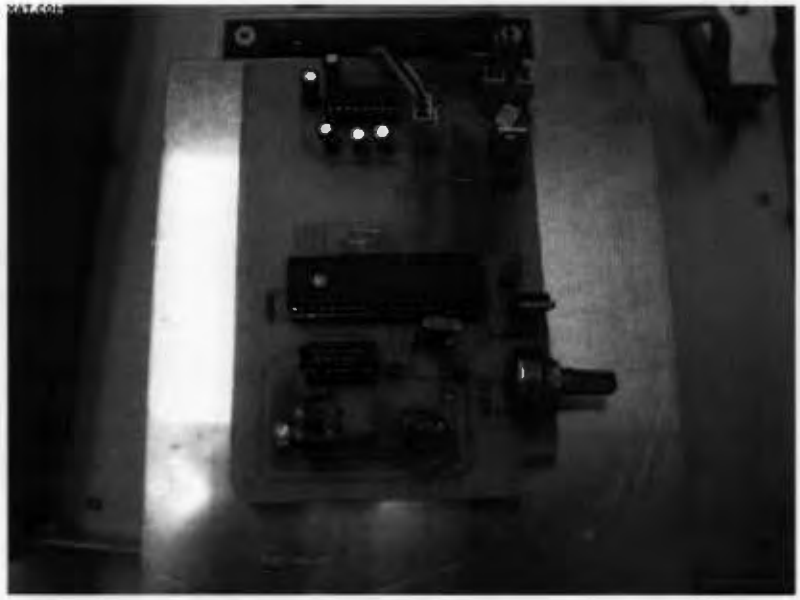
รูปที่ 3.4 ผังงานวิธีการทดลองที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

รูประบบวัดและเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยแสดงไว้ดังรูปที่ 3.5 - 3.11

รูปที่ 3.5 ระบบวัดที่ใช้ในงานวิจัย



รูปที่ 3.6 QCM และเซนเซอร์วัดอุณหภูมิที่ใช้ในงานวิจัย



รูปที่ 3.7 วงจรวัดที่ใช้ในงานวิจัย

รูปที่ 3.8 เครื่องหมุน (spinner) ที่ใช้ในงานวิจัย

รูปที่ 3.9 เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) ที่ใช้ในงานวิจัย

รูปที่ 3.10 การโซนิเคต QCM ด้วยโซนิเคเตอร์

รูปที่ 3.11 เครื่องเขย่าออร์บิทัล (orbital shaker)