เลขที่อนุสิทธิบัตร 25820

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	2103001802
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	25 มิถุนายน 2564
ผู้ประดิษฐ์	นายชิราวุฒิ เพชรเย็น และคณะ
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	กรรมวิธีการเตรียมสารละลายเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีนโดยใช้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 13 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2568

หมดอายุ ณ วันที่ 24 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2570

(นายกิตติวัฒน์ ปัจฉิมนันท์)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

Ref.256801049068023

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีเตรียมสารละลายเพื่อใช้สำหรับการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีนโดยใช้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบการทดลองโดยวิเคราะห์ปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) อะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) และเอลมานรีเอเจนท์ (DTNB) มีความมุ่งหมายในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มอร์กาโนคลอรีน โดยทำการเตรียมสารตั้งต้นโดยศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) อะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) และเอลมานรีเอเจนท์ (DTNB) แล้วนำสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุดได้จากการทดสอบมาทำการทดสอบกับสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 ppm โดยที่เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) ในสภาวะปกติจะสามารถเร่งปฏิกิริยาให้อะซิติลไทโอคลอรีน (ACTI) เปลี่ยนเป็น ไทโอคลอรีน (Thiocholine) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารเอลมาน (DTNB) เปลี่ยนจากสารละลายใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลืองได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อสารละลายตัวอย่างมีสารกำจัดศัตรูพืชปนเปื้อนอยู่ เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) จะถูกยับยั้งและทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) ให้เป็นไทโอคลอรีน (Thiocholine) ได้น้อยลง ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารเอลมาน (DTNB) เปลี่ยนจากสารละลายใสให้กลายเป็นสารละลายสีเหลืองได้ช้าลงและมีความเข้มของสีลดลงตามปริมาณของสารกำจัดศัตรูพืชปนเปื้อนอยู่ที่มากขึ้นโดยความเข้มของสี ระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนสี และ ค่าสีแอลสตาร์ เอสตาร์ บีสตาร์ (L*a*b*) ที่แตกต่างกันจะถูกตรวจวัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดสีสเปกโตโฟโตมิเตอร์ คัลเลอร์ริมิเตอร์ (Spectrophotometer colorimeter) แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน จนนำไปสู่การพัฒนาทำเป็นเซนเซอร์เครื่องตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีน โดยการนำค่าสีแอลสตาร์ เอสตาร์ บีสตาร์ (L*a*b*) มาสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้นำไปเขียนโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์การปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีน โดยช่วยให้ทราบปริมาณการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในเบื้องต้น ซึ่งเป็นการช่วยลดความเสี่ยงของผู้บริโภคที่จะได้รับสารเคมีเหล่านี้จากการบริโภคผักและผลไม้

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีวัสดุและเซนเซอร์ที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการเตรียมสารละลายเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีนโดยใช้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ผักและผลไม้เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูกและผู้ส่งออกของไทยเป็นอย่างดี เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นฐานเศรษฐกิจมาจากประเทศเกษตรกรรมจากอดีตถึงปัจจุบัน

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ซึ่งเศรษฐกิจของประเทศไทยนั้นพึ่งพิงการส่งออกถึงร้อยละ 80 แสดงให้เห็นว่าการส่งออกของประเทศไทยได้รายได้ส่วนใหญ่จากการส่งออกและเป็นแหล่งรายได้ที่สำคัญในการสร้างความเติบโตทางเศรษฐกิจ ซึ่งการส่งออกผักและผลไม้มีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับ 2 ของประเทศรองจากสินค้าทางอุตสาหกรรม (ฝ่ายวิจัยเศรษฐกิจแห่งประเทศไทย, 2558) เนื่องจากผักและผลไม้ของประเทศไทยนั้นมีเอกลักษณ์และจุดเด่นคือกลิ่นหอมของผักและรสชาติที่หอมหวานของผลไม้จึงเป็นที่นิยมของชาวต่างชาติ

เกษตรกรจึงจำเป็นต้องแสวงหาวิธีการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเพื่อให้ได้ผลผลิตที่เพียงพอต่อความต้องการในประเทศและการส่งออก ดังนั้นการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชจึงเป็นทางเลือกที่เกษตรกรนำมาเลือกใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถลดจำนวนประชากรของแมลงได้อย่างรวดเร็ว เห็นผลได้ทันที และใช้ได้ทุกโอกาสที่ต้องการ จากข้อมูลของ กรมวิชาการการเกษตร ประเทศไทยได้มีการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเมื่อปี 2554 จำนวน 164,338,014.83 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ซึ่งสารเคมีกำจัดศัตรูพืชแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มคาร์บาเมต กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มออการ์โนคลอรีน และ สารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (อารยา, 2553)

สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamates) เป็นกลุ่มสารเคมีที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้ในการกำจัดศัตรูพืชตัวอย่างเช่น คาร์บาริล (Carbaryl) ออกฤทธิ์กำจัดแมลงศัตรูพืชได้อย่างกว้างขวาง ทั้งแมลงปากกัด ด้วง แมลงปากดูด พบมากใน ข้าว พริก แตงโม เป็นต้น ซึ่งผลกระทบการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มนี้ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอลีนเอสเตอเรส ทำให้ระบบประสาททำงานผิดปกติมี ระบบหลอดเลือดหัวใจ ระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ และการท างานของต่อมต่างๆในร่างกาย อาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ ตาพร่ามัว อ่อนเพลีย ปวดท้อง หากร่างกายได้รับในปริมาณ สูงเกินไป อาจมีผลให้เกิดอาการชักและเสียชีวิต (Gupta RC and Milatovic D, 2012)

สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออการ์โนคลอรีน (Organochlorine) ตัวอย่างเช่น พาราควอต (Paraquat) เป็นชื่อของสารเคมีกำจัดวัชพืช หรือยาฆ่าหญ้าที่เกษตรกรไทยนิยมใช้ เป็นยาเผาไหม้ออกฤทธิ์เร็ว ทำให้วัชพืชแห้งเหี่ยวและตายได้ภายใน 1-2 ชั่วโมง พบมากใน พริกแดง กระเพรา คะน้า ชะอม เป็นต้น กลไกของพาราควอตเมื่อเข้าไปทำลายร่างกายแล้ว สามารถทำลายอวัยวะต่าง ๆ ได้หมด กลุ่มอาการของโรคที่สารเคมีสะสมเป็นโรคที่รักษาไม่ได้ทั้งสิ้น เช่น โรคไต โรคมะเร็ง โรคตับ และโรคทางสมองที่รักษาไม่ได้ อีกทั้งยังปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้ ส่งผลไปถึงระบบนิเวศต่างๆ (ธันยพร, 2019)

เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสพบมากในเม็ดเลือดแดงและระบบประสาทเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์สารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งให้กลายเป็นโคลีนและอะซิเตต โดยสารสื่อประสาทชนิดนี้หากมีการสะสมบริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ประสาทจะกระตุ้นการทำงานของเซลล์ประสาทมากและนานกว่าปกติทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาททั้งระบบประสาทอัตโนมัติและระบบประสาทส่วนกลาง

เนื่องจากเอนไซม์มีความเฉพาะเจาะจงต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดไลซีสของโคลีนเอสเตอร์ ซึ่งเอนไซม์ประกอบด้วยบริเวณเร่ง (Active site) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ แอนนิออนิก (Anionic subsite) และ เอสเทอราติก

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

(Esteratic subsite) ซึ่งมีกรดอะมิโนชนิดเซรีนอยู่ สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตสามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสได้ ซึ่งกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตมีกลไกการยับยั้งแบบผันกลับได้ (Reversible) (Colovi และคณะ, 2013)

มีกลไกการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสโดยหมู่แทนที่คาร์บาเมตจะเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่ตำแหน่งเดียวกับที่ซับสเตรทเข้าทำปฏิกิริยา เรียกการยับยั้งแบบนี้ว่าการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) เนื่องจากตัวยับยั้งมีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรทจึงสามารถแย่งจับกับเอนไซม์ได้ การยับยั้งแบบนี้สามารถผันกลับได้เนื่องจากเมื่อตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์จะสร้างพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียรต่ำ (Carbamylated enzyme) ดังนั้นตัวยับยั้งสามารถหลุดจากเอนไซม์ได้ง่ายกว่ากลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตแต่ยากกว่าซับสเตรทและอัตราการเข้ายับยั้งเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวยับยั้งหรือสับสเตรท หากตัวใดมีความเข้มข้นมากกว่าก็จะเข้าจับกับเอนไซม์ได้ดีกว่า ซึ่งถ้าต้องการกำจัดตัวยับยั้งออกสามารถทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทให้สูงกว่าตัวยับยั้งเพื่อที่จะแย่งจับบริเวณเร่งและทำให้ตัวยับยั้งหลุดไปจากบริเวณเร่งได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างซับสเตรทและเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งคือสารสีฟ้าและถ้าเพิ่มความเข้มข้นของตัวยับยั้งให้สูงกว่าซับสเตรทก็จะไม่เกิดผลิตภัณฑ์ (ปราณี, 2556) ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุให้นำเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรสมาเป็นสารตั้งต้นในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีน

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (b*) กับเวลาที่ได้จาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) ที่เวลา 1-3 นาที

รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (a*) กับเวลาที่ได้จาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) ที่เวลา 1-3 นาที

รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (L*) กับเวลาที่ได้จาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) ที่เวลา 1-3 นาที

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

กรรมวิธีการเตรียมสารละลายเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีนโดยใช้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่หนึ่ง การเตรียมสารตั้งต้น

ก. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE)

เตรียมเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรต ความเข้มข้นร้อยละ 0.1996 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (Vortex Mixer) ความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ข. การเตรียมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine)

เตรียมความเข้มข้นอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) 0.0014 เปอร์เซ็นโดยมวล ในสารละลายสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็น ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที

ค. การเตรียมสารเอลมานรีเอเจ้นท์ (Ellman's reagent) (DTNB)

เตรียมความเข้มข้นเอลมานรีเอเจ้นท์ (DTNB) 0.3885 เปอร์เซ็นโดยมวล ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที

ขั้นตอนที่สอง การเตรียมสารกำจัดศัตรูพืช

ก. การเตรียมสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) 1 พีพีเอ็ม

ชั่งคาร์บาริลจำนวน 1 มิลลิกรัม ผสมลงกับสารละลายเอทานอล 95% จำนวน 1 ลิตร เพื่อใช้เป็นความสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม จากนั้นนำสารละลายคาร์บาริลมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1-0.9 พีพีเอ็ม

ข. การเตรียมสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) 1 พีพีเอ็ม

ชั่งดีดีทีจำนวน 1 มิลลิกรัม ผสมลงกับสารละลายเอทานอล 95% จำนวน 1 ลิตร เพื่อใช้เป็นความสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม จากนั้นนำสารละลายดีดีทีมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1-0.9 พีพีเอ็ม

ขั้นตอนที่สาม การทดสอบปฏิกิริยา การตรวจสอบ และการวิเคราะห์ผล

ก. นำเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) 30 ไมโครลิตรในฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากับสารละลายเอลมานรีเอเจ้นท์ (DTNB) จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาทีด้วยความเร็วรอบ 1800 รอบต่อนาที ต่อมาเติมเตรียมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 1800 รอบต่อนาทีและเริ่มวัดการเปลี่ยนแปลงสีทันทีทุกๆ 1 นาที จนครบ 10 นาที ด้วยเครื่องวัดสี (Spectrophotometer colorimeter) จากนั้นนำค่าที่ได้มาพล็อตเป็นกราฟมาตรฐาน

ข. นำสารละลายกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) ที่เตรียมไว้ความเข้มข้น 0.1 พีพีเอ็ม จำนวน 60 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) 30 ไมโครลิตรในฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 1800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอลมานรีเอเจ้นท์ (DTNB) จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันความเร็วรอบ 1800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมเตรียมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 1800 รอบต่อนาทีและเริ่มวัดการเปลี่ยนแปลงสีทันทีทุกๆ 1 นาที จนครบ 10 นาที ด้วยเครื่องวัดสี (Spectrophotometer colorimeter) จากนั้นนำค่าที่ได้มาพล็อตเป็นกราฟมาตรฐาน และทำซ้ำโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) 0.2 – 1 พีพีเอ็ม จนครบทุกความ

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

เข้มข้น จากนั้นนำผลการเปลี่ยนแปลงสีที่ได้จากเครื่องวัดสี (Spectrophotometer colorimeter) มาพล็อตกราฟมาตรฐาน

ค. นำสารละลายกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) ที่เตรียมไว้ความเข้มข้น 0.1 พีพีเอ็ม จำนวน 60 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) 30 ไมโครลิตรในฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 1800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอลมานรีเอเจ้นท์ (DTNB) จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันความเร็วรอบ 1800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมเตรียมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 1800 รอบต่อนาทีและเริ่มวัดการเปลี่ยนแปลงสีทันทีทุกๆ 1 นาที จนครบ 10 นาที ด้วยเครื่องวัดสี (Spectrophotometer colorimeter) จากนั้นนำค่าที่ได้มาพล็อตเป็นกราฟมาตรฐาน และทำซ้ำโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) 0.2 – 1 พีพีเอ็ม จนครบทุกความเข้มข้น จากนั้นนำผลการเปลี่ยนแปลงสีที่ได้จากเครื่องวัดสี (Spectrophotometer colorimeter) มาพล็อตกราฟมาตรฐาน

ตามรูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (b*) กับเวลาที่ได้จาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) ที่เวลา 1-3 นาที จะเห็นว่า เมื่อไม่มีสารละลายคาร์บาริลประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้นที่ 3 นาทีคือ -0.77 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.8207 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.2 ppm ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้นที่ 3 นาที คือ -0.88 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9129 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.6 ppm ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้นที่ 3 นาที คือ -1.11 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9973 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้นที่ 3 นาที คือ -1.28 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.972

รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (a*) กับเวลาที่ได้จาการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) ที่เวลา 1-3 นาที จะเห็นว่า เมื่อไม่มีสารละลายคาร์บาริลค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ -0.36 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9231 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.2 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ -0.26 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.4286 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความขเมข้น 0.6 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ -0.21 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.75 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ -0.21 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9643

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (L*) กับเวลาที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคาร์บาริลกับสารตั้งต้น เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE), สารละลายเอลมาน (DTNB) และ สารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) ที่เวลา 1-3 นาที จะเห็นว่า เมื่อไม่มีสารละลายคาร์บาริลค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ 32.63 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.9231 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 0.2 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ 31.42 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.794 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความขเมข้น 0.6 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ 30.75 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.25 เมื่อใส่สารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าการเปลี่ยนแปลงสีที่ 3 นาที คือ 30.85 ด้วยค่าความเชื่อมั่น 0.25

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (L*-a*-b*) ของความเข้มข้นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ในกลุ่มคาร์บาเมตที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) อะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) และเอลมานรีเอเจนท์ (DTNB) ระบบการวิเคราะห์ ซีไออี แอลสตาร์เอสตาร์บีสตาร์ (CIE L*a*b*) เป็นระบบการบรรยายสีแบบ 3 มิติ โดยที่แกน แอลสตาร์ (L*) จะบรรยายถึงความสว่าง (Lightness) จากค่า (+L*) แสดงถึงสีขาว จนไปถึง (-L*) แสดงถึง สีดำ แกน เอสตาร์ (a*) จะบรรยายถึงแกนสีจากเขียว (-a*) ไปจนถึงแดง (+a*) ส่วนแกน บีสตาร์ (b*) จะบรรยายถึงแกนสีจากน้ำเงิน (-b*) ไปเหลือง (+b*) ลักษณะการบรรยายสีเรียกว่า ฮัลเตอร์แลปสเกล (Hunter lab scale) ดังรูปที่ 1-3 จะเห็นว่า เมื่อนำค่าสีที่วัดด้วยเครื่องวัดสีมาเปรียบเทียบค่าสี (L*- a*-b*) ของแต่ละความเข้มข้นที่เวลาการทำปฏิกิริยา 1-3 นาที จะเห็นค่าสี (b*) ที่แตกต่างกันของสารละลายคาร์บาริลที่ความเข้มข้นคือ 0.0, 0.2, 0.6, 1.0 ppm โดยมีความผันแปรของค่าสี (b*) ตอบสนองที่สามารถอธิบายได้มีอยู่ในตัวแบบเชิงเส้น คือ 0.8207, 0.9129, 0.9973, 0.972 ตามลำดับ ซึ่งความแปรผันของค่าสี (b*) เป็นไปตามทฤษฎีการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสี ในส่วนของความผันแปรของค่าสี (L*) และ (a*) มีความแปรผันของค่าสีค่อนข้างมาก ค่าสี (L*) สามารถอธิบายความแปรผันได้มีอยู่ในตัวแบบเชิงเส้น คือ 0.9231 0.794 0.25 และ 0.25 ตามลำดับ ค่าสี (a*) สามารถอธิบายความแปรผันได้มีอยู่ในตัวแบบเชิงเส้น คือ 0.9231 0.4286 0.75 และ 0.9643 ตามลำดับ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของค่าสี (L*) และ ค่าสี (a*) ค่าของสีที่แสดงออกมานั้นไม่สอดคล้องกับการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงสี

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการเตรียมสารละลายเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีนโดยใช้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส มีขั้นตอนดังนี้

ก. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE)

เตรียมเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรต ความเข้มข้นร้อยละ 0.1996 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (Vortex Mixer) ความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที

ข. การเตรียมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine)

เตรียมความเข้มข้นอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) 0.0014 เปอร์เซ็นโดยมวล ในสารละลายสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็น ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที

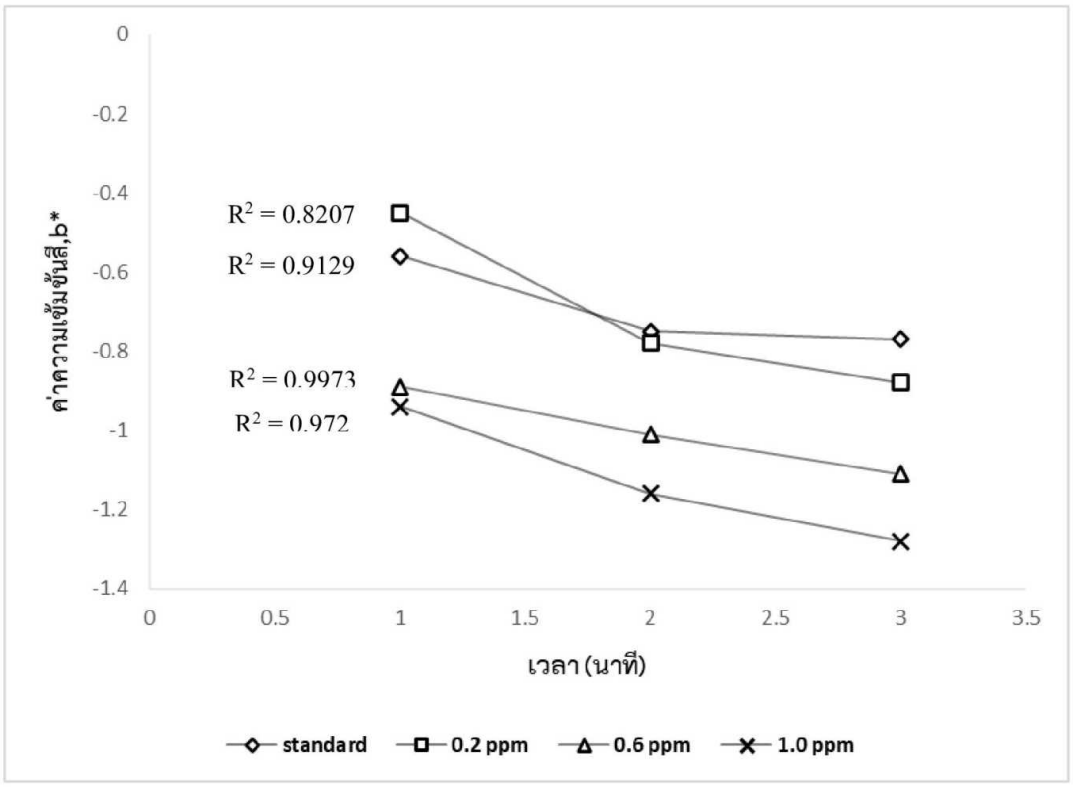
ค. การเตรียมสารเอลมานรีเอเจ้นท์ (Ellman's reagent) (DTNB)

เตรียมความเข้มข้นเอลมานรีเอเจ้นท์ (DTNB) 0.3885 เปอร์เซ็นโดยมวล ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที

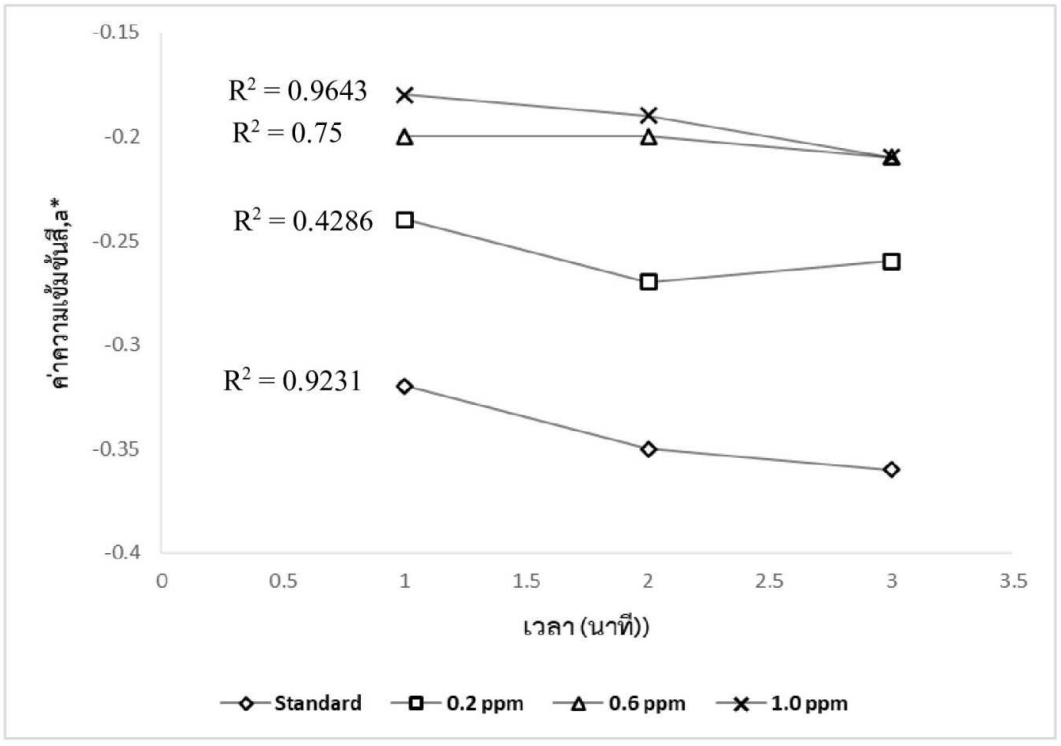
ORIGINAL

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA



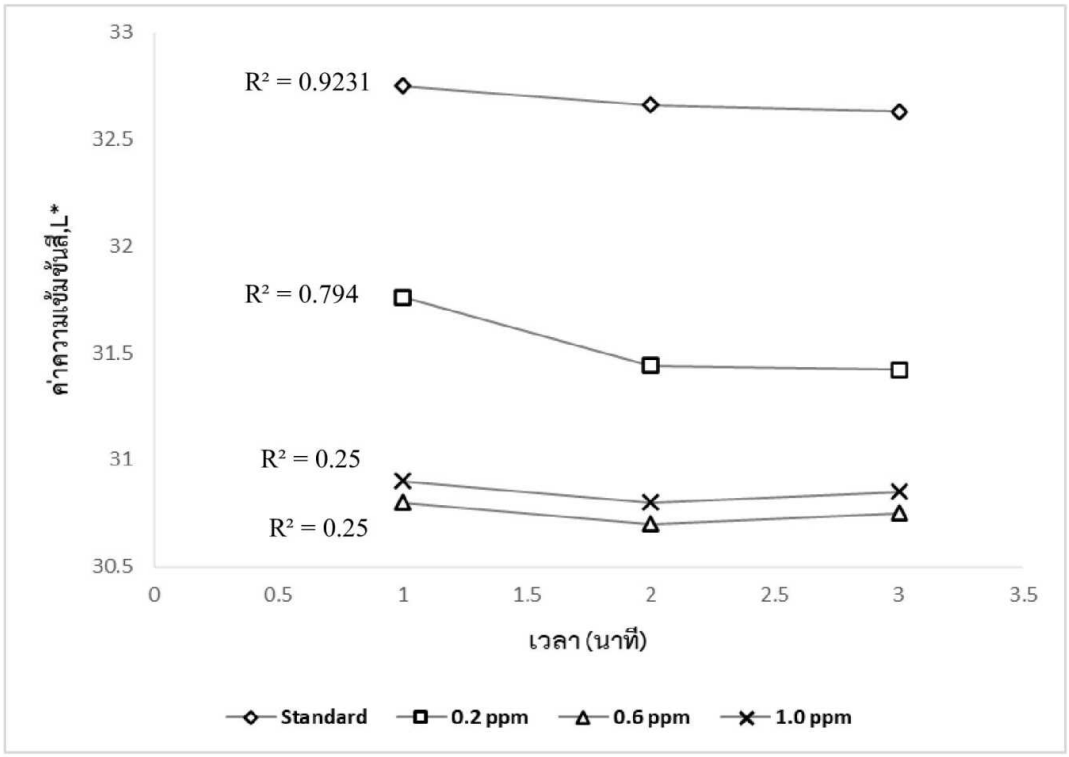
รูปที่ 1



รูปที่ 2

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA



รูปที่ 3

2568 01 30

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

บทสรุปการประดิษฐ์

กรรมวิธีการเตรียมสารละลายเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนคลอรีนโดยใช้เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส มีขั้นตอนดังนี้ การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรส (AChE) เตรียมเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเทอเรต ความเข้มข้นร้อยละ 0.1996 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (Vortex Mixer) จากนั้นการเตรียมสารละลายอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) เตรียมความเข้มข้นอะซิติลไทโอคลอรีน (Acetylcholine) 0.0014 เปอร์เซ็นโดยมวล ในสารละลายสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็น ผสมให้เข้ากัน และการเตรียมสารเอลมานรีเอเจ้นท์ (Ellman's reagent) (DTNB) เตรียมความเข้มข้นเอลมานรีเอเจ้นท์ (DTNB) 0.3885 เปอร์เซ็นโดยมวล ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากัน

NOT NO

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA