

บทที่ 3

สรุปผลการทดลอง

สรุปภาพรวมของแผนงานวิจัย

แผนงานวิจัยนี้ได้นำเสนอวิธีวิเคราะห์แบบรู้ผลเร็วในรูปแบบต่างๆ ซึ่งเป็นการพัฒนาระบบวิเคราะห์ให้เป็นแบบอัตโนมัติร่วมกับการวิเคราะห์แบบต่อเนื่อง เช่น ระบบวิเคราะห์แบบไหล และใช้วิธีตรวจวัดที่ให้ ผลที่รวดเร็ว เช่น การตรวจวัดด้วยเคมีไฟฟ้า และ Spectrophotometry นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการ เตรียมตัวอย่างที่รวดเร็ว เช่น เมมเบรน และการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง และการใช้เครื่องมือการแยกที่มี สมรรถนะสูง เช่น GC-MS, HPLC และ UPLC เป็นต้น แผนงานวิจัยยังได้นำเสนอวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวกับงานด้านการคัดกรองสารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรไทย ซึ่งมีส่วนช่วยอย่างมากให้กระบวนการค้นหายาใหม่สามารถทำได้รวดเร็วยิ่งขึ้น และยังสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารพิษที่ปนเปื้อนใน สิ่งแวดล้อม และอาหาร เพื่อให้การเฝ้าระวังอันตรายจากสารดังกล่าวทำได้อย่างรวดเร็วและทันการณ์

แผนงานวิจัยนี้ได้ผลิตอุปกรณ์ต้นแบบ 2 ชุด ได้แก่ Multi-optical sensor (AO Screener) และ SI-XOD-COL สำหรับประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย และวิธีวิเคราะห์ เพื่อการคัดกรองสารต้านอนุมูลอิสระอีก 3 วิธี รวมถึงวิธีวิเคราะห์สำหรับวิเคราะห์ โลหะหนัก และสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและอาหารอีก 8 วิธี โดยอุปกรณ์ต้นแบบและวิธีวิเคราะห์ ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ ส่วนใหญ่สามารถนำมาใช้ได้จริง ทำให้ลดการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศ ซึ่งจะเป็นโอกาสให้ประเทศไทยได้นำเทคโนโลยีของตนเองมาใช้ได้จริง

ผลงานวิจัยบางส่วนยังมีอุปสรรค และยังอยู่ในระหว่างขั้นตอนการพัฒนาระบบโดยการปรับตัวแปรต่างๆ ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นในอนาคต ทั้งนี้คณะผู้วิจัยเชื่อว่าผลงานวิจัยที่ได้มานี้ เมื่อพัฒนาให้มีความสมบูรณ์แล้ว จะเป็นประโยชน์สำหรับงานด้านการค้นหายาตัวใหม่ การศึกษาสารออกฤทธิ์ การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ และการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษ และสารมลพิษในอาหาร และสิ่งแวดล้อม และสามารถนำไปพัฒนาไปสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

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

1.1. การพัฒนาระบบวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่ที่รวดเร็วเพื่อประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย

สรุปผล

ในการวิจัยสามารถสร้างเครื่องมือที่ใช้คัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรแบบ 8 หัววัด เครื่องสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในจานหลุม 96 หลุมภายในเวลา 4 นาทีโดยอาศัยการวัดสีที่ข้างลงของเรดิคัลแคทไโอออนของฟิโนโซอะซินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งเครื่องและปฏิกิริยาสามารถ

เตรียมได้ง่าย และราคาถูก ควบคุมการวัดด้วยคอมพิวเตอร์นอกจากนี้ได้ออกแบบและสร้าง ระบบไมโครฟลูอิดิก ที่สามารถประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูป TEAC ($\mu\text{mol g}^{-1}$) และหาปริมาณสาร กลุ่มฟีนอลิกในรูป mg GAE g^{-1} ในพืชสดเดียวกันและวัดพร้อมกันโดยอาศัยวิธี ABTS^{•+} และ Folin Ciocalteu ตามลำดับ มีความรวดเร็วในการวิเคราะห์พอสมควร เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ทั้งสอง พารามิเตอร์ในตัวอย่างชาสมุนไพรได้ 20 ตัวอย่างต่อชั่วโมง พบว่าในชาที่ศึกษาชาหญาหนวดแมงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ Phenolic สูงสุด ความสัมพันธ์ของปริมาณ GAE และ TEAC ของตัวอย่าง ชาสมุนไพร 9 ชนิดมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง

1.2. เครื่องมือการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าแบบอัตโนมัติสำหรับการอ่านผลแบบขนานและการวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากพืช

สรุปผล

โครงการนี้ได้้นำเครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าแบบอัตโนมัติสำหรับการอ่านผลแบบขนานเครื่องต้นแบบจากโครงการในปีที่ 1 มาใช้หาค่า Total Antioxidant Capacity ในผลไม้, สารสกัดจากพืชและผัก, ชาเม็ด และ ชาสมุนไพร

1.3. การพัฒนาระบบวิเคราะห์อัตโนมัติสำหรับตรวจคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว

สรุปผล

ได้พัฒนาเครื่องมือและวิธีการในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขึ้น 3 ระบบ โดย 2 ระบบแรกอาศัยหลักการยับยั้งเอนไซม์ xanthine oxidase ซึ่งอาจจะสามารถใช้ตรวจคัดกรองสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase ได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และประหยัด ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวนี้มีศักยภาพที่จะใช้เป็นอาหารและยาสำหรับป้องกัน/รักษาโรคเกาต์ และ โรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมถอยของร่างกายเนื่องจากอนุมูลอิสระได้ ส่วนระบบที่ 3 จะตรวจวัดโดยอาศัยสมบัติการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระโดยการเกิดปฏิกิริยากับไอโอดีน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดสำหรับตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว โดยมีความเป็นอัตโนมัติสูงเหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก

ในระยะต่อไปจะดำเนินการจดสิทธิบัตรเครื่องมือที่พัฒนาขึ้น และจะต้องทำการปรับปรุงเพิ่มเติมต่อไปอีกเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้กับตัวอย่างหลายประเภท โดยต้องทำการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมกับตัวอย่างชนิดต่างๆ รวมทั้งการออกแบบเครื่องมือให้มีรูปลักษณะที่สวยงามเพื่อการผลิตในเชิงพาณิชย์

1.4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูติกโดยใช้อุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดานร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

สรุปผล

สามารถนำอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดานมาใช้ในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเพื่อตรวจวัดปริมาณ กรดเฟอร์รูติก ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถูกต้อง สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ใช้งานง่าย และราคาไม่แพง ซึ่งในการวิเคราะห์กรดเฟอร์รูติก พบว่า มีค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 3-140 ppm และขีดจำกัดต่ำสุดที่วัดได้ คือ 1 ppm สามารถใช้วิเคราะห์กรดเฟอร์รูติกได้สูงถึง 30 ตัวอย่างต่อชั่วโมง โดยจะได้นำอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดานนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูติกในตัวอย่าง ข้าว และข้าวโพดต่อไป

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

2.1. วิธีเตรียมตัวอย่างแบบออนไลน์ด้วยอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนสำหรับวิเคราะห์ไอออนหลักที่เสริมลงในตัวอย่างน้ำผลไม้

สรุปผล

โครงการนี้ได้สร้างอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรนแบบท่อกว้าง สำหรับการเตรียมตัวอย่างที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนและอาจจะไปรบกวนการวิเคราะห์ทางด้านสเปกโทรสโคปี โดยนำไปใช้ร่วมกับระบบวิเคราะห์แบบไหล และได้ระบบวิเคราะห์ที่สามารถรวมขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์เข้าด้วยกัน ระบบนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ไอออนหลักจากตัวอย่างน้ำผลไม้โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอื่นๆ อีก ซึ่งทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทันที ใช้เวลาวิเคราะห์น้อย และมีค่าใช้จ่าย และสิ้นเปลืองสารเคมีที่น้อย โดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ที่ 24 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

2.2 วิธีวิเคราะห์ปรอทในตัวอย่างปัสสาวะด้วยเมมเบรนไอโอสไลซิสแบบมีสนามไฟฟ้าช่วยร่วมกับการวิเคราะห์ โดยมีพื้นฐานจากการไหล

สรุปผล

โครงการนี้ได้สร้างระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติเต็มรูปแบบ โดยการรวมอุปกรณ์การแยกด้วยเมมเบรน แบบท่อกว้างร่วมกับระบบวิเคราะห์แบบไหลสำหรับการเตรียมตัวอย่างที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน เช่น น้ำปัสสาวะ และได้พัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์ปรอท โดยศึกษาการใช้สนามไฟฟ้าช่วยในการแยกไอออน และเพิ่มความเข้มข้น ระบบวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์ปรอทได้ที่ 12-20 ตัวอย่างต่อชั่วโมงแต่ยังไม่ได้ความไว ตามต้องการ จึงยังไม่สามารถนำไปทดสอบกับน้ำปัสสาวะจริงได้

2.3 ‘ฟอสเฟตอะนาไลเซอร์’: ชุดเครื่องมือต้นแบบเพื่อวัดปริมาณฟอสเฟตในแหล่งน้ำธรรมชาติ

สรุปผล

ชุดเครื่องมือต้นแบบ ‘Phosphate analyzer’ ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ใช้งานได้ง่ายเพราะขั้นตอนการวิเคราะห์ทุกขั้นตอนควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ หากบุคคลทั่วไปได้รับการอบรมเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับการติดตั้งเครื่องและขั้นตอนการทำงานก็จะสามารถใช้เครื่องนี้ได้ ชุดเครื่องมือนี้ มีความคงทน สามารถนำไปวิเคราะห์แบบลงพื้นที่จริงได้ สามารถกรองและล้างตัวกรองตัวอย่างน้ำได้อย่างอัตโนมัติ

2.4 การวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าแบบอัตโนมัติสำหรับการอ่านผลแบบขนานสำหรับการวิเคราะห์มลภาวะทางสิ่งแวดล้อม

สรุปผล

ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์สตีปีงโวลแทมเมตรี (DP-SV) ของโลหะหนักประสบผลสำเร็จอย่างดีเมื่อใช้แท่งคาร์บอน (ไส้ดินสอด) เป็นอิเล็กโทรดทำงาน ในอิเล็กโทรดสามชิ้นที่ต่อกับเครื่องโรโบติกเคมีไฟฟ้า และต่อกับไมโครไคเตอร์เพลท ทำการหาตัวแปรที่ใช้ในการวิเคราะห์ DP-SV โดยใช้แท่งคาร์บอนแล้ว และจะนำวิธีนี้ไปประยุกต์กับการหาโลหะหนักในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม โดยวิธีการวัดแบบอัตโนมัติต่อไป

2.5 การพัฒนาวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี สำหรับการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเบต้าแลคแตมในเนื้อเยื่อสัตว์

สรุปผล

ประเมินประสิทธิภาพวิธี (Method validation)

พารามิเตอร์	อะม็อกซิซิลลิน (AMO)	แอมพิซิลลิน (AMP)
ช่วงความเป็นเส้นตรง (ไมโครกรัมต่อกรัม)	0.5 - 20	0.5 - 20
ความเที่ยง (Precision) (% RSD)		
Repeatability (n = 10)	8.15	8.07
Reproducibility (n = 6)	13.34	8.74
ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่หาปริมาณได้ (μg^{-1})	0.5	0.5

ได้นำวิธี GC-MS ที่พัฒนาขึ้นไปทำการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเบต้าแลคแตม คือ อะม็อกซิซิลลิน และ แอมพิซิลลิน ในเนื้อสัตว์ต่างๆ คือ เนื้อหน้าอกไก่ จำนวน 5 ตัวอย่าง เนื้อสันในหมู 3 ตัวอย่าง และ เนื้อสันนอกหมู จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่วางจำหน่ายในตลาด 2 แห่งในกรุงเทพมหานคร พบว่า ไม่ตรวจพบ อะม็อกซิซิลลินและแอมพิซิลลินในตัวอย่างดังกล่าว วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการ ยืนยันการปนเปื้อนอะม็อกซิซิลลินและแอมพิซิลลินในเนื้อสัตว์ต่างๆ ได้

2.6 การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะที่ตกค้างในอาหาร

สรุปผล

ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาตัวแปรต่างๆของวิธีที่พัฒนานี้ (CPE-HPLC) คือ ได้วิธีการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่มเพนิซิลิน (penicillins) จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ คลอซาคซิลลิน (cloxacillin, CLO) แอมพิซิลลิน (ampicillin, AMP) ออกซาคซิลลิน (oxacillin, OXA) และ เพนิซิลินจี (penicillin G, PEN-G) จากตัวอย่างน้ำนมวัว ขั้นตอนการวิเคราะห์สรุปได้ดังรูปที่ 15

วิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ มีข้อดีคือ สามารถใช้วิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิดได้พร้อมกันโดยมีความไวสูง (โดยมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) ในช่วง $2-3 \text{ ng mL}^{-1}$) ทำให้สามารถตรวจวัดสารที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ในช่วงปริมาณสูงสุดของสารตกค้าง (maximum residue limit; MRL) ของสารปฏิชีวนะดังกล่าว (ซึ่งมีค่าในช่วง $4-30 \text{ ng mL}^{-1}$) ในน้ำนมวัวได้

วิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำนมก่อนการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยากไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ นอกจากนี้ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้เป็นอุปกรณ์และเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป

ในกรณีที่ต้องการวิเคราะห์โดยไม่สกัดด้วย CPE จะทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำนมมากำจัดโปรตีนและไขมัน แล้ววิเคราะห์ต่อยด้วย HPLC ได้เลย แต่วิธีการวิเคราะห์ที่ไม่สกัดด้วย CPE จะมีข้อด้อยคือ จะตรวจวัด ได้ถ้าสารปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดต้องมีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (โดยจะตรวจวัด OXA ได้ถ้าตัวอย่างมีความเข้มข้นของ OXA มากกว่า 30 ng mL^{-1} จะตรวจวัด AMP และ PEN-G ได้ถ้ามีความเข้มข้นมากกว่า 80 ng mL^{-1} และจะตรวจวัด CLO ได้ถ้ามีความเข้มข้นมากกว่า 100 ng mL^{-1})

2.7 การพัฒนาวิธีตรวจวัดพาราเบนโดยเทคนิคอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟีร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

สรุปผล

ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แบบรวดเร็วของพาราเบน สามารถวิเคราะห์ได้ถึง 30 ตัวอย่างชั่วโมง สามารถนำภาวะที่ได้มาวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.8 การสร้างระบบรับรู้ทางเคมีไฟฟ้าเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณโลหะเป็นพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร

สรุปผล

จากการศึกษาและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ Cu(II) โดยใช้ 1,10-phenanthroline เป็นสารประกอบเชิงซ้อนเพื่อเพิ่มสัญญาณในการตรวจปริมาณ Cu(II) น้อยมาก ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้เทคนิคแอดซอร์ปทีฟสทริปปิงโวลแทมเมตรี บนขั้ว Glassy carbon electrode ในสารละลาย 0.1 M NaCl pH 4.5 ที่ศักย์ไฟฟ้าในการ Deposition -0.5 V เป็นเวลา 120 วินาที โดยมีความเข้มข้น 1,10-phenanthroline เท่ากับ 10^{-4} M จากนั้นทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าไปทางด้านบวกตั้งแต่ -0.3 ถึง 0.4 V พบที่ได้จะพบว่าเกิดฟิสิกของสารประกอบ Cu(II) ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.05 V โดยขีดจำกัดในการวิเคราะห์ตรวจวัดเท่ากับ 0.02 ng mL^{-1}

ขีดจำกัดในการวิเคราะห์ตรวจวัด ปริมาณ Cu(II) เท่ากับ 0.1 ng mL^{-1} และให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณที่ตรวจวัดได้ของ Cu(II) เท่ากับ $0.1\text{-}50 \text{ ng mL}^{-1}$ และวิธีนี้ยังปราศจากตัวรบกวนจากไอออนอื่นอีกด้วย จากการนำวิธีที่พัฒนาไปวิเคราะห์ปริมาณทองแดงในสารตัวอย่างพบว่า ร้อยละการกลับคืนของวิธีการมีค่าอยู่ในช่วง 97.4-103.8