

บทที่ 2

รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

โครงการย่อยที่ 1: การคัดกรองแบบรู้ผลเร็วเพื่อการค้นหายาใหม่ (High Throughput Screening for Drug Discovery)

การคัดกรองแบบรู้ผลเร็ว (high throughput screening) เป็นเทคนิคที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายทั้งในอุตสาหกรรมยา และการแพทย์ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความสำคัญและจำเป็นต่อประเทศที่กำลังพัฒนา และด้อยพัฒนาเป็นอย่างมาก เนื่องจากสาเหตุการตายของประชากรเหล่านี้ส่วนใหญ่มาจากการเป็นโรคเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน อัลไซเมอร์ เป็นต้น ดังนั้นการการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์แบบรู้ผลเร็ว ให้มีความไวและสามารถวิเคราะห์สารในปริมาณที่น้อยมากๆ ได้ จะเป็นการลดการเสียชีวิตจากโรคเหล่านี้ได้ เนื่องจากทำให้แพทย์สามารถทำการรักษาผู้ป่วยได้ทันก่อนที่จะเป็นหนักจนไม่สามารถทำการรักษาได้ หรืออาจนำเทคนิคดังกล่าวมาช่วยในการหาสารที่ช่วยต้านโรคร้ายแรงเหล่านี้ได้ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) นั้นเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระที่ร่างกายได้รับจากสิ่งแวดล้อม เช่น ควันบุหรี่ แสงแดด รังสี UV ฯลฯ ให้กลายเป็นสารที่ไม่อันตรายต่อเซลล์ร่างกาย สามารถป้องกันและซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์ร่างกายจากออกซิเจนได้ โดยมีงานวิจัยมากมายที่บ่งชี้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลายโรคโดยเฉพาะ โรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคหัวใจ เป็นต้น รวมทั้งยังช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนของร่างกายที่ทำให้เกิดการชราได้อีกด้วย โดยสารต้านอนุมูลิสระนั้นพบมากใน พืชสมุนไพรไทย เช่น มะรุม มะระขี้นก ตะไคร้ ฯลฯ โดยในพืชสมุนไพรเหล่านี้ในการนำมาบริโภคส่วนใหญ่ก็นำมาดัดแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ชาสมุนไพรต่างๆ นอกจากพืชสมุนไพรแล้ว พบว่าในผัก เช่น ผักดียว ผักแพ้ว และผักขีเหล็ก ที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และผลไม้ เช่น ข้าวโศด ก็มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระอยู่มากอีกด้วย

ดังนั้นในโครงการย่อยที่ 1 นี้คณะผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะทำการพัฒนาเทคนิคการคัดกรองแบบรู้ผลเร็ว และเครื่องมือใหม่ เพื่อให้สามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว รวดไว ใช้งานง่าย และราคาถูก โดยผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาเครื่องมือใหม่สำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ 2 เครื่อง และเทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์ 4 เทคนิค ได้ทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ในตัวอย่างชาสมุนไพรไทย ดังแสดงในตารางที่ 1 และการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาสมุนไพร

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
Ascorbic acid	1. ใช้เครื่อง AO Screener วัดสีของรีเอเจนต์ที่จางลงเมื่อ PHTH*+ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 2-12 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ $R^2 = 0.9954$ - จิตจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 0.91 มิลลิกรัมต่อลิตร - วัดได้ 1,440 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (% RSD) เท่ากับ 2.9-5.8 หมายเหตุ: ใช้น้ำ- acetonitrile (50:50) เป็นตัวทำละลาย : รายละเอียดดังภาคผนวก 1 : ตัวอย่างจริง คือ ชามะรุม	1) เป็นวิธีที่คัดกรองได้รวดเร็ว และถูกเมื่อเทียบกับเครื่อง wellplate reader ที่สั่งซื้อจากต่างประเทศซึ่งมีราคาประมาณ 500,000 บาทขึ้นไป 2) สามารถพัฒนาต่อได้เพื่อวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรอื่นๆที่สกัดในน้ำและอะซิโตนไทรท์ 3) สามารถพัฒนาต่อสำหรับวัดปฏิกิริยา radical scavenging อื่นๆเช่น DPPH, ABTS หรือวิเคราะห์ Total phenolic compounds โดยวิธี Folin Ciocalteu	1) ต้องกำลังศึกษาตัวทำละลายอื่นๆ เช่นเอทานอล 2) ต้องทำการพัฒนาต่อยอดด้านการเขียน software จะทำให้สามารถใช้เครื่องได้ง่ายขึ้น และสามารถประมวลผลเป็นกราฟทันทีหลังจากวัดเสร็จ เพื่อให้ง่ายต่อการคัดกรอง 3) ถ้าสารสกัดสมุนไพรมีสีเข้มจะรบกวนการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับวิธีABTS
	2. ใช้เครื่องแบนกล (ใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า) <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 10-100 ไมโครโมลต่อลิตรที่ $R^2 = 0.9985$ - จิตจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 10 ไมโครโมลต่อลิตร - วัดได้ 24 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง หมายเหตุ: รายละเอียดดังภาคผนวก 2 : ตัวอย่างชาที่ใช้แสดงในหน้าที่ 17	1) ราคาในการวิเคราะห์ต่ำ 2) ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น 3) ใช้งานง่ายเนื่องจากเป็นระบบอัตโนมัติ	1) เวลาในการวิเคราะห์นาน ต้องทำการการปรับปรุง พารามิเตอร์ต่างๆต่อไป 2) ปริมาณสารละลายที่ใช้ยังมากอยู่ แต่ทำให้น้อยลงโดยเปลี่ยนจาก ไมโครไโตเตอร์ เพลทขนาด 24 หลุม เป็น ขนาด 96 หลุม

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
Allopurinol	1. ใช้เครื่อง SI-XOD-COL ใช้เอนไซม์ร่วมกับระบบของไหล) (และตรวจวัดสี <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.1-1.0 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ $R^2 = 0.982$ - ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 0.91 มิลลิกรัมต่อลิตร - วัดได้ 30 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (% RSD) เท่ากับ 0.9% (0, n=7) และ 1.5% (0.2, n=7) หมายเหตุ: ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย : รายละเอียดดังภาคผนวก 3 : ตัวอย่างชาที่ใช้วิเคราะห์แสดงในหน้าที่ 29	1) เป็นระบบที่ประหยัดใช้สารปริมาณน้อย 2) ใช้เวลาน้อย 3) เป็นระบบที่ออกแบบให้ทำงานแบบอัตโนมัติควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ 4) ตัวทำละลายที่ใช้เป็นน้ำ ง่ายกับการจัดการด้านของเสีย	1) ระบบอาจมีราคาสูง แต่เนื่องจากเป็นระบบอัตโนมัติ จะลดความผิดพลาดได้มากกว่าระบบที่ไม่เป็นอัตโนมัติ และ สามารถนำไปพัฒนาใช้กับการวิเคราะห์อื่นๆได้ 2) เนื่องจากการวัดสี สารที่สกัดที่มีสีเข้มอาจรบกวนการวิเคราะห์

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
Gallic acid (Phenolic)	1. ระบบ microfluidic จาก PMMA (ตรวจวัดสี) <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 2-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ $R^2 = 0.9922$ - จิตจำกัลดำสุดของการตรวจวัดที่ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร - วัดได้ 20 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (% RSD) เท่ากับ 3.5 หมายเหตุ: รายละเอียดดังภาคผนวก 1 : ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในหน้าที่ 16	1) ระบบใช้สารปริมาณน้อย สร้างของเสีย น้อย 2) ราคาในการวิเคราะห์ต่ำ 3) สามารถศึกษาทั้ง antioxidant และ total phenolic พร้อมกันเพื่อประโยชน์ในการคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถประเมินกลุ่มฟังก์ชันนอลของสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการคัดกรองข้อมูลในการค้นหายาใหม่จากสมุนไพร	1) ยังเป็น semi-automatic ยังใช้การฉีดตัวอย่างผ่าน Injector 2) ระบบนำสารเป็น syringe pump ซึ่งยังมีราคาแพง 3) สารตัวอย่างยังใช้น้ำเป็นตัวสกัด ซึ่งยังไม่ได้ศึกษาถึงตัวสกัดอื่นๆ ว่ามีข้อจำกัดหรือไม่ 4) สีของตัวอย่างที่เข้มจะรบกวนการวิเคราะห์
	2. ใช้เครื่องแขนกล (ใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า) <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 2.5-27.5 ไมโครโมลต่อลิตร ที่ $R^2 = 0.9987$ - จิตจำกัลดำสุดของการตรวจวัดที่ 2.5 ไมโครโมลต่อลิตร - วัดได้ 24 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง หมายเหตุ: รายละเอียดดังภาคผนวก 2 : ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในหน้าที่ 17	1) ราคาในการวิเคราะห์ต่ำ 2) ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น 3) ใช้งานง่ายเนื่องจากเป็นระบบอัตโนมัติ	1) เวลาในการวิเคราะห์นานอ ต้องทำการการปรับปรุง พารามิเตอร์ต่างๆต่อไป 2) ปริมาณสารละลายที่ใช้ยังมากอยู่ แต่ทำให้น้อยลงโดย เปลี่ยนจาก ไมโครไตเตอร์ เฟลทขนาด 24 หลุม เป็น ขนาด 96 หลุม

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
Trolox (Antioxidant)	1. ระบบ microfluidic จาก PMMA (ตรวจวัดสี) <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 10-60 ไมโครโมลต่อลิตร ที่ $R^2 = 0.9900$ - จิตจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 2.5 ไมโครโมลต่อลิตร - วัดได้ 20 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (% RSD) เท่ากับ 4.0 หมายเหตุ: ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย : รายละเอียดดังภาคผนวก 1 : ตัวอย่างชาที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในหน้าที่ 16	1) ระบบใช้สารปริมาณน้อย สร้างของเสีย น้อย 2) ราคาในการวิเคราะห์ต่ำ 3) สามารถศึกษาทั้ง antioxidant และ total phenolic พร้อมกันเพื่อประโยชน์ในการคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถประเมินกลุ่มฟังก์ชันนอลของสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการคัดกรองข้อมูลในการค้นหายาใหม่จากสมุนไพร	1) ยังเป็น semi-automatic ยังใช้การฉีดตัวอย่างผ่าน Injector 2) ระบบนำสารเป็น syringe pump ซึ่งยังมีราคาแพง 3) สารตัวอย่างยังใช้น้ำเป็นตัวสกัด ซึ่งยังไม่ได้ศึกษาถึงตัวสกัดอื่นๆ ว่ามีข้อจำกัดหรือไม่ 4) สีของตัวอย่างที่เข้มจะรบกวนการวิเคราะห์
	2. ใช้เครื่องแขนกล (ใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า) <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 2.5-27.5 ไมโครโมลต่อลิตรที่ $R^2 = 0.9987$ - จิตจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 2.5 ไมโครโมลต่อลิตร - วัดได้ 24 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง หมายเหตุ: รายละเอียดดังภาคผนวก 2 : ตัวอย่างชาที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในหน้าที่ 17	1) ราคาในการวิเคราะห์ต่ำ 2) ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น 3) ใช้งานง่ายเนื่องจากเป็นระบบอัตโนมัติ	1) เวลาในการวิเคราะห์นานอ ต้องทำการการปรับปรุง พารามิเตอร์ต่างๆต่อไป 2) ปริมาณสารละลายที่ใช้ยังมากอยู่ แต่ทำให้น้อยลงโดย เปลี่ยนจาก ไมโครไดเตอร์เพลทขนาด 24 หลุม เป็น ขนาด 96 หลุม

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างผลไม้ (ข้าวโพด)

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
Ferulic acid	1. ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 3-140 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ $R^2 = 0.999$ - วัดได้ 30 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (% RSD) เท่ากับ 3.4 หมายเหตุ: รายละเอียดดังภาคผนวก 4	1) ราคาถูก (lab on paper 25 บาทต่อชิ้น) 2) ใช้รีเอเจนต์น้อยมาก 3) ใช้งานง่าย	1) โพลีเมอร์ที่ใช้ในงานนี้ยังมีราคาแพง ซึ่งซึ่งจากข้อเสียนี้ จะนำไปสู่การพัฒนาปรับปรุงอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษที่ใช้พอลิเมอร์ชนิดอื่น ที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์ที่ใช้อยู่จะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษได้

1.1. การพัฒนาระบบวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่ที่รวดเร็วเพื่อประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย

1.1.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

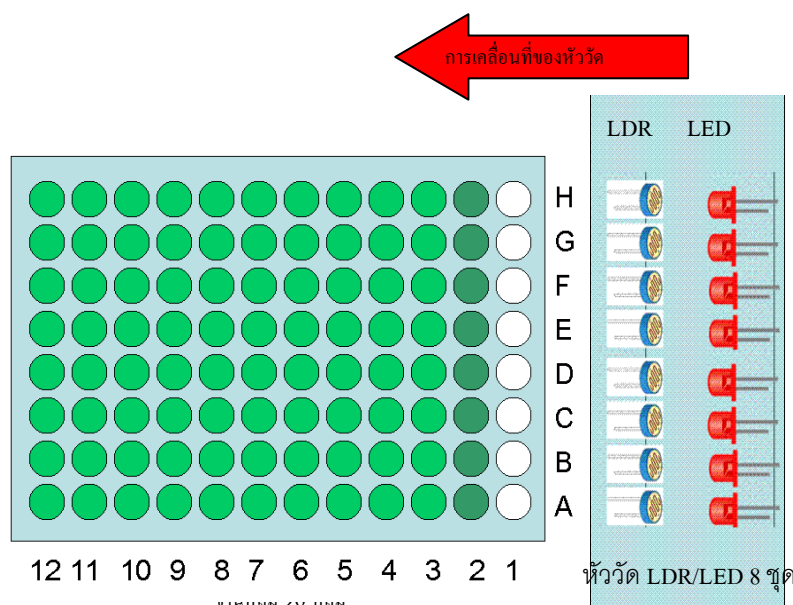
- อุปกรณ์ต้นแบบ Multi-optical sensor สำหรับประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนที่ 1 สร้างระบบตรวจวัดแบบ 8 หัววัด

ใช้ Light dependent resister (LDR) หรือเรียกว่าตัวต้านทานไวแสงซึ่งความต้านทานจะเปลี่ยนไปเมื่อมีความเข้มแสงตกกระทบ ดังนั้นจึงนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์รับแสงเนื่องจากมีราคาถูกและช่วงวัดแสงเหมาะสมกับงานที่ศึกษาคือเหมาะสมกับช่วงคลื่นที่ตามองเห็น และใช้ Light emitting diode (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสงเนื่องจากมีช่วงแสงแบนด์แคบๆ และใช้ LED สีแดง เนื่องจากสารละลายที่ตรวจวัดมีสีเขียว ใช้หลักการดูดกลืนแสงสีแดงของสารละลาย Phenothiazine radical cation (PHTH^{•+}) ซึ่งใส่ในงานหลอด 96 หลุม สัญญาณที่อ่าน จะอ่านครั้งละแถวจาก 8 หัววัด ส่งข้อมูลผ่าน Analog input module เพื่อบันทึกสัญญาณและอ่านผลจากคอมพิวเตอร์

ส่วนที่ 2 สร้างระบบขับเคลื่อนหัววัด

หัววัดทั้ง 8 คู่ถูกยึดติดกับ PMMA (Polymethylmethacrylate) holder ที่กำหนดตำแหน่งสัมพันธ์กับระยะห่างของแต่ละหลุมใน 1 แถวซึ่งมี 8 หลุม หัววัดทั้ง 8 สามารถขับเคลื่อนตามแถวของงานหลอด การเคลื่อนที่ผ่านแต่ละแถวทำให้เกิดการตรวจวัดครั้งละ 8 หลุม การขับเคลื่อนสามารถบังคับโดยใช้ปุ่มกด ที่ละแถว และสามารถใส่โปรแกรม Visual Basic กำหนดการเคลื่อนที่ของหัววัดจำลองภาพการทำงาน เครื่องมือ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ภาพจำลองการทำงานเครื่อง multi-optical sensor สำหรับประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีใช้งาน

- 1) เปิดสวิตช์เครื่องจับเคลื่อนหัววัด เปิดคอมพิวเตอร์เลือกโปรแกรมโดยเปิด Folder “AO screener” จะมี 3 Software คือ
 - (1) AI Utility 3.4 คลิก 2 ครั้งเพื่อเปิด Software จากนั้นกด “Connect” เพื่อเชื่อมต่อสัญญาณระหว่างหัววัดกับ Interface
 - (2) ODO4 2.7 คลิก 2 ครั้งเพื่อเปิด Software จากนั้นป้อนคำสั่งการวัดสัญญาณ เช่น เลือก Module name หรือเป็น Method ที่เคยตั้งไว้ เลือก Module type “Ai210, DL2100”
 - (3) Wellplate คลิก 2 ครั้งเพื่อเปิด Software การจับเคลื่อนหัววัดโดยสามารถกำหนดการเคลื่อนที่ ลำดับของแถว และเวลาในการหยุดอ่าน
- 2) เตรียมสารละลาย PHTH^{*+} ดังนี้

ผสมสารละลาย Phenothiazine 7.5 mmol L⁻¹ กับสารละลาย Cerric ammonium nitrate 6.5 mmol L⁻¹ ในอัตราส่วน 1:1 ได้สารละลายสีเขียวของ PHTH^{*+}
- 3) ทำปฏิกิริยา Radical scavenging ของ PHTH^{*+} กับ สารที่ทดสอบ ในจานหลุม 96 หลุม โดยเปิดสารละลายที่ใช้ทดสอบ 150 μ L จากนั้นเปิด PHTH^{*+} 150 μ L (ใช้ Multi-pipette ที่มี 8 หัวใส่ที่ละแถว (8 หลุม) โดย
 - (1) แถว 1 เป็นแบล็ค น้ำเพื่อใช้ตั้งสัญญาณ เป็น “0”
 - (2) แถว 2 เป็นสารละลายควบคุมคือใส่น้ำ 150 μ L และ PHTH^{*+} 150 μ L
 - (3) แถว 3-12 ใส่สารละลายที่ใช้ทดสอบ เช่น Ascorbic acid หรือ สารสกัด 150 μ L และ PHTH^{*+} 150 μ L
- 4) ทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
 - (1) วางจานหลุมไว้ในถาด เริ่มกด “Start” เพื่อให้หัววัดเคลื่อนที่และทำการอ่านสัญญาณทีละแถว สัญญาณที่อ่านได้อยู่ในหน่วย mV เมื่อหัววัดอ่านสัญญาณสารในจานหลุมแถวที่ 1 ให้ตั้งเป็นค่า “0” หรือบันทึกสัญญาณไว้ห้กลับทุกค่า คอมพิวเตอร์จะบันทึกผลเป็น ตัวเลขใน Microsoft excel
 - (2) หาค่า IC₅₀ โดยวัดสารละลายสกัดหลายความเข้มข้น คำนวณค่า 50% Inhibitory concentration (IC₅₀) โดยคำนวณ % Radical scavenging (ร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ) โดยสมการที่ (1) จากนั้นพลอตกราฟระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ คำนวณสมการเส้นตรงและใช้สมการนี้หา ความเข้มข้นที่ 50% Radical scavenging

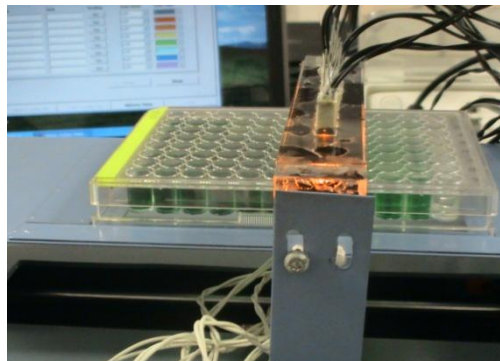
$$\% \text{ radical scavenging} = \left(1 - \frac{S_f}{S_0} \right) \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

โดยที่ S_f และ S_0 คือสัญญาณในหน่วย mV ของสารที่ใช้ทดสอบ (เช่น Ascorbic acid) และสารควบคุมตามลำดับ (สารควบคุมอยู่ในแถวที่ 2) พล็อตกราฟระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบเพื่อหาค่า IC₅₀ จากกราฟรูปเครื่องมือทั้งหมดดังรูปที่ 2 สามารถอ่าน



สัญญาณ 96 หลุมใน 180 วินาที

ก)



ข)

รูปที่ 2 (ก) เครื่องคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพร โดยอาศัยหัววัดแสงแปดหัวพร้อมกัน (ข)

Multi-optical sensor หัววัด LDR/LED 8 คู่ในบล็อก PMMA

ทดสอบการวัดสัญญาณของ multi-optical sensor ที่สร้างขึ้น

โดยทำการวัดสารละลายสีผสมอาหาร สีเขียว ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0.01-0.05 %v/v ให้ค่าความเป็นเส้นตรงโดยมีค่า R^2 0.96-0.99

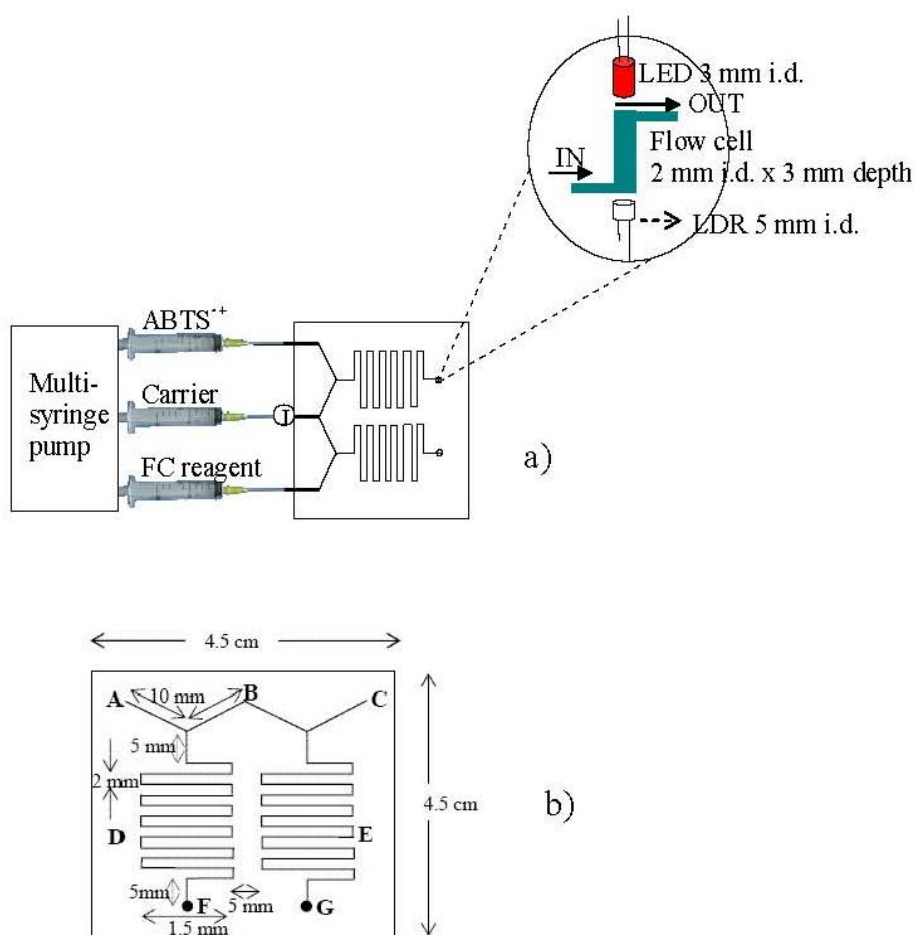
การทดสอบ Analytical Features

โดยใช้ PHTH²⁺ ทำปฏิกิริยากับ Ascorbic acid ทำการทดสอบความใช้ได้ของเครื่องโดยศึกษาพารามิเตอร์บางชนิดแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทดสอบความใช้ได้ของเครื่องโดยศึกษาพารามิเตอร์บางชนิด

Analytical features	Ascorbic acid
Linearity Range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2-10
Slope $\pm$ SD (8 หัววัด)	5.38 ± 0.66
Intercept $\pm$ SD (8 หัววัด)	5.48 ± 5.64
$R^2 \pm$ SD (8 หัววัด)	0.9957 ± 0.0022
%RSD (n=10) ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)	2.9-5.8
LOD (3 S/N)	0.5

งาน Microfluidic system สำหรับหาปริมาณ Phenolic ในสมุนไพร ออกแบบและสร้างระบบ Microfluidic ดังรูปที่ 3 เพื่อหาปริมาณสารกลุ่ม Phenolic และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยแผ่นชิพขนาด $4.5 \times 4.5 \times 0.3$ cm (กว้างxยาวxหนา) ทำจาก PMMA ยิงด้วยแสงเลเซอร์สร้างลวดลาย ของ Channel network ขนาดร่อง $300 \mu\text{m}$ (id.) $\times$ $50 \mu\text{m}$ (ลึก) ระบบป้อนสารด้วย Multi- syringe pump 3 หลอด และมีระบบตรวจวัดเป็น LDR และ LED 2 คู่ในตำแหน่ง F และ G โดยเจาะแผ่นชิพในตำแหน่ง F และ G ทะลุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ทำหน้าที่เป็น Flow cell ซึ่งมี Pathlength 3 mm ซึ่งตำแหน่ง A และ C ป้อนสารรีเอเจนต์คือ ABTS^{++} และ Folin Ciocalteu ส่วนตำแหน่ง B ป้อนตัวพาคือน้ำ โดยในท่อที่ส่งตัวพา จะมี Injection valve เพื่อฉีดสารสกัด ข) โพลีเมทริคเมทาอะซิเลท (PMMA) ยิงด้วยแสงเลเซอร์สร้างลวดลาย ของ channel network ขนาดร่อง $300 \mu\text{m}$ (id.) $\times$ $50 \mu\text{m}$ (ลึก)



รูปที่ 3 ก) ระบบ Microfluidic ข) ภาพขยายแผ่นชิพ

วิธีใช้งาน

ป้อนรีเอเจนต์โดยใช้ Syringe pump 3 หลอด สำหรับสาย A) ป้อน ABTS^{•+} (สารผสมระหว่าง 7 mmol/L ABTS and 2.45 mmol L⁻¹ Potassium persulfate ในอัตราส่วน 1:1 ที่ทิ้งไว้ 1 คืนก่อนใช้งาน) และ ตำแหน่ง B) สำหรับป้อนน้ำกลั่น และมี Injection valve ซึ่งมี Loop กำหนดปริมาตร 10 µL สำหรับฉีดสารทดสอบ ขณะที่ตำแหน่ง C) ป้อนสารผสม (FC) ระหว่าง Folin Ciocalteu reagent และ Na₂CO₃ 7.5% (w/v) ในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งจะแบ่งเป็นสองส่วนไปทำปฏิกิริยากับ ABTS^{•+} ครึ่งหนึ่ง ส่วนอีกครึ่งหนึ่งไปทำปฏิกิริยากับ FC และไหลไปยัง Flow cell ตำแหน่ง F และ G ตามลำดับและบันทึกสัญญาณเป็น ความสูงของพีคหน่วย mV

การศึกษา Analytical parameters

จากการใช้ระบบไมโครฟลูอิดิกตามที่ออกแบบศึกษาความเป็นเส้นตรงความเที่ยงของการวัดซ้ำ 10 ครั้ง การหาขีดจำกัดของการวัด (LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ) ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การศึกษา Analytical parameters

Analytical parameters	Gallic acid	Trolox
Linearity		
- concentration range	2-20 mg L ⁻¹	10-60 µmol L ⁻¹
- slope	5.4332 mV L mg ⁻¹	0.3914 mV L µmol ⁻¹
- intercept	4.5244	2.1333
R ²	0.9922	0.9900
%RSD (n=10)	3.5	4.0
LOD (3 S/N)	0.04 mg L ⁻¹	2.5 µmol L ⁻¹
LOQ (10 S/N)	2.9 mg L ⁻¹	8 µmol L ⁻¹
Sample throughput (h ⁻¹)	20	20

ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในชาสมุนไพร

เตรียมชาสมุนไพรโดยใช้ชาสำเร็จรูปที่จำหน่ายเป็นถุง ซึ่งผงชาเทียบเท่ากับน้ำหนักเฉลี่ยชา 1 ถุง (เฉลี่ยจาก 20 ถุง) แช่ในน้ำร้อน (100 °C) 50 mL เป็นเวลา 15 นาที กรองและเจือจางให้เหมาะสม ก่อนฉีดเข้าระบบ คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูป µmol Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ต่อกรัมของชาสมุนไพร และหาปริมาณฟีนอลิกโดยเทียบกับ Gallic acid (Gallic acid equivalent, GAE) ในหน่วย mg gallic acid ต่อกรัมตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ชาสมุนไพร 9 ชนิดแสดงในตารางที่ 5 พบว่า น้ำชาหญ้าหนวดแมวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด และถ้าหาความสัมพันธ์ของปริมาณ GAE และ TEAC ของชาทั้ง 9 ชนิดพบว่ามีความสัมพันธ์มีแนวโน้มเป็นเส้นตรงด้วยค่า $R^2 = 0.9017$

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์น้ำชาสมุนไพรเพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับ Trolox และปริมาณ รวมของสารกลุ่มฟีนอลิกคำนวณเปรียบเทียบกับ Gallic acid

ชาสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	น้ำหนักผงชา เฉลี่ยใน 1 ของ (n=20)	mg GAE* g ⁻¹ (n=5)	TEAC** μmol g ⁻¹ (n=5)
ชามะระขี้นก	Momordica charantia Linn.	0.7445	1.971±0.025	17.63±1.12
ชามะรุม	Moringa oleifera Lam.	2.2366	0.457±0.027	3.07±0.15
ชาหญ้าหนวดแมว	Orthosiphon aristatus Miq.	1.4691	10.09±0.403	38.29±2.81
ชารางจืด	Thunbergia Laurifolia Linn.	1.2989	1.416±0.038	2.79±0.20
ชาเห็ดหลินจือ	Ganoderma lucidum Karst.	0.9048	0.353±0.033	4.01±0.23
ชาหญ้าปักกิ่ง	Murdannia loriformis (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy	1.2628	1.076±0.078	9.65±0.55
ชาตะไคร้	Cymbopogon citratus Stapf.	0.809	7.243±0.351	25.49±1.52
ชาใบหม่อน	Morus alba Linn.	1.0523	3.616±0.202	12.77±0.79
ชาดอกคำฝอย	Carthamus tinctorius Linn.	0.7463	7.342±0.438	34.36±1.88

*GAE คือ gallic acid equivalent ในหน่วย mg ต่อกรัมผงชา

**TEAC คือ Trolox equivalent antioxidant capacity ในหน่วย μmol ต่อกรัมผงชา

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 1

1.2. เครื่องมือการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าแบบอัตโนมัติสำหรับการอ่านผลแบบขนานและการวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากพืช

1.2.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

ใช้แท่งคาร์บอนเป็นอิเล็กโทรดทำงานสำหรับการหาสารต้านอนุมูลอิสระ ในชาสมุนไพร เช่น ชา มะรุม ชากุหลาบ พืชสมุนไพร เช่น ผักตบชวา ผักแว่น ผักชีเหล็ก และผลไม้ เช่น ฝรั่ง มะละกอ แก้วมังกร ซึ่งใช้สารอนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช เป็นตัวตรวจสอบ และรายงานค่าความจุสารต้านอนุมูลอิสระ ในหน่วยของ Trolox Equivalent โดยบรรจุสารละลายดีพีพีเอชลงใน ไมโครไตเตอร์เพลทขนาด 24 หลุม (หลุมละประมาณ 2.5 mL) โดยที่แต่ละหลุมใช้เวลาในการวัดแอมเพโรเมตรี 2 นาที ดังนั้น ใน 1 เพลท (24 หลุม) ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เนื่องจากต้องเพิ่มขึ้นขั้นตอนในการล้าง และทำความสะอาดพื้นผิวของอิเล็กโทรด

- วิธีการวิเคราะห์

1. บรรจุสารมาตรฐาน หรือตัวอย่าง ที่ต้องการวิเคราะห์ลงใน ไมโครไตเตอร์เพลทขนาด 24 หลุม

เพื่อนำไปวัดแอมเพโรเมตรีที่เครื่องโรโบติกเคมีไฟฟ้าขั้นตอนการใช้เครื่องโรโบติกเคมีไฟฟ้า นั้นเป็นการเขียนโปรแกรมการเคลื่อนที่ของภาชนะบรรจุสารตัวอย่าง (ไมโครไตเตอร์เพลท) ในแนวแกน x, y การเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรดสามชิ้น ในแกน z ควบคู่กับการเขียนโปรแกรมสั่งการการวัดสารโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าของเครื่อง Potensiostat เช่นเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี หรือ แอมแปโรเมตรี ตารางด้านล่างแสดงการเปรียบเทียบค่าความจุสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity) ของ ชาสมุนไพรไทย

รูป	ชาสมุนไพรไทย	mmole Trolox /1g ชา
	ชามะรุม	0.0379±0.00342
	ชากุหลาบ	0.0964±0.0035
	ชามะระขี้นก	0.1696±0.031

ตารางแสดงค่าความจุสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity) ในชาสมุนไพรไทย

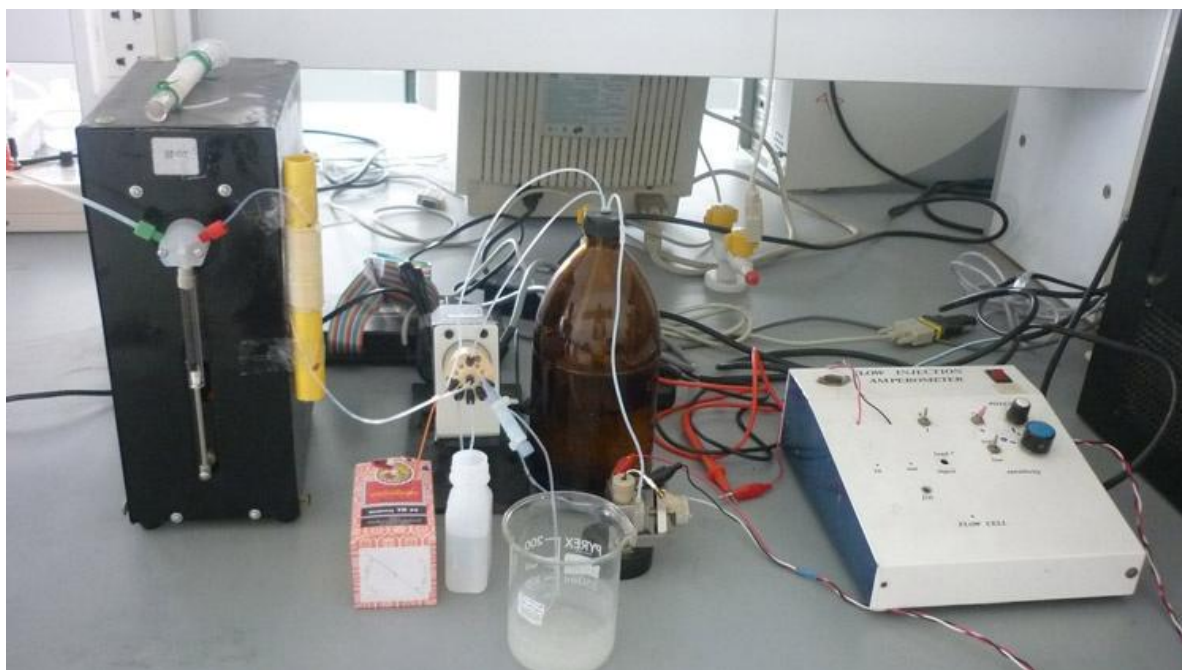
หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 2

1.3. การพัฒนาระบบวิเคราะห์อัตโนมัติสำหรับตรวจคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว

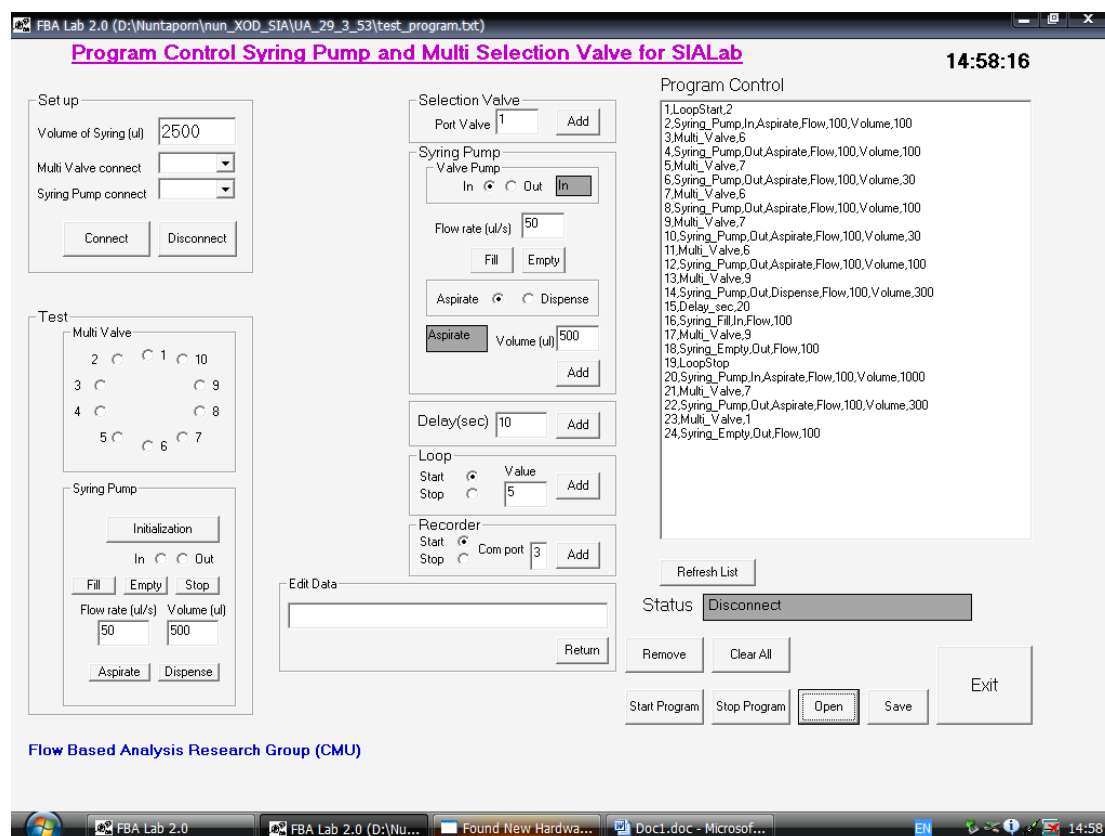
1.3.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

- การพัฒนาระบบซีเควนเชียลอะนาไลซิสที่การตรวจคัดกรองสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase โดยตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมแปโรเมตรี (ระบบ SI-XOD-Amp)

ได้พัฒนาต้นแบบเครื่องมือสำหรับระบบซีเควนเชียลอะนาไลซิส ทั้งในส่วนของฮาร์ดแวร์และซอฟต์แวร์เพื่อประกอบขึ้นเป็นระบบ SI-XOD-Amp ดังรูปที่ 4-5 ซึ่งประกอบด้วย syringe pump, multiposition selection valve, เครื่องแอมแปโรมิเตอร์สำหรับตรวจวัด และอุปกรณ์แปลงสัญญาณเพื่อบันทึกข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ อุปกรณ์ต่างๆ ของระบบจะถูกควบคุมด้วยซอฟต์แวร์ที่พัฒนาขึ้นเอง โดยการสร้างโปรแกรมที่กำหนดลำดับขั้นตอนการทำงานต่างๆ (script program) ขึ้นมาควบคุมการทำงานตามเวลาที่กำหนด ดังแสดงในรูปที่ 4

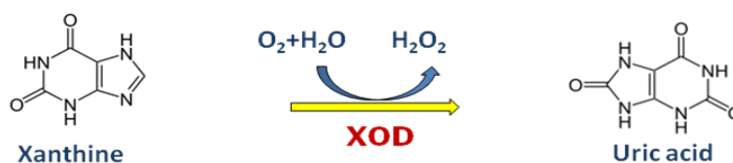


รูปที่ 4 ระบบซีเควนเชียลอะนาไลซิสที่มีการตรวจวัดแบบแอมแปโรเมตรี (SI-XOD-Amp)

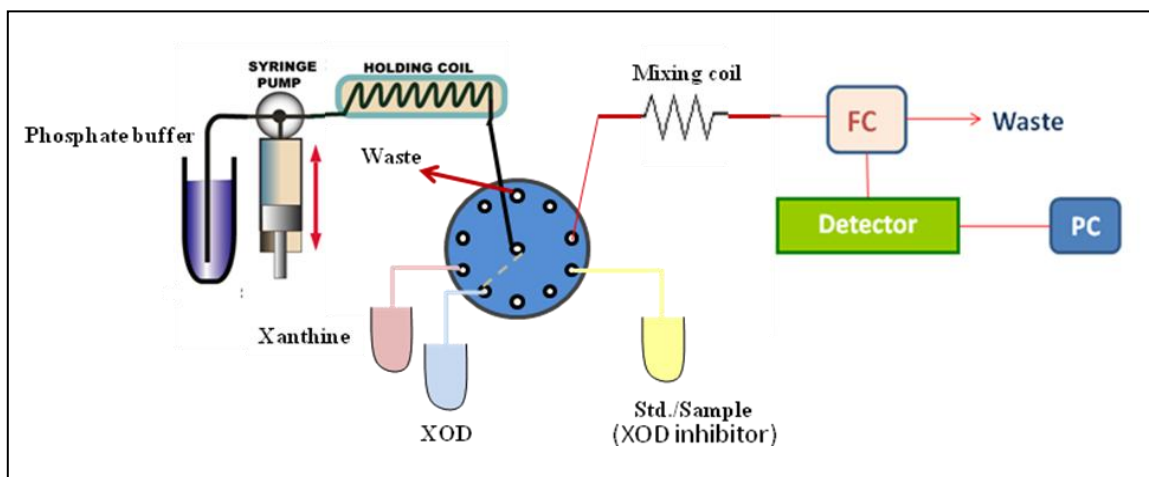


รูปที่ 5 ซอฟแวร์ที่พัฒนาขึ้น

การตรวจคัดกรองสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ XOD โดยระบบที่พัฒนาขึ้นนี้อาศัยหลักการยับยั้งเอนไซม์ XOD ดังปฏิกิริยาข้างล่างนี้



โดยใช้ xanthine เป็นซับสเตรตของเอนไซม์จะเกิดกรดยูริกขึ้น ซึ่งหากมีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ XOD จะทำให้เกิดกรดยูริกน้อยลง กรดยูริกที่เกิดขึ้นนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยเทคนิคแอมแปโรเมตรี โดยเกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีที่ขั้วแกสซีคาร์บอนและวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ไดอะแกรมแสดงการทำงานของระบบ SI-XOD-Amp แสดงดังรูปที่ 6 โดยขั้นตอนการวิเคราะห์โดยระบบนี้จะเป็นลำดับดังนี้



รูปที่ 6 ระบบ SI-XOD-Amp สำหรับการวิเคราะห์ xanthine oxidase-inhibiting activity. FC: flow-through cell, Detector: home made amperometer (Working electrode : glassy carbon, Reference electrode : Ag/AgCl, Auxiliary electrode : stainless steel), PC : personal computer with recording unit (PowerChrom280, eDAQ, Australia).

1. Syringe pump จะดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และผลึกเข้าสู่ flow cell ของเครื่อง amperometer พร้อมกับทำการวัดสัญญาณพื้นฐาน
2. ทำการดูดสาร xanthine, XOD และสารมาตรฐาน XOD inhibitor หรือสารตัวอย่าง เข้ามาใน holding coil ตามลำดับ
3. ทำการดูด-ผลึกสารให้ผสมกันใน mixing coil และทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่งจะเกิดกรดยูริกขึ้น
4. ผลึกสารที่เกิดปฏิกิริยาแล้วไปยังเครื่องตรวจวัดเพื่อวัดสัญญาณซึ่งแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นกรดยูริกหรือแปรผกผันกับปริมาณ XOD inhibitor
5. จากความสูงพีคที่เกิดขึ้นสามารถสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ allopurinol เป็นสารมาตรฐาน เพื่อใช้หาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง XOD ในเทอมของ allopurinol equivalent ได้

ซึ่งขั้นตอนต่างๆ นี้จะถูกควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์อย่างอัตโนมัติผ่านโปรแกรมที่พัฒนาขึ้น ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการนี้โดยทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ปริมาตรของสารละลาย xanthine, XOD, XOD inhibitor (หรือใช้ DI water แทนกรณีไม่มี XOD inhibitor) เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา และลำดับของการดูดสารละลายต่างๆ ผลสรุปของการศึกษาได้สภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สภาวะที่เหมาะสมและลักษณะเฉพาะของระบบ SI-XOD-Amp

Parameter	Optimum condition
xanthine concentration/volume	0.25 mM / 100 μ L
xanthine oxidase (XOD) concentration/volume	0.2 U mL ⁻¹ / 50 μ L
allopurinol volume	10 μ L
Time of enzymatic reaction	40 s
Mixing coil length	50 cm
Flow rate	100 μ L sec ⁻¹
Applied potential	0.5 V vs. Ag/AgCl
Sensitivity/gain of amperometer	High/gain# 2
Linear range	0.1-1.0 mM, R ² =0.982
Precision	0.9% (0, n=7) and 1.5% (0.2, n=7)
Sample throughput	30 injections h ⁻¹

ภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถสร้างกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1-1.0 mM allopurinol โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์ 0.2 mM allopurinol จำนวน 7 ซ้ำเท่ากับ 1.5% มีอัตราการวิเคราะห์ 30 ตัวอย่างต่อชั่วโมงและใช้ปริมาณสารเคมีน้อยมาก (ในระดับไมโครลิตร ดังตารางที่ 6) ระบบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถประยุกต์ในการหาปริมาณ allopurinol ในตัวอย่างยา ดังตารางที่ 7 อย่างไรก็ตามระบบ SI-XOD-Amp นี้ยังมีข้อจำกัดในการใช้วิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดจากพืช เนื่องจากมีการรบกวนการวิเคราะห์จากองค์ประกอบอื่นๆ ในตัวอย่างจึงได้พัฒนาใช้ระบบตรวจวัดแบบคลื่นเลเซอร์ขึ้นอีกระบบหนึ่งดังหัวข้อถัดไป

ตารางที่ 7 ปริมาณ allopurinol ในตัวอย่างยารักษาโรคเกาส์ วิเคราะห์หาปริมาณด้วยระบบ SI-XOD-Amp

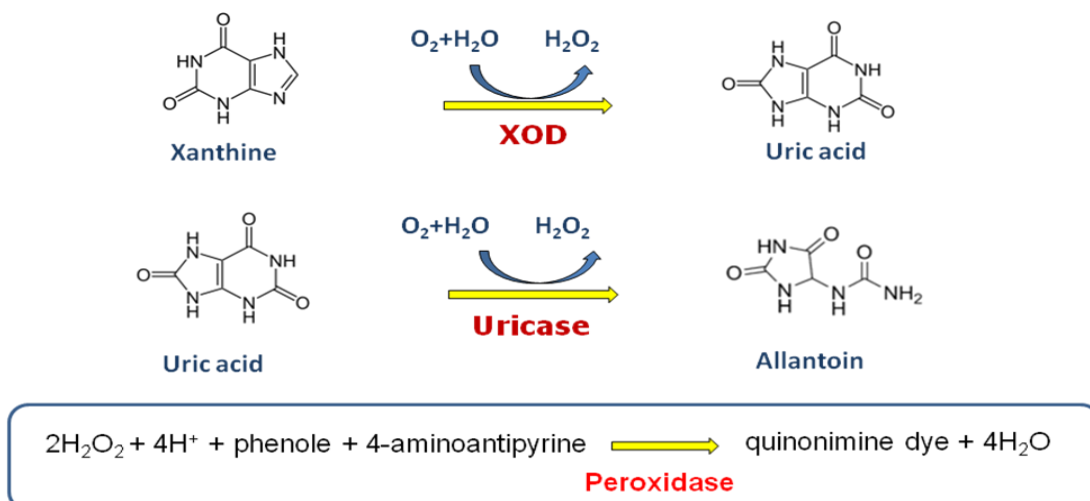
Sample No.	Allopurinol content		% difference
	Propose method (mg/tablet)	Reference method (mg/tablet)	
1	331 ± 15	287 ± 1	16
2	300 ± 12	299 ± 1	0
3	321 ± 5	376 ± 3	-15
4	287 ± 11	327 ± 1	-12
5	331 ± 7	326 ± 1	1
6	103 ± 3	98 ± 1	5
7	103 ± 3	115 ± 1	-10
8	108 ± 1	103 ± 1	5
9	108 ± 2	92 ± 1	17
10	338 ± 13	359 ± 1	-6
11	102 ± 4	97 ± 1	5

- วิธีใช้งานเครื่องมือที่พัฒนาขึ้น

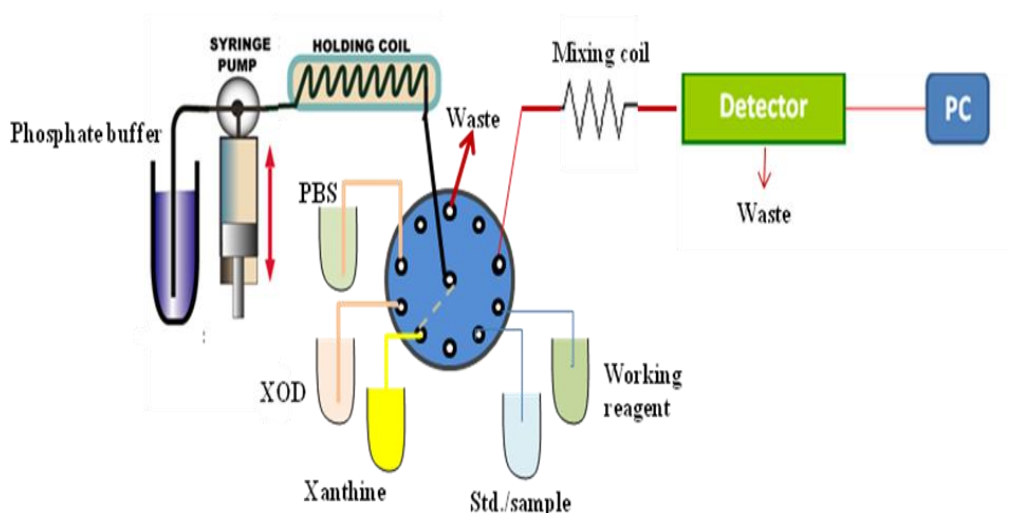
- เตรียมสารเคมีที่เกี่ยวข้องดังนี้ (วิธีเตรียมสารเคมีดูภาคผนวก)
 - สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM
 - สารละลาย XOD 0.2 U mL⁻¹
 - สารละลาย xanthine 0.25 mM
 - สารละลายมาตรฐานของ allopurinol ในช่วง 0-1.0 mM
- เปิดสวิทช์เครื่องมือและเปิดโปรแกรมควบคุมดังรูปที่ 2 และเรียกใช้โปรแกรมลำดับขั้นตอนตามที่ได้ศึกษาไว้
- สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐาน allopurinol
- วิเคราะห์สารตัวอย่าง โดยทำการทดลองที่สภาวะเดียวกันกับการวิเคราะห์สารมาตรฐาน
- คำนวณหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง XOD ในตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

- ระบบซีเควนเชียลอะนาไลซิสที่การตรวจคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase โดยตรวจวัดด้วยเทคนิคแคลอริเมตรี (ระบบ SI-XOD-Col)

ส่วนประกอบของระบบ SI-XOD-Col ส่วนใหญ่เหมือนกับ SI-XOD-Amp ยกเว้นการตรวจวัดจะใช้แคลอริมิเตอร์ที่สร้างขึ้นเอง และมีการเปลี่ยนแปลงขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาโดยปรับเปลี่ยนในซอฟต์แวร์ในส่วนของโปรแกรมลำดับขั้นตอนในการทำงาน การตรวจวัดอาศัยหลักการดังข้างล่างนี้



ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้น ซึ่งจะตรวจวัดโดยทำการฟอร์มสี quinonimine และตรวจวัดด้วยแคลอริมิเตอร์ ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะแปรผกผันกับปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ XOD โดยใช้ระบบดังรูปที่ 7 ได้ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการใช้งานระบบสรุปได้ดังตารางที่ 8



รูปที่ 7 ระบบ SI-XOD-Col สำหรับการวิเคราะห์ xanthine oxidase-inhibiting activity. Detector: home made colorimeter, PC : personal computer with recording unit (PowerChrom280, eDAQ, Australia).

ตารางที่ 8 สภาวะที่เหมาะสมและลักษณะเฉพาะของระบบ SI-XOD-Col

Parameter	Optimum condition
Concentration/volume of xanthine	0.25 mM/ 60 μ L
Xanthine oxidase concentration/volume	0.2 U mL ⁻¹ / 50 μ L
Sample volume	10 μ L
Working reagent	7.5 mM Chlorophenol, 3 mM Aminoantipyrine, 0.3 U mL ⁻¹ Uricase, 1 U mL ⁻¹ Peroxidase, 50 mM phosphate buffer
Volume of working reagent	100 μ L
Concentration of phosphate buffer solution	50 mM, pH 8.0
Time of enzymatic reactions	40 and 20 s
Mixing coil	100 cm
Flow rate	100 μ L sec ⁻¹
Detector	LED-LDR colorimeter (green light)
Linear range	0.05-1.0 mM, R ² =0.997
Precision	3.37% (0.2 mM, n=7), 5.48% (0.8 mM, n=7)
Sample throughput	16 injections h ⁻¹

ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยระบบนี้จะเป็นลำดับดังนี้

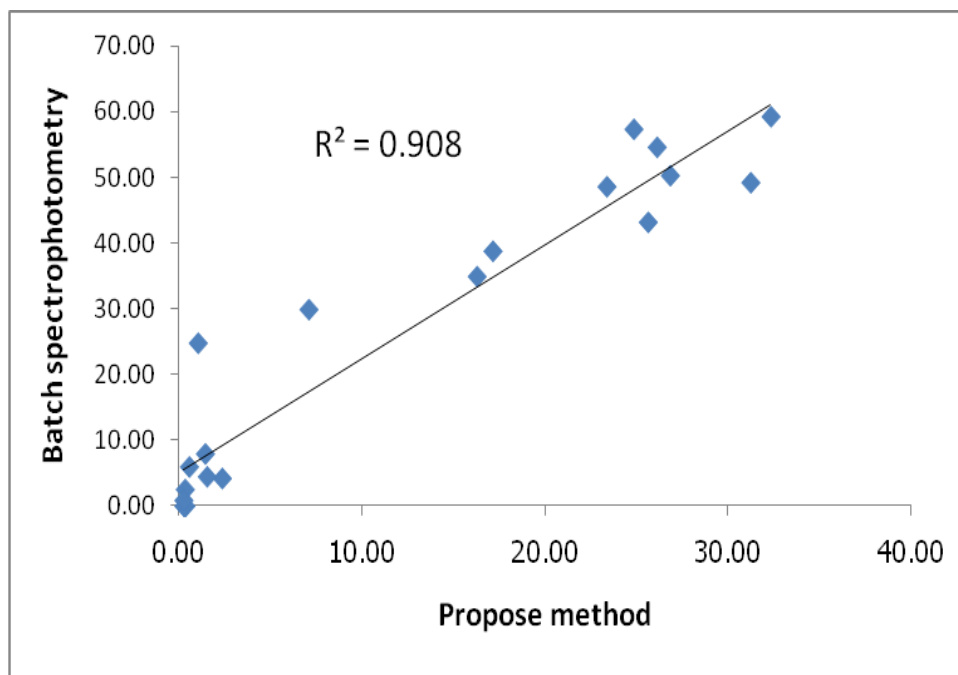
1. Syringe pump จะดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และผลักเข้าสู่ flow cell ของเครื่อง amperometer พร้อมกับทำการวัดสัญญาณพื้นฐาน
2. ทำการดูดสาร xanthine, XOD และสารมาตรฐาน XOD inhibitor หรือสารตัวอย่าง เข้ามาใน holding coil ตามลำดับ
3. ทำการดูด-ผลักสารให้ผสมกันใน holding coil และทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา (40 วินาที) ซึ่งจะเกิดการดูดยวกริขึ้น
4. ดูดสารละลาย working reagent เข้ามาใน holding coil เพื่อทำการผสมกับสารละลายในตอนแรกและทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา (20 วินาที) จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดง
5. ผลักสารที่เกิดปฏิกิริยาแล้วไปยังเครื่องตรวจวัดเพื่อวัดสัญญาณซึ่งแปรผกผันกับปริมาณ XOD inhibitor
6. จากความสูงพีคที่เกิดขึ้นสามารถสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ allopurinol เป็นสารมาตรฐาน เพื่อใช้หาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง XOD ในเทอมของ allopurinol equivalent ได้

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถสร้างกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.05-1.0 mM allopurinol โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์ 0.2 mM allopurinol จำนวน 7 ซ้ำเท่ากับ 3.4% มีอัตราการวิเคราะห์ 16 ตัวอย่างต่อชั่วโมงและใช้ปริมาณสารเคมีน้อยมาก (ดังตารางที่ 5) โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างชาดังตารางที่ 9 โดยให้ผลสอดคล้องกับวิธีแบบแบทช์ซึ่งมีความยุ่งยากและใช้ปริมาณสารเคมีมากกว่า (รูปที่ 8)

ตารางที่ 9 ปริมาณ XOD-inhibitor ในตัวอย่างชาบางชนิด

Sample	Description of sample	XOD-inhibitor activity	
		Proposed method (mg g ⁻¹)*	Batch method (%Inhibition) g ⁻¹
1	Mulberry (Herbal House 2 Thailand)	2.36 ± 0.13	4.22 ± 0.52
2	Chinese Tea No.1 (Big C Thailand)	25.61 ± 0.03	43.12 ± 0.87
3	Jasmine Tea (Three Houses Tea Thailand)	32.32 ± 0.75	59.16 ± 0.69
4	Chinese Tea No. 1 (Three Houses Tea Thailand)	16.27 ± 0.68	34.87 ± 2.08
5	Chinese Tea No. 3 (Three Houses Tea Thailand)	26.10 ± 4.83	54.50 ± 1.91
6	Oolong Tea (Sum Siew Tea leaf Thailand)	31.22 ± 2.47	49.14 ± 0.35
7	Sumsiew Hom Tea No.1 (Sum Siew Tea leaf Thailand)	26.82 ± 1.46	50.21 ± 0.17
8	Jasmine Tea No.1(Sum Siew Tea leaf Thailand)	24.83 ± 0.60	57.25 ± 2.78
9	Green Calabash Tea leaf (Sum Siew Tea leaf Thailand)	23.36 ± 1.24	48.52 ± 1.22
10	Poy Sien Tea leaf (Sum Siew Tea leaf Thailand)	7.09 ± 0.28	29.85 ± 0.52
11	Mulberry green tea, (RENONG TEA)	0.27 ± 0.05	N.D.
12	Ginkgo Leaves Tea (Dr.Green)	1.54 ± 0.25	4.46 ± 1.87
13	Thai traditional tea herb	17.14 ± 0.29	38.73 ± 2.48
14	Roselle Tea (Chao Phya Abhalbhubejhr)	1.44 ± 0.02	7.94 ± 1.86
15	Safflower – Garcinia Tea (Thanyaporn herb)	0.57 ± 0.02	5.96 ± 0.00
16	Jiaogulan (Mei-Fong Tea, Chiang Rai)	1.04 ± 0.04	24.75 ± 0.62
17	Moringa Tea with peppermint (Pumedin natural product, Chiang Mai)	0.37 ± 0.02	N.D.
18	Safflower tea (Herb Basic, Chiang Mai)	0.34 ± 0.01	2.50 ± 2.47
19	Jiaogulan (Herb Basic, Chiang Mai)	0.29 ± 0.01	N.D.
20	Mulberry green tea (Herb Basic, Chiang Mai)	0.26 ± 0.02	0.88 ± 1.24

*as allopurinol equivalent



รูปที่ 8 Correlation between the XOD-inhibitory activity and the total XOD inhibitor content expressed as allopurinol equivalents of tea samples

- วิธีใช้งานเครื่องมือที่พัฒนาขึ้น

ทำนองเดียวกับเครื่องมือ SI-XOD-Amp โดยทำการเตรียมสารละลายที่เกี่ยวข้องดังนี้

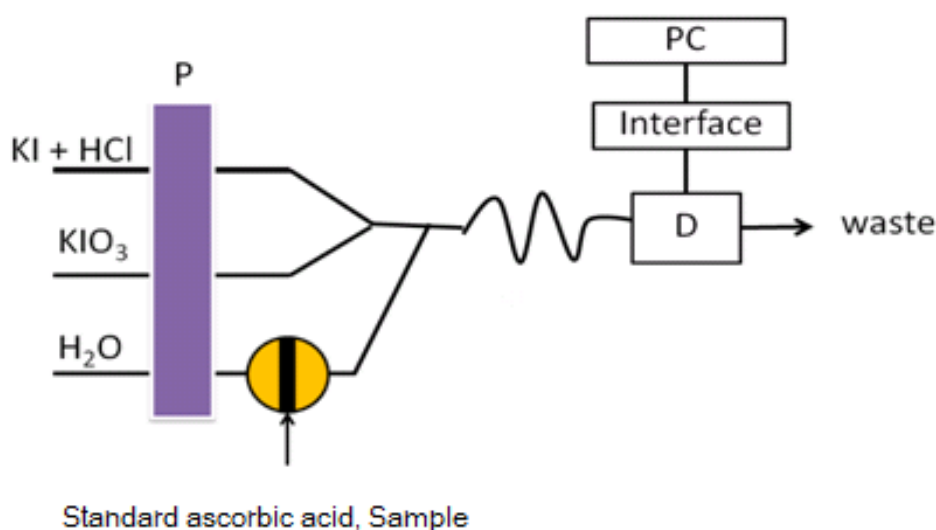
- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM
- สารละลาย XOD 0.2 U mL^{-1}
- สารละลาย xanthine 0.25 mM
- สารละลายมาตรฐานของ allopurinol ในช่วง 0-1.0 mM
- สารละลาย working reagent ที่ประกอบด้วย 7.5 mM Chlorophenol, 3 mM

Aminoantipyrine, 0.3 U mL^{-1} Uricase, 1 U mL^{-1} Peroxidase, 50 mM phosphate buffer

(วิธีการเตรียมสารละลายต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวกที่ 3)

- ระบบโฟลอินเจกชันอะนาไลซิสที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยากับไอโอดีน (FI-I-Amp)

หลักการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ อาศัยสมบัติการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ในการลดการเกิดไตรไอโอได์ (ไอโอดีน) จากปฏิกิริยารีดักชันของไอโอดेटที่มากเกินไปในสถานะที่เป็นกรดในระบบโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส ไตรไอโอได์ที่เหลือจะเกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีที่ขั้วไฟฟ้าทำงานที่ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม ระบบดังกล่าวแสดงดังรูปที่ 9 เมื่อฉีดสารตัวอย่างที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเข้าสู่ระบบจะไปลดการเกิดไตรไอโอได์ โดยสัญญาณการลดลงของไตรไอโอไคนั้น จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมนี้ คือ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid equivalent)



รูปที่ 9 ระบบ FI-I-Amp สำหรับตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ได้ทำการทดลองหาสถานะต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โดยระบบ FI-I-Amp ได้ผลสรุปดังตารางที่ 10

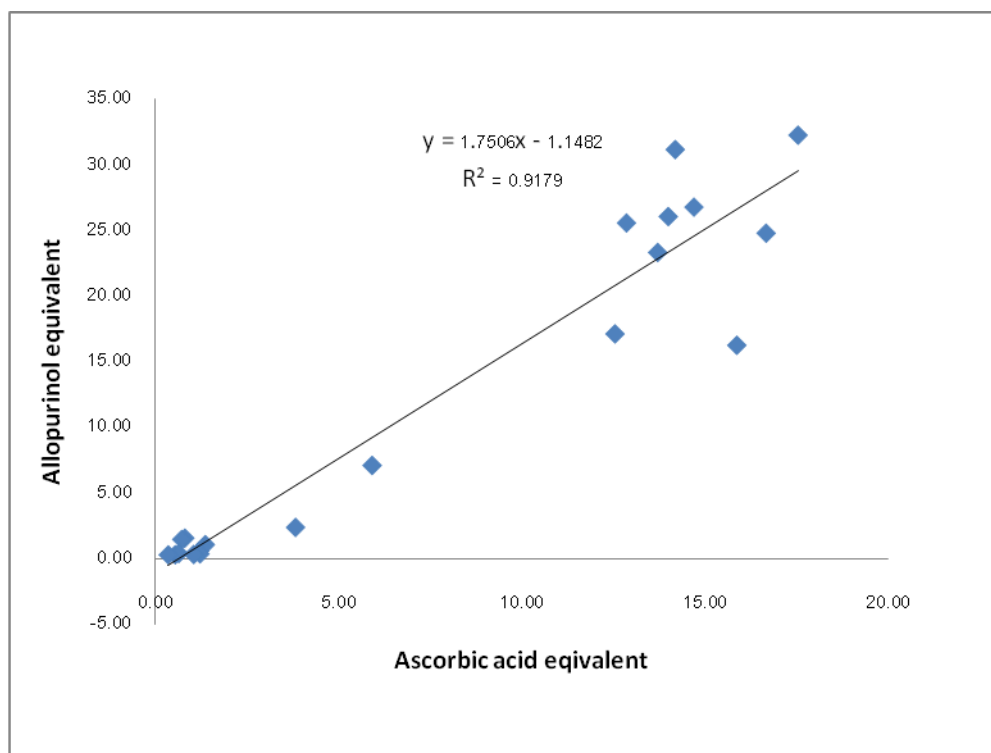
ตารางที่ 10 สภาวะที่เหมาะสมและลักษณะเฉพาะของระบบ FI-I-Amp

Parameter	Optimum condition
Working Electrode	Glassy Carbon
Reference Electrode	Ag/AgCl (KCl 3 M)
Auxiliary Electrode	Stainless steel
Concentration of KI	5 mM
Concentration of iodate	25 ppm
Concentration of HCl	0.2 M
Flow rate	4 ml min ⁻¹
Applied potential	200 mV
Sensitivity/gain of amperometer	High/gain# 1
Mixing coil length	50 cm
Sample loop	100 µL
Linear range	5-100 ppm ascorbic acid , $R^2=0.999$
Precision	1.09% (8ppm, n=9), 0.9% (20 ppm, n=11)
Sample throughput	75 injections h ⁻¹

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถสร้างกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 5-100 ppm ascorbic acid โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์ 20 ppm ascorbic acid จำนวน 11 ซ้ำ เท่ากับ 0.9 % มีอัตราการวิเคราะห์ 75 ตัวอย่างต่อชั่วโมง การทำงานของระบบจะมีวาล์วนิรภัยอย่างอัตโนมัติโดยจะทำการพัฒนาเพิ่มเติมให้มีระบบเปลี่ยนตัวอย่างอย่างอัตโนมัติซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์ทำได้สะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น 10 ผลที่ได้จาก 2 วิธีมีความสอดคล้องกัน (รูปที่ 10) อย่างไรก็ตามยังต้องทดลองกับตัวอย่างจำนวนมากขึ้นซึ่งกำลังดำเนินการต่อไป

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

Sample	Description of sample	Antioxidant activity determined by method	
		SI-XOD-Col (mg/g as allopurinol)	FI-I-Amp (mg/g ascorbic acid)
1	Mulberry (Herbal House 2 Thailand)	2.36 ± 0.13	3.8 ± 0.1
2	Chinese Tea No.1 (Big C Thailand)	25.61 ± 0.03	12.9 ± 0.1
3	Jasmine Tea (Three Houses Tea Thailand)	32.32 ± 0.75	17.5 ± 0.2
4	Chinese Tea No. 1 (Three Houses Tea Thailand)	16.27 ± 0.68	15.9 ± 0.2
5	Chinese Tea No. 3 (Three Houses Tea Thailand)	26.10 ± 4.83	14.0 ± 0.2
6	Oolong Tea (Sum Siew Tea leaf Thailand)	31.22 ± 2.47	14.2 ± 0.1
7	Sumsiew Hom Tea No.1 (Sum Siew Tea leaf Thailand)	26.82 ± 1.46	14.7 ± 0.3
8	Jasmine Tea No.1(Sum Siew Tea leaf Thailand)	24.83 ± 0.60	16.7 ± 0.2
9	Green Calabash Tea leaf (Sum Siew Tea leaf Thailand)	23.36 ± 1.24	13.7 ± 0.2
10	Poy Sien Tea leaf (Sum Siew Tea leaf Thailand)	7.09 ± 0.28	5.9 ± 0.1
11	Mulberry green tea, (RENONG TEA)	0.27 ± 0.05	0.56 ± 0.1
12	Ginkgo Leaves Tea (Dr.Green)	1.54 ± 0.25	0.8 ± 0.1
13	Thai traditional tea herb	17.14 ± 0.29	12.5 ± 0.1
14	Roselle Tea (Chao Phya Abhalbhubejhr)	1.44 ± 0.02	0.7 ± 0.1
15	Safflower – Garcinia Tea (Thanyaporn herb)	0.57 ± 0.02	1.2 ± 0.1
16	Jiaogulan (Mei-Fong Tea, Chiang Rai)	1.04 ± 0.04	1.4 ± 0.2
17	Moringa Tea with peppermint (Pumedin natural product, Chiang Mai)	0.37 ± 0.02	0.7 ± 0.1
18	Safflower tea (Herb Basic, Chiang Mai)	0.34 ± 0.01	1.2 ± 0.4
19	Jiaogulan (Herb Basic, Chiang Mai)	0.29 ± 0.01	1.0 ± 0.1
20	Mulberry green tea (Herb Basic, Chiang Mai)	0.26 ± 0.02	0.4 ± 0.1



รูปที่ 10 Correlation of total XOD inhibitor content expressed as allopurinol equivalent and total antioxidative activity as ascorbic acid equivalent of tea samples

- วิธีใช้งานเครื่องมือที่พัฒนาขึ้น

1. ทำการเตรียมสารละลายที่เกี่ยวข้องดังนี้
 - a. สารละลาย 25 ppm iodate in 0.2 M HCl
 - b. สารละลาย 5 mM KI in 0.2 M HCl
 - c. สารละลายมาตรฐานของ ascorbic acid ในช่วง 0-100 ppm
(วิธีการเตรียมสารละลายต่างๆ ดูในภาคผนวก)
2. เปิดสวิตช์เครื่องมือและเปิดโปรแกรมบันทึกสัญญาณและบันทึก baseline ของระบบขณะที่สารละลายกำลังไหลในระบบ
3. สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ โดยฉีดสารละลายใช้สารละลายมาตรฐาน
4. วิเคราะห์สารตัวอย่างโดยทำการทดลองที่สภาวะเดียวกันกับการวิเคราะห์สารมาตรฐาน
คำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 3

1.4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์ริกโดยใช้อุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

1.4.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

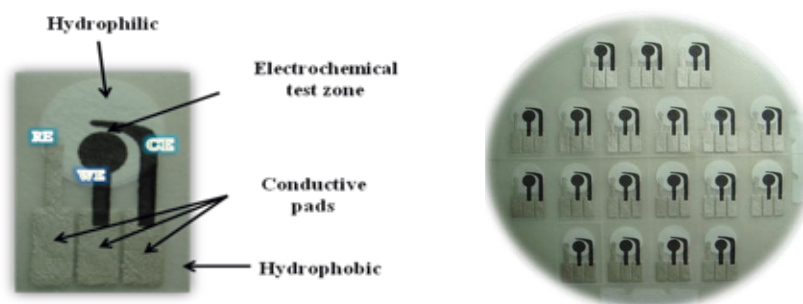
- อุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษ (LAB-ON-PAPER)

อุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษ คือการทำการทดลอง วิเคราะห์สารบนอุปกรณ์ตรวจวัดที่ทำจากกระดาษ ซึ่งกระดาษสามารถหาได้ทั่วไป ราคาไม่แพง มีน้ำหนักเบาเมื่อเทียบกับพื้นที่ผิว จึงง่ายต่อการเก็บและขนส่ง นอกจากนี้กระดาษมีหมู่ฟังก์ชันอินทรีย์ที่สามารถถูกดัดแปรได้ง่าย ของเหลวจะสามารถเคลื่อนที่บนกระดาษได้ด้วยแรงคาпилลารี ดังนั้นเมื่อถูกทำให้เปียกจะสามารถ ถ่ายเทของไหลได้โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์เสริมเพื่อปั๊มของไหลเข้าสู่อุปกรณ์ และกระดาษยังสามารถแยกชนิดของอนุภาคจาก ตัวอย่างซึ่งช่วยในการวิเคราะห์แยกได้อีกด้วย การออกแบบรูปแบบของช่องการไหล บนกระดาษทำได้ ด้วยการเคลือบพอลิเมอร์ที่ไม่ชอบน้ำบนพื้นผิวกระดาษ บริเวณที่ไม่ได้เคลือบพอลิเมอร์ จะเป็นช่องกระดาษที่ สารละลายสามารถซึมผ่านได้ ดังนั้นจึงเป็นตัวกำหนดทิศทาง และปริมาตรที่ต้องการเพื่อให้ของไหลไปถึง พื้นที่ตรวจวัดได้

การสร้างรูปแบบบนพื้นผิวกระดาษนั้นทำได้ด้วยกระบวนการโฟโตลิโธกราฟี (Photolithography) ซึ่งเป็นการถ่ายทอดลวดลายขนาดเล็กมาก โดยให้แสงส่องผ่าน Mask pattern ลงบน Substrate ที่เคลือบด้วยสารไวแสงที่เรียกว่า Photoresist สารไวแสงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ SU-8 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Negative photoresist คือ หลังจากฉายแสงลงบนบริเวณที่ถูกเคลือบด้วย SU-8 แล้วบริเวณส่วนที่ถูกฉายแสงนี้ จะแข็งขึ้นจนกระทั่งไม่สามารถละลายได้ด้วยสารละลาย แต่ส่วนอื่นๆที่ไม่ถูกฉายแสงนั้นจะละลายไปที่ เป็นเช่นนี้เนื่องจาก หลังจากฉายแสง SU-8 จะเกิดการ Crosslink ทำให้ส่วนดังกล่าวเกิดการแข็งตัวขึ้น

เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าอาศัยพื้นฐานของปฏิกิริยารีดอกซ์หรือออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้น โดยมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสปีชีส์หนึ่งไปยังอีกสปีชีส์หนึ่ง สามารถใช้ในการทำ ปริมาณวิเคราะห์ได้โดยวัดสมบัติทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์เคมีไฟฟ้า (Electrochemical cell) ซึ่งค่าทางไฟฟ้าที่วัด ได้นั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการ วิเคราะห์ เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าเป็นเทคนิคที่เหมาะสม ที่จะใช้กับอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และมีความไวในการตรวจวัดสูง เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าหลายเทคนิค สามารถประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์นี้ได้ เช่น เทคนิคแอมเพโรเมตริก เทคนิคโวลแทมเมตริก เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตริก เทคนิคแอมเพโรเมตริก เป็นต้น (โดยสามารถเลือกเทคนิคในการตรวจวัดที่เหมาะสมกับสารในแต่ละกลุ่ม) การสร้างขั้วไฟฟ้าบน

กระดาษนั้นใช้เทคโนโลยีการพิมพ์สกรีนซึ่งมีเทคนิคที่เหมาะสมกับการทดลองและมีคุณสมบัตินำไฟฟ้าจะถูกสกรีนลงบนวัสดุด้วยแรงกดผ่านแบบพิมพ์ให้เป็น รูปแบบที่ต้องการลงบนแผ่นวัสดุ จากนั้นนำไปอบด้วยความร้อน โดยการทดลองนี้มีอีกที่นำไฟฟ้าจะถูก สกรีนลงบนแผ่นกระดาษที่สร้างรูปแบบการไหล ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 อุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษ และขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน

งานวิจัยนี้จึงได้นำเอาข้อดีของเทคนิคทางเคมีไฟฟ้ามาใช้ร่วมกับอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษ เพื่อให้ สามารถตรวจวัดปริมาณสาร ได้อย่างแม่นยำ ใช้งานง่าย มีความรวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ วัดปริมาณกรดเฟอรูลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้สำหรับการต้านการชราของเซลล์ ป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง และโรคหัวใจ เป็นต้น โดยจะได้นำอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษนี้ ไปใช้ในการวิเคราะห์หา ปริมาณกรดเฟอรูลิกในตัวอย่าง ข้าว และข้าวโพด เนื่องจากการได้มีการศึกษาแล้วว่าในข้าว และข้าวโพดจะมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายชนิด และที่สำคัญคือ กรดเฟอรูลิกซึ่งเป็นสารสำคัญที่ช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมีประสิทธิภาพ

- สภาวะที่เหมาะสม

ในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆในการทดลอง ได้แก่ ค่า pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ คือ อะซิเตตบัฟเฟอร์, scan rate, amplitude และ step potential โดยสภาวะที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้เป็น ดังตาราง

ตารางแสดงสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระ

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
อะซิเตตบัฟเฟอร์	pH 5
Amplitude	50 mV s ⁻¹
Step potential	7 mV s ⁻¹

ทั้งนี้การนำเทคนิคทางเคมีไฟฟ้ามาใช้ร่วมกับอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษนี้ สามารถนำไปวิเคราะห์กรดเฟอร์ริกได้สูงถึง 30 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

- ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย แบ่งออกเป็น

- ออกแบบรูปแบบการไหลของของไหลและรูปแบบของขั้วไฟฟ้า

ทำการออกแบบรูปแบบการไหลและรูปแบบขั้วไฟฟ้าด้วยโปรแกรม adobe illustrator



Print รูปแบบที่ได้ลงบนแผ่นฟิล์มใสเพื่อนำไปเป็น mask

- สร้างอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

ทำรูปแบบช่องการไหลของของไหลบนกระดาษด้วยกระบวนการโฟโตลิโธกราฟี



ได้กระดาษที่ทำรูปแบบช่องการไหลเสร็จ



นำกระดาษที่ได้ไปสร้างขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคพิมพ์สกรีน



ได้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

- นำอุปกรณ์ที่พัฒนามาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์ริกด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์ริกด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

นำอุปกรณ์ตรวจวัดที่ได้ไปเชื่อมต่อกับเครื่อง Potentiostat



หยดสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริกความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 20 μ l ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัด



นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Cyclic voltammetry โดยทำการ scan ตั้งแต่ -0.2 – 0.8 V

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 4

โครงการย่อยที่ 2: ระบบวิเคราะห์อัตโนมัติแบบรู้ผลเร็วเพื่อเฝ้าระวังมลพิษทางสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัยทางอาหาร (High Throughput Analysis for Environmental Monitoring and Food Safety)

เนื่องในปัจจุบันนี้ประชากรส่วนใหญ่มีปัญหาด้านสุขภาพค่อนข้างมาก เนื่องจากปัญหาจากมลพิษจากสิ่งแวดล้อมและการบริโภคอาหารที่ไม่ได้คุณภาพ ที่อาจมีการปนเปื้อน ของสารพิษ สารปนเปื้อนที่สำคัญที่พบ ได้แก่ โลหะหนัก สารปรอท ยาปฏิชีวนะ และสารกันบูด เป็นต้น ซึ่งการปนเปื้อนอาจเกิดจากการลักลอบทิ้ง ของเสียสู่สิ่งแวดล้อม จากสิ่งแวดล้อมสู่ระบบนิเวศและห่วงโซ่อาหาร หรือเกิดจากแหล่งผลิตอาหาร กระบวนการผลิต วัตถุดิบ และการตกค้าง เป็นต้น ดังนั้นการเฝ้าระวังและติดตามการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อมและในอาหาร จึงมีความสำคัญต่อมนุษย์และผู้บริโภคและการรู้ผลการเฝ้าระวังอย่างรวดเร็ว จะเป็นประโยชน์ต่อการเตือนภัยในกรณีที่มีความผิดปกติเกิดขึ้นต่อชุมชนและผู้บริโภคตามลำดับ

งานวิเคราะห์ติดตามและเฝ้าระวังนั้นจำเป็นที่จะต้องเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ ที่ใช้นอกจากจะต้องให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำและเที่ยงเป็นที่น่าเชื่อถือ แล้วยังต้องสามารถให้ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว ราคาไม่แพง และใช้แรงงานน้อย ดังนั้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบรู้ผลเร็ว โดยการทำให้วิธีวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ได้อย่างต่อเนื่อง และเป็นอัตโนมัติจึงเข้ามามีบทบาทในงานวิเคราะห์ในลักษณะนี้

จากผลการวิจัยในปีที่ 1 คณะผู้วิจัยได้พัฒนาอุปกรณ์ต้นแบบและวิธีวิเคราะห์ที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้อย่างต่อเนื่องและอัตโนมัติควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้ระบบวิเคราะห์แบบไหล เช่น Flow injection analysis (FIA) และ Sequential injection analysis (SIA) ร่วมกับระบบแขนกลหรือ autosampler และใช้เทคนิคการตรวจวัดที่รวดเร็ว เช่น การตรวจวัดด้วยเคมีไฟฟ้า และการตรวจวัดด้วยแสง (Spectrophotometer)

ในปีที่ 2 ได้นำอุปกรณ์ต้นแบบมาต่อยอดพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์แบบรู้ผลเร็วสำหรับ ตรวจวัดโลหะหนักในอาหาร และมลพิษในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีทางโครมาโทกราฟีสำหรับวิเคราะห์และระบุชนิดของสารกลุ่มยาปฏิชีวนะและสารกันบูดที่ตกค้างในอาหารได้หลายชนิดพร้อมกัน

วิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ใช้ง่าย ราคาถูก ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความไว ช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ใช้ปริมาณสารเคมีและตัวอย่างน้อย เป็นทางเลือกในการนำไปใช้สำหรับการเฝ้าระวังการปนเปื้อนและการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารและสิ่งแวดล้อม

สารปนเปื้อนในอาหารและสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม สามารถถูกวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 12 และ 13

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์สารปนเปื้อนในอาหาร

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
สารประกอบอินทรีย์			
1. เบต้าแลคแทม	วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> อะมีนอซิซิลลิน - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.5-20 ไมโครกรัมต่อกรัม ที่ $R^2 > 0.995$ - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD, n=10) เท่ากับ 8.15 - ซีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม แอมพิซิลลิน - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.5-20 ไมโครกรัมต่อกรัม ที่ $R^2 > 0.995$ - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD, n=10) เท่ากับ 8.07 - ซีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม หมายเหตุ: ตัวอย่างจริง คือ เนื้อหมู และไก่ : รายละเอียดดังภาคผนวก 9	1) มีความจำเพาะสูง 2) ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย 3) ใช้ปริมาณรีเอเจนต์น้อย 4) ราคาถูกกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค LC-MS หรือ LC-MS/MS	-
2. สารกันบูด	ระบบซีเคิวนีเชิลอนเจกชันอะนาลิซิสร่วมกับเทคนิคอัลตราฟอรัแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีโดยใช้การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.1-50 ppm ที่ $R^2 = 0.9972-0.9977$ - วัดได้ 30 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง หมายเหตุ: รายละเอียดดังภาคผนวก 11	1) ความไวในการตรวจวัดสูง	-

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
3. สารปฏิชีวนะกลุ่มเพนิซิลิน	แคปซิลาริเอ็กโทพริซ และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> Ampicillin - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.002-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ $R^2 = 0.9993$ - ซีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 2 นาโนกรัมต่อลิตร - วัดได้ 30 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD, n=5) เท่ากับ 1.24-2.79 - เปอร์เซนต์การกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 81.95±3.58 Penicillin G - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.002-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ $R^2 = 0.9996$ - ซีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 2 นาโนกรัมต่อลิตร - วัดได้ 30 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD, n=5) เท่ากับ 0.89-2.76 - เปอร์เซนต์การกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 95.51±2.68 Oxacillin - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.002-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ $R^2 = 0.9994$ - ซีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 2 นาโนกรัมต่อลิตร - วัดได้ 30 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD, n=5) เท่ากับ 0.47-2.61 - เปอร์เซนต์การกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 95.35±3.43 Cloxacillin - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.003-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ $R^2 = 0.9993$ - ซีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 3 นาโนกรัมต่อลิตร - วัดได้ 30 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD, n=5) เท่ากับ 0.46-2.42 - เปอร์เซนต์การกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 95.50±3.66 หมายเหตุ: ตัวอย่างจริง คือ นํ้านมวัว : รายละเอียดดังภาคผนวก 10	1) สามารถใช้วิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิดได้พร้อมกันโดยมีความไวสูง 2) ตรวจวัดสารที่ระดับความเข้มข้นต่ำในน้ำ นมวัว ได้ 3) วิธีการเตรียมก่อนการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยากไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ 4) อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้หาได้ง่าย 5) ในกรณีที่ต้องการวิเคราะห์โดยไม่สกัดด้วย CPE จะทำได้โดยการนำตัวอย่างนํ้านมมากำจัด โปรตีนและ ไขมัน แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC ได้เลย	1) วิธีการวิเคราะห์ที่ไม่สกัดด้วย CPE จะมีข้อด้อยคือ จะตรวจวัด ได้ที่ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ สูง

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
สารประกอบอนินทรีย์			
1. ไอออนเหล็ก	ESSM ร่วมกับระบบวิเคราะห์แบบไหลที่ตรวจวัดด้วยวิธี Spectrophotometry <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 3-30 มิลลิกรัมต่อลิตร - ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร - วัดได้ 24 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD) เท่ากับ 2 - เปอร์เซนต์การกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 89-92 % หมายเหตุ: ตัวอย่างจริง คือ น้ำผลไม้ : รายละเอียดดังภาคผนวก 5	1) มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและ การวิเคราะห์ที่ง่าย 2) ใช้เวลาวิเคราะห์สั้น 3) มีราคาถูก 4) ใช้ปริมาณสารเคมีที่น้อย 5) สามารถนำไปใช้ร่วมกับเครื่องมือวิเคราะห์อื่นๆ ที่มีความไวสูงได้ เช่น Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS) หรือ Inductive Coupled Plasma Spectrometry (ICP)	-
2. ทองแดง	ระบบรับรู้ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโลหะเป็นพิษ <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง 0.1-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ $R^2 > 0.999$ - ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร - วัดได้ 30 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง หมายเหตุ: ตัวอย่างจริง คือ น้ำผลไม้ : รายละเอียดดังภาคผนวก 12	1) ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างกรณีของ สารตัวอย่างประเภทของเหลว 2) สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำๆ ได้ 3) อุปกรณ์มีขนาดเล็ก และใช้กำลังไฟน้อย	-

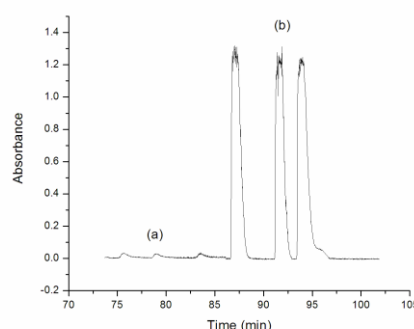
ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์สารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

สารที่ต้องการวิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
1. โปรอท	ESSM ร่วมกับระบบวิเคราะห์แบบไหลที่ตรวจวัดด้วยวิธี Spectrophotometry <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร - วัดได้ 12-20 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง หมายเหตุ: ตัวอย่างจริง คือ น้ำปัสสาวะ : รายละเอียดดังภาคผนวก 6	1) อุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนแบบท่อ กลวง (ESSM) นี้สามารถนำไปใช้ร่วมกับ เครื่องมือวิเคราะห์อื่นๆ ที่ให้ความไว ตามที่ต้องการ ได้ เช่น Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS) หรือ Inductive Coupled Plasma Spectrometry (ICP) เป็นต้น	1) ยังไม่สามารถตรวจวัดโปรอทได้ในระดับปริมาณ 0.02 mg L^{-1} ซึ่งเป็นระดับที่ต้องรายงานในน้ำปัสสาวะ ทั้งนี้ต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณ สารตัวอย่าง ในระบบและกระบวนการผสมที่ดีขึ้น 2) pH มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจาก การใช้กระแสไฟฟ้า ต้องนำสารละลาย บัพเฟอร์มาใช้ส่งผลต่อสัญญาณรบกวนของเครื่องตรวจวัด
2. ฟอสเฟตในแหล่งน้ำธรรมชาติ	ฟอสเฟตอะนาไลเซอร์ <u>ความสามารถในการตรวจวัด</u> - วัดความเข้มข้นในช่วง $0-800 \text{ } \mu\text{g P/L}$ - ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ $4.9 \text{ } \mu\text{g P/L}$ - วัดได้ 55 ตัวอย่างภายในหนึ่งชั่วโมง - ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD) เท่ากับ 3 - เปอร์เซนต์การกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 97.119 หมายเหตุ: ตัวอย่างจริง คือ คลองแสนแสบ : รายละเอียดดังภาคผนวก 7	1) ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างเพราะมีหัวกรอง ตัวอย่างแล้ว 2) กะทัดรัด ใช้พื้นที่น้อย ($30 \times 45 \times 45 \text{ cm}$)	

2.1. วิธีเตรียมตัวอย่างแบบออนไลน์ด้วยอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนสำหรับวิเคราะห์ไอออนหลักที่เสริมลงในตัวอย่างน้ำผลไม้

2.1.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

จากผลการศึกษาเบื้องต้นในปีที่ 1 พบว่าอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงนี้ สามารถแยก ไอออนหลักที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำผลไม้ออกจากองค์ประกอบที่ซับซ้อนอื่นๆ ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อ การวิเคราะห์ (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 อุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงและสัญญาณ Background

หลังจากใช้กับน้ำผลไม้ (องุ่น) (a) สัญญาณของสารละลายรับหลังนำองุ่นผ่านอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวง (b) สัญญาณของน้ำองุ่นไม่ได้ผ่านอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวง

ในปีที่ 2 นี้ได้พัฒนาระบบวิเคราะห์ดังกล่าวให้สามารถทำการวัดได้อย่างอัตโนมัติ และปรับปรุงประสิทธิภาพและความเร็วในการตรวจวัดโดยศึกษาแบบเบบหุคเป็นลำดับขั้น และใช้การควบคุมการไหลของสารละลายด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยให้สารละลายตัวอย่างกับสารละลายรับมีเวลาสัมผัสกัน ส่งผลให้สัญญาณการวิเคราะห์สูงขึ้นจึงทำให้สามารถใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยลง โดยสามารถ วิเคราะห์ตัวอย่างได้ 24 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ทั้งนี้ยังสามารถทำงานเป็นอัตโนมัติจากโปรแกรมที่ได้สร้างขึ้นเอง สามารถวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำสุดที่ 0.6 mg L^{-1} และให้ช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงอยู่ที่ $3\text{--}30 \text{ mg L}^{-1}$ จากการวิเคราะห์น้ำผลไม้ที่มีการเติมสารละลายหลักที่ทราบความเข้มข้นลงไปให้ร้อยละการกลับคืนประมาณ 90 (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 คุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ไอออนเหล็กในตัวอย่างน้ำผลไม้

พารามิเตอร์	ค่า
ช่วงความเป็นเส้นตรง	3-30 mg L ⁻¹
ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้	0.6 mg L ⁻¹
เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (จากการวิเคราะห์น้ำผลไม้ที่มี)	89-92%
เปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	2% (จำนวนตัวอย่าง = 8)
จำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมง	24

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธี Wet acid digestion ในตัวอย่างน้ำองุ่นแดงพบว่าได้ปริมาณเหล็กที่แตกต่างกันประมาณ 47% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีวิเคราะห์ในรูปของ Fe²⁺ ซึ่งอาจถูกออกซิไดส์จากอากาศทำให้วิเคราะห์ได้น้อยกว่าความเป็นจริง เมื่อเติมตัวรีดิวซ์ 2% Hydroxylamine ลงในตัวอย่างพบว่าให้สัญญาณเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 37% เมื่อเทียบกับเมื่อไม่ได้เติม Hydroxylamine ลงไป

วิธีใช้

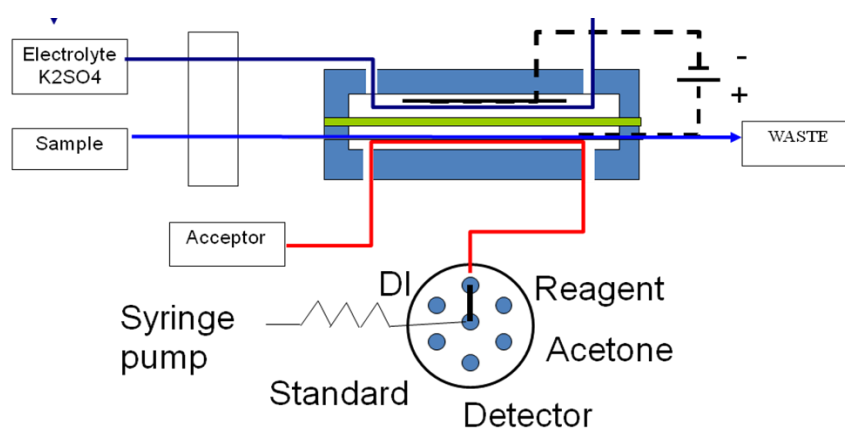
1. ติดตั้งอุปกรณ์โดยสอดเมมเบรนเข้าในช่องสำหรับติดตั้ง แล้วยึดด้วยน็อตสำหรับยึดเมมเบรนเข้ากับอุปกรณ์หมุนเกลียวให้แน่น จากนั้นต่อท่อสารละลายรับด้านหนึ่งเข้ากับระบบวิเคราะห์และอีกด้านหนึ่งไว้ในขวดบรรจุสารละลายรับ
2. บรรจุสารละลายตัวอย่างในขวดสารละลายแล้วนำไปวางบนเครื่องป้อนสาร
3. โหลดโปรแกรม กด Run เพื่อเริ่มการทำงาน ระบบจะทำการเลือกสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ จากนั้น Peristaltic pump จะทำงานเพื่อป้อนสารละลายตัวอย่างเข้าเมมเบรนในฟัังสารละลายป้อนพร้อมๆ เมื่อสารตัวอย่างบรรจุในช่องสารละลายป้อนแล้วระบบจะหยุดการป้อนสาร ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์สะสมอยู่ในเวลาที่ได้กำหนดไว้ เมื่อครบเวลาที่กำหนด Peristaltic pump จะทำงานอีกครั้งเพื่อทำการผสมกับสารเคมีสำหรับการตรวจวิเคราะห์ แล้วผลึกสารละลายเข้าไปยังดีเทคเตอร์ โดยขั้นตอนทั้งหมดใช้เวลา 5 นาที โดยไม่จำเป็นต้องการเตรียมตัวอย่างอื่นเพิ่มเติม เช่น การกรองสารละลาย หรือการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกจากตัวอย่าง
4. สัญญาณที่วิเคราะห์ได้แปลผลออกมาเป็นความเข้มข้นโดยนำความสูงของพีคไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 5

2.2 วิธีวิเคราะห์ปรอทในตัวอย่างปัสสาวะด้วยเมมเบรนไดอะไลซิสแบบมีสนามไฟฟ้าช่วยร่วมกับการวิเคราะห์ โดยมีพื้นฐานจากการไหล

2.2.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

จากการศึกษาวิธีวิเคราะห์ปรอท โดยการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีกับ 4,4'-bis (dimethylamino) thiobenzophenone หรือ Thio-Michler's Ketone (TMK) ซึ่งมีความจำเพาะกับปรอทในรูป Hg^{2+} ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 565 nm และออกแบบระบบเป็น sequential injection analysis (SIA) เพื่อให้สามารถทำการวิเคราะห์ได้อย่างต่อเนื่อง รูปที่ 13 แสดงระบบวิเคราะห์ปรอทแบบอัตโนมัติที่รวมอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวง ที่มีการดัดแปลงโดยใส่สนามไฟฟ้า เพื่อช่วยในการเพิ่มความเร็วในการแยกไอออนที่มีประจุและเพิ่ม ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์



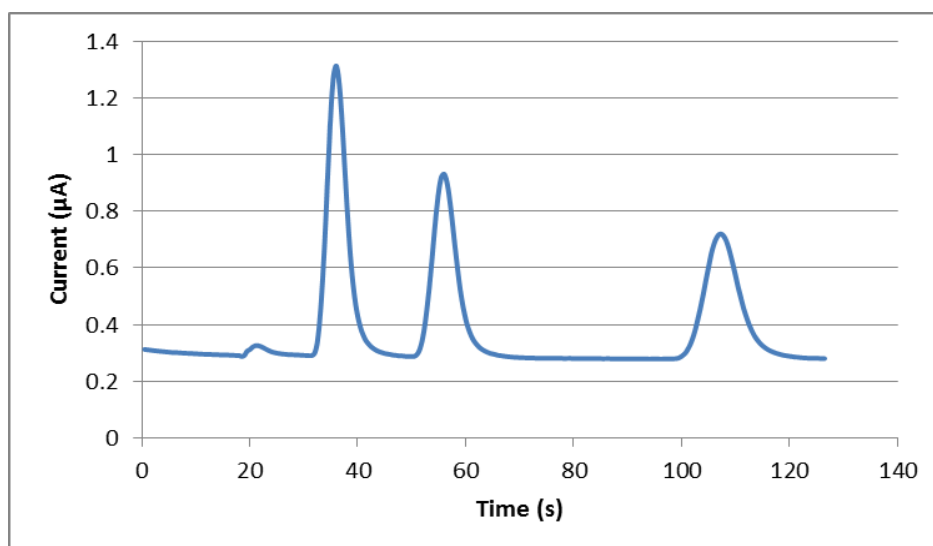
รูปที่ 13 ระบบวิเคราะห์ปรอทแบบอัตโนมัติที่รวมอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวง ดัดแปลงโดยใส่สนามไฟฟ้า

ขั้นตอนการทำงานในการศึกษาข้างต้นสรุปได้ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงขั้นตอนการทำงานของระบบวิเคราะห์ปรอทด้วยวิธี TMK

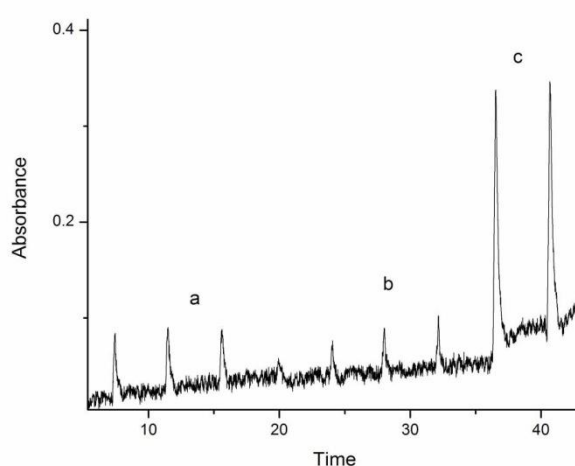
Port	Direction	Flow rate ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Volume (μL)
DI	withdraw	2500	2000
Reagent	withdraw	50	15
Sample	withdraw	100	500
Detector	infuse	2000	2515

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้สร้างระบบควบคุมอัตโนมัติขึ้น โดยสามารถควบคุมอุปกรณ์ทั้งระบบ ได้แก่ Peristaltic pump, Syringe pump, Selection valve, ระบบสร้างสนามไฟฟ้า และ Autosampler ผ่านทาง DAQ card และวงจรไฟฟ้าที่ได้สร้างขึ้น โดยอุปกรณ์ทั้งหมดสามารถควบคุมผ่านทางโปรแกรมที่เขียนขึ้น จาก ภาษา Labview ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 โปรแกรมสำหรับสั่งงานระบบวิเคราะห์หาปริมาณปรอทแบบอัตโนมัติสมบูรณ์แบบ

ผลการทดสอบเบื้องต้นสำหรับระบบการแยก ด้วยเมมเบรนแบบมีไฟฟ้าช่วย สภาวะการทดลองโดย ป้อนสารละลายมาตรฐาน Hg 0.5 mg L^{-1} เข้าไปยังระบบเป็นเวลา 5 นาทีโดยเปรียบเทียบผลการทดลองโดย ที่มีและไม่มีสนามไฟฟ้าช่วยให้ผลดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 สัญญาณวิเคราะห์ด้วยระบบวิเคราะห์ปรอทความเข้มข้น 0.5 mg L^{-1} a) blank b) ไม่มีศักย์ไฟฟ้า c) ใช้ศักย์ไฟฟ้า 9 volt วิธีการวิเคราะห์

1. ติดตั้งอุปกรณ์โดยสอดเมมเบรนเข้าในช่องสำหรับติดตั้งแล้วปิดด้วยกาวร้อนจากนั้นต่อท่อสารละลายรับด้านหนึ่งเข้ากับระบบวิเคราะห์และอีกด้านหนึ่งไว้ในขวดบรรจุสารละลายรับและอีกด้านของอุปกรณ์ต่อเข้ากับสารละลายอิเล็กโทรไลต์
2. บรรจุสารละลายตัวอย่างลงในขวดสำหรับเครื่องป้อนสาร
3. กด run จากโปรแกรมเพื่อเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ ระบบจะทำการเลือกสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์จากนั้น Peristaltic pump จะทำงานเพื่อป้อนสารละลายตัวอย่างเข้าเมมเบรนในฝั่งสารละลายป้อนพร้อมๆ กับการหมุนเวียนสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เพื่อให้กระแสไฟฟ้าครบวงจร จากนั้นสวิทช์จะเปิดให้มีสนามไฟฟ้าขึ้นในระบบทำให้ไอออนของสารที่ต้องการแพร่เข้าไปในฝั่งสารละลายรับ เมื่อครบเวลาที่กำหนด ระบบจะหยุดการป้อนสาร และสนามไฟฟ้าจากนั้นระบบจะดูดสารละลายรับที่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์สะสมอยู่เข้าไปยังระบบวิเคราะห์เพื่อทำการผสมกับสารเคมีสำหรับการตรวจวิเคราะห์ แล้วผลัดสารละลายเข้าไปยังส่วนตรวจวัด โดยขั้นตอนทั้งหมดใช้เวลารวม 3-5 นาที ขึ้นกับระดับความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างอื่นเพิ่มเติม เช่น การกรองสารละลาย หรือการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกจากตัวอย่าง
4. สัญญาณที่วิเคราะห์ได้แปลผลออกมาเป็นความเข้มข้นโดยนำความสูงของพีคไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

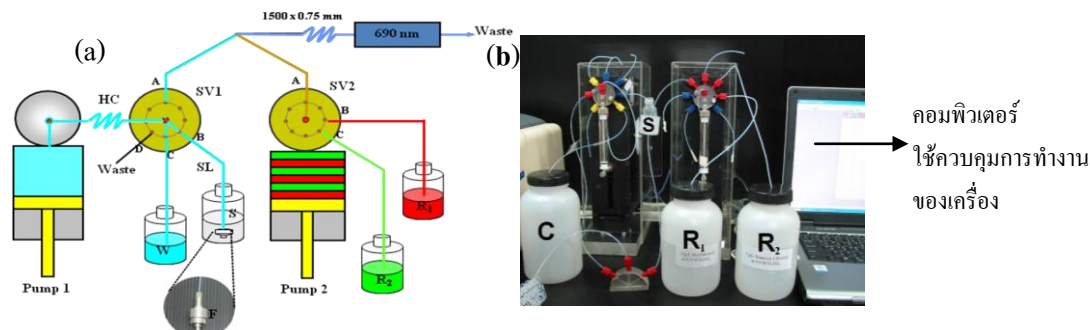
จากการศึกษาเบื้องต้นได้สภาวะการทดลองที่เหมาะสม คือ ใช้ศักย์ไฟฟ้า 9 volt เวลา 5 นาที อัตราการไหลของสารละลายป้อน 0.5 mL min^{-1} ใช้ acetate บัฟเฟอร์เป็นสารละลายรับและสารละลาย อิเล็กโทรไลต์ โดยในการทดสอบเบื้องต้น สามารถเพิ่มระดับความเข้มข้นได้ที่ 2.5 เท่าวิเคราะห์ สารละลายโปรทเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.2 mg L^{-1} สามารถวิเคราะห์โปรทได้ที่ 12-20 ตัวอย่างต่อชั่วโมง เนื่องจาก งานวิจัยนี้ยังมีอุปสรรคในการพัฒนาเพื่อให้ได้ความไวตามต้องการ จึงยังไม่สามารถนำไปทดสอบกับ น้ำปัสสาวะจริงได้

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 6

2.3 ‘ฟอสเฟตอะนาไลเซอร์’: ชุดเครื่องมือต้นแบบเพื่อวัดปริมาณฟอสเฟตในแหล่งน้ำธรรมชาติ

2.3.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

เครื่อง Phosphate analyzer มีแผนผังและรูปถ่ายดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 (a) แผนผัง และ (b) ภาพถ่ายของเครื่อง Phosphate analyzer ที่พัฒนาขึ้น

2.3.2. สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง

ตารางที่ 16 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง Phosphate analyzer ที่พัฒนาขึ้น*

พารามิเตอร์	ค่าที่เหมาะสม
รีเอเจนต์ (R1)	สารละลายสแตนนัสคลอไรด์ 0.3 g L^{-1} + โซดราซีนไดคลอไรด์ 1 g L^{-1}
รีเอเจนต์ (R2)	สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 12 g L^{-1} ใน 0.9 M กรดซัลฟูริก
อัตราการไหลของตัวพา (P1)	2.5 mL min^{-1}
อัตราการไหลของรีเอเจนต์ (P2)	1.3 mL min^{-1}
ขนาดของตัวอย่าง	250 หรือ 500 ไมโครลิตร

(1) ประสิทธิภาพของเครื่อง

(2) ตารางที่ 16 สรุปประสิทธิภาพของเครื่องในด้านต่างๆ

คุณลักษณะของเครื่อง	
การวัด	ใช้น้ำยาที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับฟอสเฟตแบบอัตโนมัติ แล้ววัดการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ที่ 690 nm ภายในเครื่อง
ช่วงความเข้มข้นของฟอสเฟต	กว้าง (0-800 $\mu\text{g P L}^{-1}$)
ขีดจำกัดต่ำสุดที่วัดได้	ต่ำมาก (4.9 $\mu\text{g P L}^{-1}$)
ความเที่ยง	สูง (%RSD = 3)
ความแม่นยำ	สูง (%Recovery = 97.119)
ความเร็วในการวัดตัวอย่าง	สูง (55 ตัวอย่างต่อชั่วโมง)
ใช้งานง่าย	ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างเพราะมีหัวกรองตัวอย่างแล้ว
ขนาด	กะทัดรัด ใช้พื้นที่น้อย (30×45×45 cm)

(3) การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำจากคลองแสนแสบ

คลองแสนแสบเป็นคลองหนึ่งในกรุงเทพฯ ซึ่งมีปัญหามลพิษและน้ำเน่าเสียคลองแสนแสบใช้เป็นเส้นทางขนส่งทางน้ำ (รูป 17 (a)) บริเวณริมคลองมีประชากรอาศัยอยู่อย่างหนาแน่นและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ส่งผลให้มีปริมาณน้ำเสียที่ปล่อยลงสู่คลองแสนแสบเป็นจำนวนมาก (รูป 17 (b)) จะเห็นได้จากในบางบริเวณที่น้ำเปลี่ยนเป็นสีดำและส่งกลิ่นเหม็น

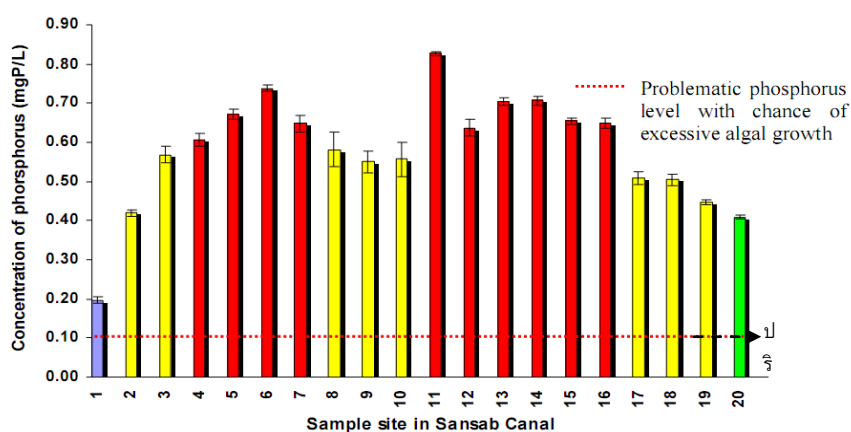


รูปที่ 17 คลองแสนแสบ

ได้ใช้ชุดเครื่องมือต้นแบบที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำจากคลองแสนแสบจำนวน 20 จุดแสดงดังรูปที่ 18 และได้ปริมาณฟอสเฟตแสดงดังรูปที่ 19



รูปที่ 18 จุดที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทั้ง 20 จุดจากคลองแสนแสบ



รูปที่ 19 ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในตัวอย่างน้ำจากคลองแสนแสบทั้ง 20 จุด

จากรูปที่ 19 จะเห็นว่าน้ำตัวอย่างคลองแสนแสบทั้ง 20 จุดที่เก็บตัวอย่างมีปริมาณฟอสเฟตสูงเกินเกณฑ์ที่ควรพบตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงอาจใช้ผลการทดลองนี้เป็นดัชนีชี้วัดได้ว่าคลองแสนแสบประสบปัญหามลภาวะทางน้ำค่อนข้างมากควรที่ทุกภาคส่วนต้องหาทางแก้ไขโดยเร็ว

ขั้นตอนการใช้งาน

เนื่องจากชุดเครื่องมือต้นแบบ Phosphate analyzer นี้ จะทำงานโดยมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ควบคุม หลังจากติดตั้งชุดเครื่องมือและกดปุ่มเริ่มทำงานซึ่งปรากฏอยู่ที่หน้าจอของโปรแกรมเครื่องจะทำงานอย่างอัตโนมัติในทันที โดยภายในการวิเคราะห์ 1 ครั้งจะเกิดขึ้นตอนต่างๆ ดังนี้

- (1) ป้อนข้อมูลรายละเอียดตัวอย่างผ่านชุดกรองไปสู่กระบอกสุบฉีดสารตัวอย่าง

(2) ในขณะที่ปั๊มดูดตัวอย่างทำงานอยู่นั้น ปั๊มดูดสารเคมีก็จะทำงานไปพร้อมๆกัน โดยจะดูดสารเคมีชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ไปเก็บไว้ที่กระบอกสุบฉีดสารเคมีเกิดการผสมขึ้น

(3) ปั๊มดูดสารตัวอย่างและปั๊มดูดสารเคมีจะเคลื่อนที่ขึ้นเพื่อขับเคลื่อนสารตัวอย่าง และสารเคมีทั้งสองชนิด ให้ไหลมาผสมกันที่ท่อผสม เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ขึ้นแล้วไหลเข้าสู่เครื่องวัดการดูดกลืนแสงขนาดเล็กเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อไป

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 7

2.4 การวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าแบบอัตโนมัติสำหรับการอ่านผลแบบขนานสำหรับการวิเคราะห์ห้มสถานะทางสิ่งแวดล้อม

2.4.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

1. ใช้แท่งคาร์บอนสำหรับการทำดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์สตีปีงโวลแทมเมตริกของ Pb^{2+} และ Cd^{2+} ในตัวอย่างที่ละลายได้ในน้ำโดยใช้แคโทดิกสตีปีงโวลแทมเมตริก เพื่อหาปริมาณโลหะปริมาณน้อยๆ การเพิ่มประสิทธิภาพของแท่งคาร์บอนที่ใช้เป็นขั้วนั้น คือการเติมบิสมัทลงไปในสารละลายแบบ in situ (มีปริมาณบิสมัทคงที่) ทำหาปริมาณของโลหะหนักตัวอย่างโดยใช้วิธีการเติมสารมาตรฐาน (Standard addition method) โดยข้อได้เปรียบของการทำสตีปีงโวลแทมเมตริก คือสามารถวัดโลหะหนักได้มากกว่าครั้งละหนึ่งชนิด โดยบรรจุสารลงในไมโครไตเตอร์เพลทขนาด 24 หลุม (หลุมละประมาณ 2.5 mL) วัดตัวอย่างได้ครั้งละ 1 เพลท (24 หลุม) ต่อ 1 ชั่วโมง

2. วิธีการวิเคราะห์ที่กรณีเป็น publication (direction lab)

บรรจุสารมาตรฐาน หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ลงในไมโครไตเตอร์เพลทขนาด 24 หลุม เพื่อนำไปวัดที่เครื่องโรโบติกเคมีไฟฟ้า

ขั้นตอนการใช้เครื่องโรโบติกเคมีไฟฟ้านั้น เป็นการเขียนโปรแกรมการเคลื่อนที่ของภาชนะบรรจุสารตัวอย่าง (ไมโครไตเตอร์เพลท) ในแนวแกน x, y การเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรดสามชิ้น ในแกน z ควบคู่กับการเขียนโปรแกรมสั่งการการวัดสารโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าของเครื่อง potentiostat เช่นเทคนิคสตีปีงโวลแทมเมตริก ไชคลิกโวลแทมเมตริก หรือแอมแปโรเมตริก

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 8

2.5 การพัฒนาวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี สำหรับการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเบต้าแลคแตม ในเนื้อเยื่อสัตว์

2.5.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC-MS สามารถสรุปได้ดังนี้

ตารางที่ 17 สภาวะที่เหมาะสมของ GC-MS

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
Gas chromatograph	รุ่น 6890N GC (Agilent Technologies, Inc. (USA))
Mass spectrometer	รุ่น 5975B MSD (Agilent Technologies, Inc. (USA))
Injector	รุ่น GC PAL CTC (autosampler CTC Analysis (Switzerland))
Data system	โปรแกรม MSD ChemStation (E.02.00.493)
Column	Ultra 1 (17 m x 0.2 mm x 0.11 μ m methyl silicone)
Carrier Gas	Helium
Injection mode	Splitless
Splitless Time (min)	1.5
Injection volume (μ L)	1.0
Inlet Temperature ($^{\circ}$ C)	280
Oven Temperature ($^{\circ}$ C)	ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ oven 3 ช่วง ดังนี้
Ion Source Temperature ($^{\circ}$ C)	200
Scanning mode	Full scan: 300 – 600 m/z^{-1}
Qualifying Ion	For amoxicillin: 488, 570, 585
Quantifying Ion	For amoxicillin: 585

ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเบต้าแลคแตม คืออะม็อกซิซิลลิน (AMO) และแอมพิซิลลิน (AMP) ในเนื้อเยื่อสัตว์จะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย ขั้นตอนที่ 1 การสกัดแบบของเหลว (Liquid extraction) ขั้นตอนที่ 2 การสกัดแบบโซลิดเฟส (Solid-phase extraction) และขั้นตอนที่ 3 การเตรียมอนุพันธ์ (Derivatization) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: การสกัดแบบของเหลว (Liquid extraction)

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่บดเป็นเนื้อเดียวกัน หนัก 1.0000 กรัม ลงในหลอดพลาสติกชนิด โพลีโพรพิลีนขนาด 50 mL

↓
เติม 200 μ L ของสารละลายมาตรฐานผสม 100 μ g mL⁻¹ AMP และ AMO (ใน Methanol/NH₄OH (4:1))

↓
+ 200 μ L ของ 5 μ g mL⁻¹ 17 α -methyltestosterone (ในเมทานอล)

↓
เขย่า (vortex) ที่ความเร็วต่ำ นาน 15 นาที

↓
ตั้งทิ้งไว้ไม่ให้โดนแสง นาน 15 นาที

↓
เติมน้ำปราศจากไอออน 2 mL + 8 mL ของ Acetonitrile
นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

↓
ระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 50 °C

↓
ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Ultrasonic นาน 5 นาที

↓
กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 μ m

↓
ถ่ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดทดลองขนาด 15 mL
ละลายด้วย 5 mL ของ 0.2 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5
นำไปสกัดแบบโซลิดเฟส ขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

↓
1) 2 mL เมทานอล

↓
2) 2 mL น้ำปราศจากไอออน

↓
3) 2 mL 0.2 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5

ขั้นตอนที่ 2: การสกัดแบบโซลิดเฟส (Solid-phase extraction)

↓
ใช้ Solid-phase extraction ชนิด Bond-Elut C18 cartridge

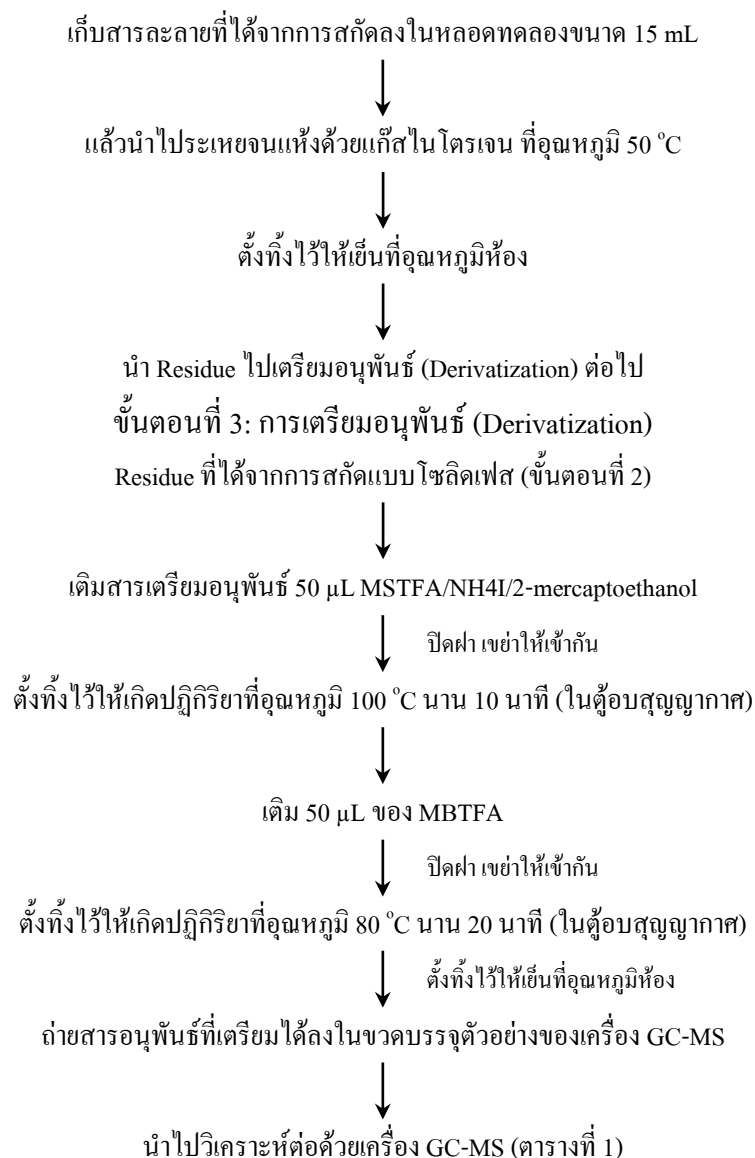
↓
Precondition ของ Bond-Elut C18 cartridge

↓
เติม 5 mL ของสารละลายสกัดตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนที่ 1

↓
ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 mL

↓
ทำให้แห้งสนิท โดยตั้งทิ้งไว้ในตู้อบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 °C
นาน 30 นาที

↓
ชะ AMP และ AMO ด้วย 4 mL ของสารละลาย Acetonitrile:De-ionized water (1:1)



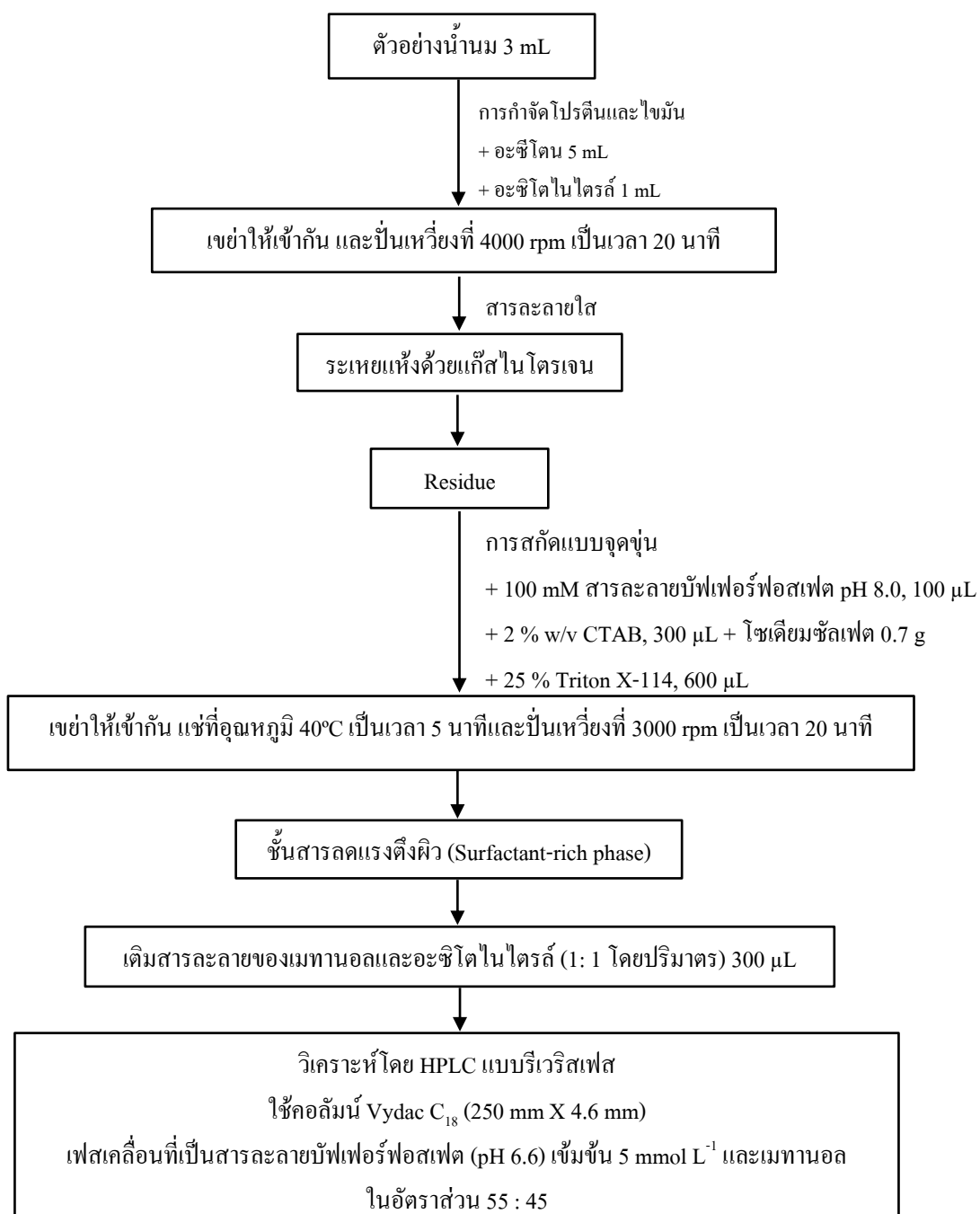
หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 9

2.6 การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรฟอเรซิส และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะที่ตกค้างในอาหาร

2.6.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

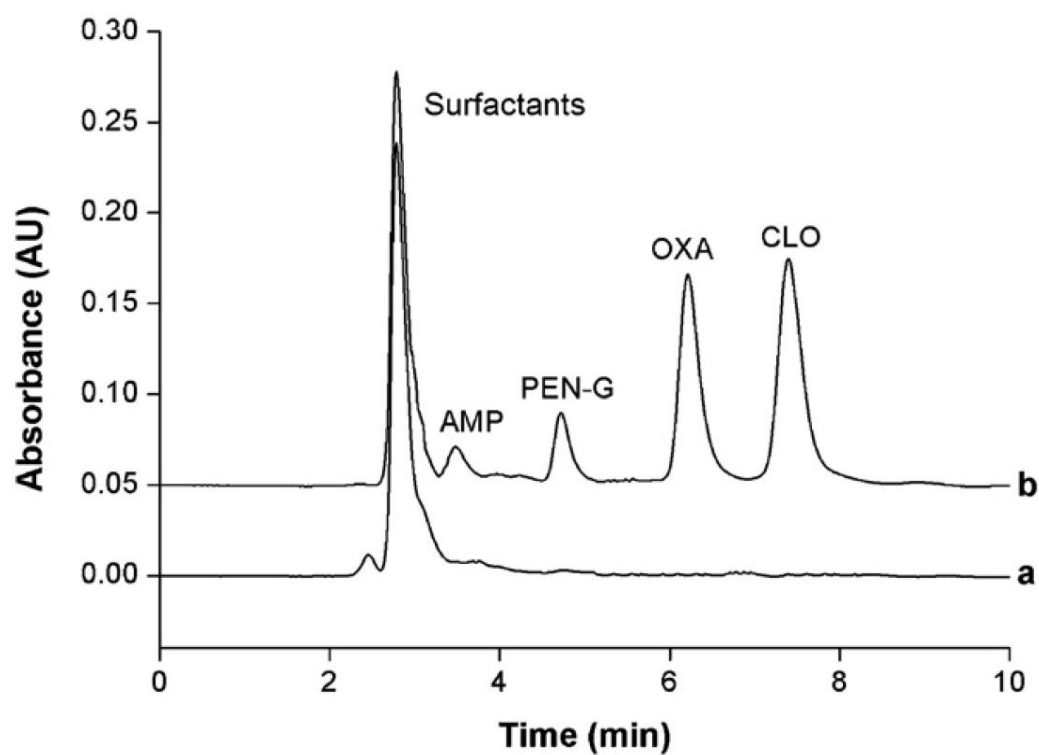
งานวิจัยนี้เลือกศึกษาสารปฏิชีวนะกลุ่มเพนิซิลลิน (penicillins) จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ คลอกซาซิลลิน (cloxacillin, CLO) แอมพิซิลลิน (ampicillin, AMP) ออกซาซิลลิน (oxacillin, OXA) และ เพนิซิลลินจี (penicillin G, PEN-G) สารปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดนี้จะนิยมใช้กับโคนมในช่วงการรีดนมเพื่อป้องกัน เต้านมอักเสบ (mastitis)

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวัดการตกค้าง และการปนเปื้อนของสารปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิด ในตัวอย่างน้ำนมวัว (bovine milk) วิธีการประกอบด้วยขั้นตอน ดังรูปที่ 20 การเตรียมตัวอย่างน้ำนม กำจัดโปรตีนและไขมันจากน้ำนม โดยการตกตะกอนด้วย สารละลายของอะซิโตน (acetone) และ อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) อัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตรแล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออก นำสารละลาย ที่ได้ไประเหยแห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจนเพื่อกำจัดตัวทำละลาย จะได้ residue ที่จะนำไปทดลองต่อไป การสกัดสารปฏิชีวนะจากตัวอย่างน้ำนม ใช้วิธีการสกัดแบบจุดขุ่น (cloud point extraction, CPE) เพื่อเพิ่ม ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในตัวอย่างให้มีความเข้มข้นมากพอที่จะ วิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องโดยนำ residue ที่ได้จากการกำจัดโปรตีนและไขมันออกแล้ว (จากข้อ 1) มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffer) แล้วนำไปสกัดด้วยวิธี CPE โดยเติม ซิทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) โซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate) และ ไตรตันเอกซ์-114 (triton X-114) การวิเคราะห์สารปฏิชีวนะ โดยโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) ใช้ HPLC แบบรีเวิร์สเฟส (reversed phase) โดยศึกษาองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมซึ่งสามารถแยกสารปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิด ได้ในเวลาสั้นที่สุด การทดลองพบว่าเมื่อคอลัมน์ Vydac C18 (250 mm X 4.6 mm) และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (pH 6.6) เข้มข้น 5 mmol L⁻¹ และเมทานอล (methanol) ในอัตราส่วน 55:45 และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1 mL min⁻¹ สามารถแยกสารทั้ง 4 ชนิดได้ภายในเวลา 8 นาที ในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะที่สกัดจากตัวอย่างน้ำนมจะนำสารที่สกัดได้ (จากข้อ 2) มาเติมสารละลายของเมทานอลและอะซิโตนไนไตรล์ (1:1 โดยปริมาตร) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สภาวะของ HPLC ข้างต้น



รูปที่ 20 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะจากตัวอย่างน้ำมัน

การทดลองโดยใช้วิธีการสกัดแบบจุดชุ่มร่วมกับ HPLC ในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะในตัวอย่างน้ำมัน แสดงได้ดังโครมาโทแกรมในรูปที่ 20



รูปที่ 21 โครมาโทแกรมของการหาปริมาณสารปฏิชีวนะโดยใช้วิธี CPE-HPLC (a) ตัวอย่างน้ำนมวัว (b) ตัวอย่างน้ำนมวัวที่เติมยาปฏิชีวนะ $5 \mu\text{g mL}^{-1}$

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 10

2.7 การพัฒนาวิธีตรวจวัดพาราเบนโดยเทคนิคอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

2.7.1 รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์สารกันบูดแบบออนไลน์ ด้วยระบบซีเควินเซียลอินเจกชันอะนาไลซิส ร่วมกับเทคนิคอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี โดยใช้การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า สารกันบูดที่สนใจศึกษาเป็นสารในกลุ่มพาราเบน คือ เมทิลพาราเบน เอทิลพาราเบน และโพรพิลพาราเบน ซึ่งนิยมใส่ในอาหารจำพวก น้ำหวาน น้ำผลไม้ แยม ขนมหวานและสารปรุงแต่งกลิ่นรส ฯลฯ โดยกำหนดให้ใช้ปริมาณสูงสุดได้เพียง 1 กรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม แม้ว่าพาราเบนจะมีความเป็นพิษต่ำ แต่หากได้รับในปริมาณมากหรือสะสมในร่างกายเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดผลเสียได้ โดยมีงานวิจัยที่ว่าพาราเบนมีฤทธิ์เลียนแบบฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม ดังนั้นจึงควรมีการตรวจวัดพาราเบนในอาหารเพื่อควบคุมปริมาณให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการวิเคราะห์แบบรวดเร็ว ซึ่งได้เลือกใช้คอลัมน์ที่มีความยาวคอลัมน์สั้น (Short column) Reverse phase C18 ที่มีความยาวคอลัมน์ 25 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร (รูปที่ 22) ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างรวดเร็ว วิเคราะห์สารจำนวนมากในเวลาอันสั้นและใช้เวลา ในการเข้าสู่สมดุลน้อย ทั้งนี้การใช้คอลัมน์สั้นและอนุภาคขนาดเล็กส่งผลต่อแรงดันย้อนกลับ (Back pressure) จึงเลือกใช้เทคนิคอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟีที่ทนต่อความดันสูงและสามารถใช้ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่สูงได้



รูปที่ 22 คอลัมน์ Reverse phase C18 ที่มีความยาวคอลัมน์ 25 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร

ภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี ร่วมกับการตรวจวัดแอมเพอโรเมตรีสำหรับการวิเคราะห์แบบรวดเร็วของพาราเบนคือ

เฟสเคลื่อนที่: Acetonitrile และ 0.05 M Phosphate buffer pH 5 ในอัตราส่วน 25:75

อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่: 2.5 mL min⁻¹

การตรวจวัดทางแอมเพอโรเมตรี

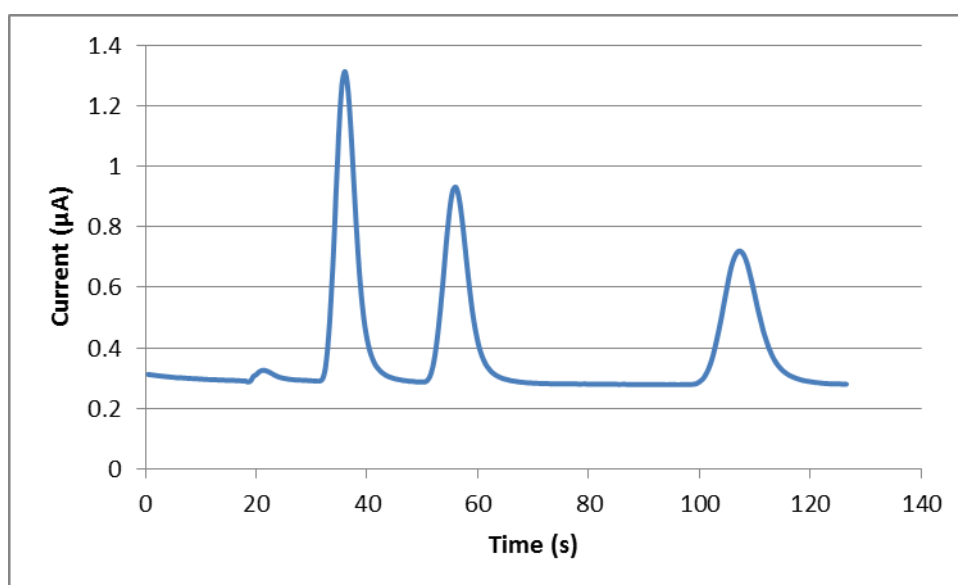
ขั้วไฟฟ้าใช้งาน: ขั้วไฟฟ้าเพชรที่เคลือบด้วยโบรอน

ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง: ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์ในสารละลายซิลเวอร์คลอไรด์

ขั้วไฟฟ้าช่วย: สแตนเลส

โดยให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ระบบ: 1.5 V vs. Ag/AgCl

ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานพาราเบนแสดงในรูปที่ 23 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ถึง 30 ตัวอย่างชั่วโมง



รูปที่ 23 โคโรมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพาราเบนความเข้มข้น 10 ppm ที่ภาวะที่เหมาะสม

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 11

2.8. การสร้างระบบรับรู้ทางเคมีไฟฟ้าเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณโลหะเป็นพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร

2.8.1. รายละเอียดที่ได้รับจากการวิจัย

1. ภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัด

ตารางที่ 18 สรุปภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดทองแดงจากตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
ศักย์ไฟฟ้าในการ Deposition	-0.5 V
เวลาในการ Deposition	120 วินาที
ผลของ pH	pH 4.5
ชนิดของสารละลายเกลือหนูน	โซเดียมคลอไรด์
ความเข้มข้น 1,10-phenanthroline	1×10^{-4} M

2. การทดสอบประสิทธิภาพของตัวตรวจวัด

ตารางที่ 19 สรุปประสิทธิภาพของวิธีการในด้านต่างๆ

คุณลักษณะของตัวตรวจวัดและวิธีการ	
การวัด	ใช้ลิแกนด์ที่จับกับทองแดงแบบอัตโนมัติ
ช่วงความเข้มข้นของทองแดง	กว้าง ($0.1-50 \text{ ng mL}^{-1}$)
ขีดจำกัดต่ำสุดที่วัดได้	ต่ำมาก (0.02 ng mL^{-1})
ค่าร้อยละการกลับคืน	สูง (93.4-103.8)
ความเร็วในการวัดตัวอย่าง	สูง (30 ตัวอย่างต่อชั่วโมง)
ใช้งานง่าย	ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างกรณีของสารตัวอย่างประเภทของเหลว
ขนาด	ขนาดเล็ก ใช้กำลังไฟน้อย

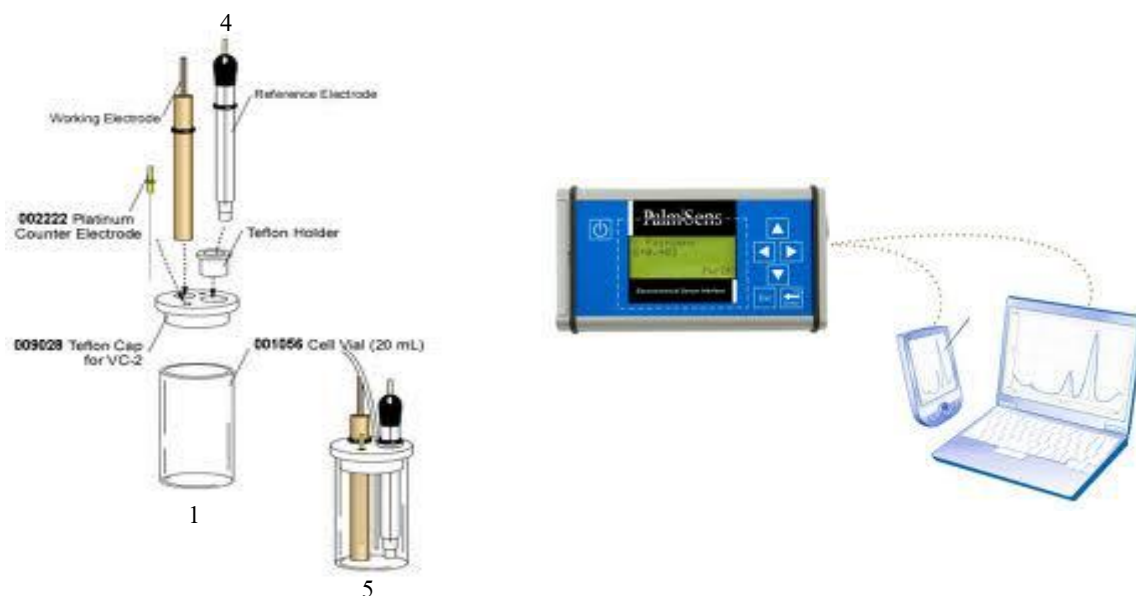
3. การศึกษาผลของตัวรบกวนในการวิเคราะห์

ตารางที่ 20 Tolerance ratios ของไอออนต่าง ๆ ที่อาจพบได้ในตัวอย่างอาหาร

Ions	Tolerance ratio (W_{ion}/W_{Cu})
CH_3COO^- , Glucose, K^+	1500
PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- , Ba^{2+} , Ascorbic acid	1000
Br^- , CO_3^{2-} , IO_3^-	500
HPO_4^{2-} , Ca^{2+} , HCO_3^-	300
Mg^{2+} , I^- , EDTA	200
Pb^{2+} , Cd^{2+} , SO_4^{2-}	100
Zn^{2+} , Mn^{2+}	50
Fe^{2+} , Li^+ , SCN^- , Co^{3+} , Hg	30
Ag^+ , CN^-	10

จากตารางจะเห็นได้ว่า ไอออนต่าง ๆ ไม่แสดงการรบกวนการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

4. ขั้นตอนการใช้งาน



รูปที่ 24 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโลหะ

- นำสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ $pH = 4.5$ ใส่ในภาชนะบรรจุสาร (1) เติมสารละลายลิแกนด์ (1,10-phenanthroline) ลงใน (1) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{-4} โมลาร์

2. ประกอบวัสดุ (2) (3) และ (4) ได้ดังรูปที่ (5) นำอุปกรณ์ (5) ไปต่อเข้ากับเครื่องจ่ายศักย์ไฟฟ้า (6) เพื่อให้โลหะเกิดการพอกพูนที่ระบบรับรู้ก่อนทำการตรวจวัดออกมาในรูปของกระแสไฟฟ้า

หมายเหตุ: วิธีการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงในภาคผนวกที่ 12