Simultaneous Enzyme Inhibitor Screening Assay Using Flow Injection Fluorimetry and Chemometrics

Supaporn Kownarumit[1] *James N. Miller*[2]

[1] Department of Science Service, Thailand, [2] Department of Chemistry, Loughborough University, UK

Abstract

This project has investigated simultaneous screening enzyme inhibitors using flow injection fluorescence spectroscopy and chemometric method to resolve fluorescence strongly overlapping spectra. The dual screening assay has been based on flow injection analysis methodology, with immobilized enzyme on solid phase reactors, i.e. alkaline protease and alkaline phosphatase respectively, to investigate enzyme inhibitors, namely 3-nitrophenylboronic acid and sodium orthovanadate. The excitation-emission fluorescence spectra are strongly overlapped, which do not permit their direct determination without previous separation by conventional methodologies. Here, a method is proposed for the determination of these chemicals by the use of a chemometric technique: a full-spectrum multivariate calibration method, partial least-squares (PLS-1). The experimental calibration set was designed with 13 samples. The concentrations were varied between 1-5 microgram per milliliter (μg/ml) for 3-nitrophenylboronic acid and 0.05-0.45 μg/ml for sodium orthovanadate. The emission fluorescence spectra were recorded between 495-594 nanometers, and analyzed with Unscrambler software, using PLS-1 and full cross validation. The correlation coefficients were 0.990833 for 3-nitrophenylboronic acid and 0.998771 for sodium orthovanadate. For external validation, another set of 10 samples was used. The satisfactory results were obtained. The actual and predicted were consistent for most of the mixtures tested. All the predicted concentrations were 98-103% and 93-105% for their actual concentrations for 3-nitrophenylboronic acid and sodium orthovanadate respectively.

Keywords : Chemometrics; enzyme inhibitors; flow injection analysis; fluorescence spectroscopy; PLS-1

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: supaporn_kow@hotmail.com, Tel. & Fax 0 2201 7219

การตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์เบื้องต้นอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เทคนิคโฟลอินเจ็กชันฟลูออริเมทรีร่วมกับคีโมเมตริกส์

สุภาพร โค้วนฤมิตร[1] James N. Miller[2]

[1] กรมวิทยาศาสตร์บริการ [2] Department of Chemistry, Loughborough University, UK

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาระบบการตรวจสอบเบื้องต้นของสารยับยั้งเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิดและโซเดียมออโธวานาเดตอย่างต่อเนื่องโดยใช้เทคนิคโฟลอินเจ็กชันฟลูออริเมทรี และคีโมเมตริกส์เพื่อแก้ปัญหาการเหลื่อมซ้อนกันอย่างมากของฟลูออเรสเซนซ์สเปคตรัม การทดสอบใช้เทคนิคโฟลอินเจ็กชันพร้อมด้วยรีแอคเตอร์ซึ่งมีสารของแข็งที่อิมโมบิไลซ์ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ อัลคาไลน์โปรตีเอสและอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสซึ่งต่อกันแบบอนุกรม สเปคตรัมที่ได้มีการเหลื่อมซ้อนกันอย่างมากซึ่งไม่สามารถทำการทดสอบได้โดยตรงด้วยวิธีปกติโดยปราศจากการทำการแยกสารก่อน แต่ในที่นี้สามารถแก้ปัญหาได้โดยใช้เทคนิคทางคีโมเมตริกส์เทคนิคหนึ่งซึ่งเป็นวิธีการเปรียบเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรที่ใช้ทั้งสเปคตรัมในการวิเคราะห์ทดสอบ ได้แก่ พาร์เชียลลีสสแคว์ (PLS-1) ชุดการเทียบมาตรฐานที่ใช้ประกอบด้วย 13 ตัวอย่าง ซึ่งมีความเข้มข้นของ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด ในช่วง 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโซเดียมออโธวานาเดต ในช่วง 0.05-0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบันทึกความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสเปคตรัมสารผสมในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 495-594 นาโนเมตร และวิเคราะห์ด้วยอันสแครมเบลอร์ซอร์ฟแวร์ โดยใช้ PLS-1 และ เทคนิคฟุลครอสวาลิเดชัน (FCV) ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) = 0.990833 และ 0.998771 สำหรับ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิดและโซเดียมออโธวานาเดต ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบการใช้ได้ของวิธีใช้ของผสมอีกชุดหนึ่ง จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ ค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริง โดยความเข้มข้นของค่าที่ทำนายได้อยู่ในช่วง 98-103% และ 93-105% ของความเข้มข้นจริงของ3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิดและโซเดียมออโธวานาเดต ตามลำดับ

คำสำคัญ : คีโมเมตริกส์ ตัวยับยั้งเอนไซม์ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลอินเจ็กชัน ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทสโคปี การถดถอยแบบพาเชียลเลสสแคว์

คำนำ

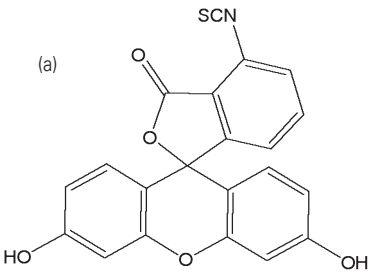
เทคนิคโฟลอินเจ็กชันฟลูออริเมทรีเป็นวิธีทดสอบที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในหลากหลายสาขาวิชา เช่น สิ่งแวดล้อม ชีวเคมี และยา เป็นต้น เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีสภาพไวสูง ปลอดภัย ง่ายต่อการใช้ ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และยังต่อพ่วงได้กับอีกหลายเทคนิค อย่างไรก็ตามสารที่ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้มักมีแถบสเปกตรัมที่ค่อนข้างกว้างจึงมีแนวโน้มที่จะซ้อนเหลื่อมกัน (overlapped) เมื่อวิเคราะห์หลายองค์ประกอบพร้อมๆ กัน ทำให้ต้องทำการแยกด้วยเทคนิคต่างๆ ก่อน หรืออาจต้องใช้วิธีที่เฉพาะเจาะจงสูงขึ้นทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น การทดสอบโดยทั่วไปเป็นการทดสอบเพียง 1 องค์ประกอบต่อ 1 การทดสอบแต่ในหลายๆ กรณี เช่น การตรวจสอบเบื้องต้นของยา (drug screening) เป็นต้น การทดสอบสาร 2 ตัว หรือ มากกว่าอย่างต่อเนื่องนับว่ามีข้อดีมากมายทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย วิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการแก้ไขปัญหาการทดสอบสเปคตรัมที่ซ้อนเหลื่อมและการทดสอบหลายองค์ประกอบอย่างต่อเนื่อง คือ การใช้เทคนิคหนึ่งของคีโมเมตริกส์ (Chemometrics) ได้แก่ เทคนิคการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร (Multivariate calibration) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการทำนายความเข้มข้นของสารได้น่าเชื่อถือและถูกต้องโดยปราศจากการใช้ทั้งความสูงของพีค และ

พื้นที่ของพีค [1] ปัจจุบันวิธีการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรจัดเป็นเทคนิคที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งในการหาความเข้มข้นของของผสมที่ซับซ้อนซึ่งมีสเปคตรัมของสารทดสอบในช่วงความยาวคลื่นใกล้เคียงกัน ซึ่งข้อดีหลักของเทคนิคนี้ คือ ทำให้การทดสอบเร็วขึ้นเนื่องจากไม่ต้องทำขั้นตอนการแยกของผสมก่อนทำการวิเคราะห์[2] การเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรมีมากมายหลายเทคนิค[3] PCR (Principal component regression) และ PLS (Partial least-squares regression) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในทางเคมีเภสัช การเกษตรและสิ่งแวดล้อม เป็นต้น เทคนิค PLS ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Wold[4] และต่อมามีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากมาย PLS นั้นต่างจาก PCR ตรงที่เป็นเทคนิคที่ใช้ทั้งข้อมูลของสเปคตรัมและข้อมูลความเข้มข้นในการวิเคราะห์ PLS มี 2 รูปแบบ คือ PLS-1 และ PLS-2 PLS-1 นั้นคล้ายกับPCR คือจะทำการคำนวณจำนวนของปัจจัยหลัก (Number of principal components or factors, PCs) ที่เหมาะสม เพียงองค์ประกอบเดียวในแต่ละครั้งของการคำนวณ แต่ PLS-2 จะใช้ทุกองค์ประกอบอย่างต่อเนื่อง PLS-1 และ PCR เป็นเทคนิคที่ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่[5,6] แต่การทดลองของ De Jong[7] และ Ragno[8] พบว่า PLS-1 ให้ผลการทำนายที่ดีกว่า PCR โดยเฉพาะในกรณีที่มีการซ้อนเหลื่อมของสเปคตรัมเป็นอย่างมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะใช้เฉพาะเทคนิค PLS-1 เท่านั้น วิธีการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรจะขึ้นอยู่กับคุณภาพของตัวอย่างและตัวแปรต่างๆ ที่ได้จากตัวอย่าง ดังนั้นจะต้องทำการแปรผลของกราฟเทียบมาตรฐานก่อนที่จะใช้ในการทำนายความเข้มข้นของสารทดสอบ การทดสอบการใช้ได้ของวิธี (Method validation) ถูกใช้เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของรูปแบบการเทียบมาตรฐาน (Calibration model) ถ้ารูปแบบของการใช้ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่อภาพแบบการเทียบมาตรฐาน แสดงว่าการทำนายที่เกิดขึ้นอาจไม่น่าเชื่อถือ และเพื่อทำให้ภาพแบบการเทียบมาตรฐานเหมาะสมต่อการทำนายก่อนที่จะใช้กราฟเทียบมาตรฐาน จะต้องทำการเลือกจำนวนของ PCs ที่เหมาะสม ตัวแปร (variables) ที่ใช้ และกำจัดตัวอย่างที่ไม่อยู่ในเกณฑ์ (outliers) ออกก่อน วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อประเมินค่าความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร ได้แก่ PLS-1 สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นของตัวยับยั้งเอนไซม์อย่างต่อเนื่องโดยเทคนิคโฟลอินเจ็กชันฟลูออริเมทรีโดยใช้อิมโมบิไลซ์เอนไซมรีแอคเตอร์

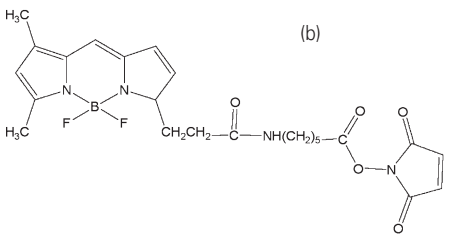
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมรีแอคเตอร์ ทำโดยอิมโมบิไลซ์-เอนไซม์ ได้แก่ อัลคาไลน์โปรตีเอส (Alkaline protease, AlkP) และ อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase, AP) บนสารพยุงชีวภาพเพียซอัลตร้าลิงค์ (Pierce UltraLink Biosupport medium) ตามคู่มือของทางบริษัท[9] และบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 3.0 x 2.5 เซนติเมตร

2. การเตรียมสารละลายตั้งต้น (substrates) ได้แก่ บอดีปีเอฟแอล-อัลฟาเคซีนคอนจูเกต (Bodipy FL-α-casein conjugates) และ ฟลูออเรสซีนไดฟอสเฟต (Fluorescein di-phosphate, FDP) ทำตามคู่มือของทางบริษัท[10,11] สารตั้งต้นทั้งคู่นี้ให้ฟลูออเรสเซนซ์ต่ำ แต่สามารถใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม ได้แก่ อัลคาไลน์โปรตีเอส และอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสม[12] ทำให้ได้สารบอดีปีเอฟแอล และฟลูออเรสซีนตามลำดับ ซึ่งเป็นสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์สูง สูตรโครงสร้างของสารฟลูออเรสซีน และบอดีปีเอฟแอล แสดงในภาพที่ 1 (a) และ (b) ตามลำดับ



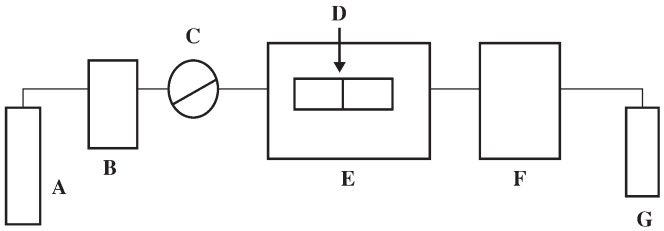
λ_{ex} = 494 nm, λ_{em} = 520 nm, MW = 389.4



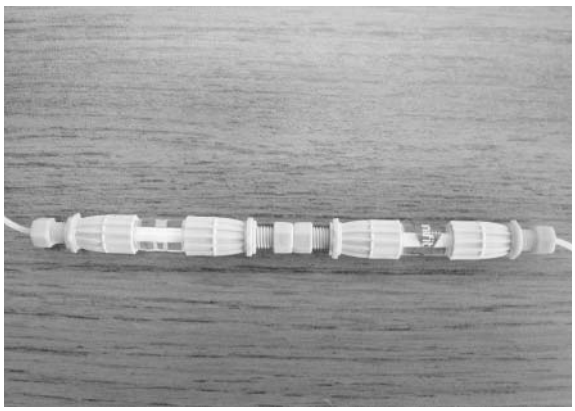
λ_{ex} = 504 nm, λ_{em} = 513 nm, MW = 502.32

ภาพที่ 1 โครงสร้างและคุณสมบัติของ ฟลูออเรสซีน (a) และบอดีปีเอฟแอล (b) 10

3. การวัดฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ฟลูออเรสเซนซ์สเปคโทมิเตอร์ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น F-4500 แถบความกว้างของ excitation และ emission = 10 นาโนเมตร ใช้ time scan mode ด้วยความยาวคลื่นของ excitation และ emission = 480 นาโนเมตร และ 514 นาโนเมตร ตามลำดับ แมนิโฟลด์สำหรับการตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์อย่างง่ายที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงในภาพที่ 2 คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิโมลาร์ ที่ความเป็นกรดเบส 8.5 ถูกปั๊มอย่างช้าๆ ด้วยอัตราเร็ว 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านรีแอคเตอร์ 2 ตัว คือ รีแอคเตอร์ที่มีสารที่อิมโมบิไลซ์ ด้วย AlkP และ รีแอคเตอร์ที่มีสารที่อิมโมบิไลซ์ ด้วย AP ตามลำดับ โดยต่อแบบอนุกรม (ภาพที่ 3) ซึ่งแช่อยู่ในอ่างของเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงแมนิโฟลด์สำหรับการตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์ด้วยโฟลอินเจ็กชัน A = บัฟเฟอร์, B = ปั๊ม, C = อินเจ็กชันวาล์ว, D = เอนไซม์รีแอกเตอร์, E = เครื่องอังน้ำควบคุมอุณหภูมิ, F = ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทมิเตอร์ และ G = สารละลายที่ต้องการทิ้ง



ภาพที่ 3 รีแอคเตอร์ที่อิมโมบิไลซ์ ด้วย AlkP และ AP ตามลำดับ ซึ่งต่อแบบอนุกรม

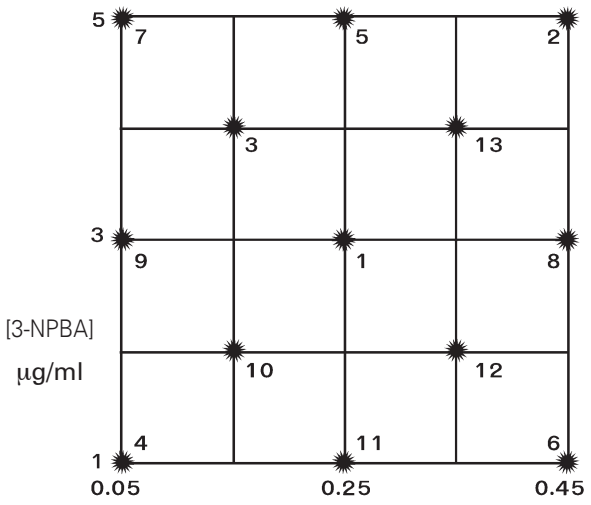
จากนั้นสารละลายที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยสารตั้งต้น 2 ตัว คือ บอดีปีเอฟแอล-อัลฟาเคซีนคอนจูเกต ที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ฟลูออเรสซีนไดฟอสเฟต ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารยับยั้งเอนไซม์ 2 ตัว คือ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกเอซิด (3-Nitrophenylboronic acid, 3-NPBA) ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ โซเดียมออโธวานาเดต (Sodium orthovanadate, VI) ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.05-0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารทั้ง 4 นี้จะถูกฉีดเข้าสู่ระบบผ่านอินเจ็กชันวาล์ว พร้อม sample loop ขนาด 50 ไมโครลิตร และตัวอย่างเหล่านี้จะไหลผ่านรีแอคเตอร์ทั้งสองไปยังฟลูออเรสเซนซ์ดีเทคเตอร์ หลังจากการฉีดสารละลาย เป็นเวลา 22 วินาที ทำการหยุดปั๊มด้วยมือ (manual) และบันทึกฟลูออเรสเซนซ์สเปคตรัมทั้งสเปคตรัม (495-594 นาโนเมตร) ข้อมูลของสเปคตรัมจะถูกบันทึกในภาพของ ASCII format แล้วจึงแปลงเป็นเอ็กเซลไฟล์ ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมอันสแครมเบลอร์ (Unscrambler) กราฟทั้งหมดที่ได้จากอันสแครมเบลอร์ซอร์ฟแวร์จะแสดงกราฟการเทียบมาตรฐานเป็นสีฟ้าและการทดสอบความใช้ได้ของกราฟจะเป็นสีชมพู ช่วงความเข้มข้นที่เลือกมานี้อยู่ในช่วงกราฟเทียบมาตรฐานที่เป็นเส้นตรง (Linear calibration range) ของสารผสมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ การหาความเหมาะสมของภาพแบบการเทียบมาตรฐานจะใช้เทคนิค PLS-1 และ FCV (Full cross validation) เพื่อวิเคราะห์สเปคตรัมของตัวอย่างและคำนวณความเข้มข้นของ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด และโซเดียมออโธวานาเดตในของผสม

ผลการทดลองและการวิจารณ์

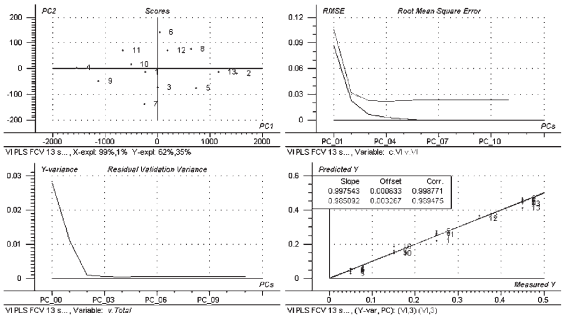
1. การจัดการข้อมูลสเปคตรัมด้วย PLS-1 องค์ประกอบของสารผสมในตัวอย่างของชุดการเทียบมาตรฐาน (calibration set) 13 ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 1 และไดอะแกรมของสารผสมแสดงในภาพที่ 4 PLS-1 เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์เพียง 1 องค์ประกอบในแต่ละครั้ง วิธีการเลือกจำนวนองค์ประกอบหรือปัจจัยหลัก (PCs) ที่เหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้ PLS-1 สามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง และเลือกได้หลายวิธี[13] แต่ในที่นี้จะใช้เพียงค่าความแปรปรวนของการใช้ได้ของ Y ที่คงเหลือ (Residual Y validation variance, RYVV) ในการพิจารณาจำนวนที่เหมาะสมของ PCs FCV เป็นเทคนิคที่เอาตัวสังเกตุออกทีละตัวและใช้ส่วนที่เหลือทำกราฟเทียบมาตรฐาน และทำอย่างนี้ไปจนครบทุกตัวสังเกต ในที่นี้ใช้ 13 สเปคตรัมเป็นชุดการเทียบมาตรฐาน ดังนั้น 12 สเปคตรัมจะถูกใช้เพื่อการทำกราฟเทียบมาตรฐานหรือใช้ในการทำนายความเข้มข้นโดยที่ความเข้มข้นของตัวทดสอบในตัวอย่างจะถูกเอาออก 1 ครั้ง เมื่อกราฟค่าการทำนายเทียบกับความเข้มข้นของการวัดสำหรับแต่ละองค์ประกอบ จะได้สกอร์กราฟ (Score plot) รูทมีนสแควร์ (Root mean square, RMSE) RYVV และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เพื่อแสดงถึงค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยในการวิเคราะห์และคุณภาพของความเหมาะสมของข้อมูลต่อเส้นตรงที่ถูกคำนวณโดยอันสแครมเบลอร์ซอร์ฟแวร์[14] ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของของผสมในตัวอย่างของชุดการเทียบมาตรฐาน

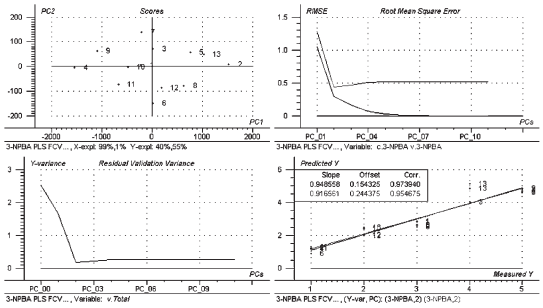
ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด, μg/ml	ความเข้มข้นของ โซเดียมออโธวานาเดต, ,μg/ml
1	3	0.25
2	5	0.45
3	4	0.15
4	1	0.05
5	5	0.25
6	1	0.45
7	5	0.05
8	3	0.45
9	3	0.05
10	2	0.15
11	1	0.25
12	2	0.35
13	4	0.35



◀ **ภาพที่ 4** ไดอะแกรมของสารผสมในชุดการเทียบมาตรฐานจากองค์ประกอบในตารางที่ 1



ภาพที่ 5 กราฟของชุดเทียบมาตรฐานของโซเดียมออโธวานาเดต จากการวิเคราะห์ด้วยอันสแครมเบลอร์โดยใช้ PLS-1 และ FCV

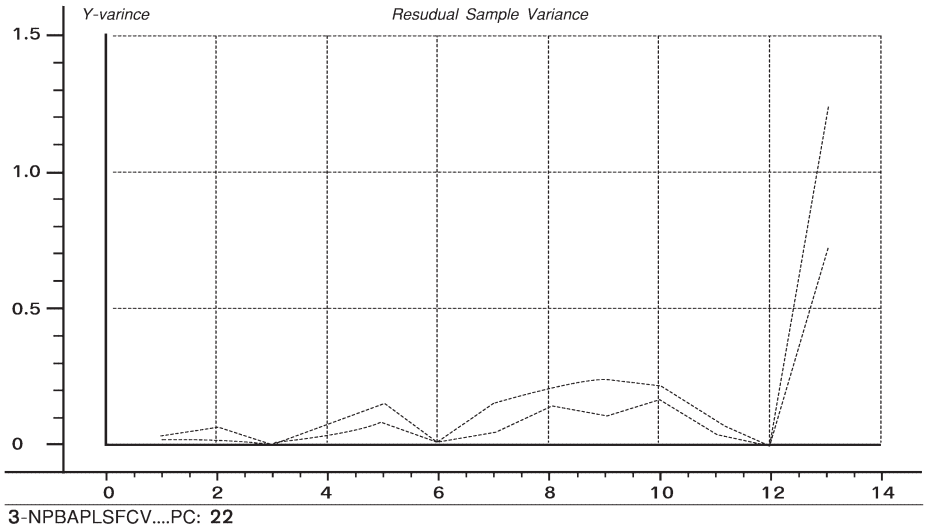


ภาพที่ 6 กราฟของชุดเทียบมาตรฐานของ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด จากการวิเคราะห์ด้วยอันสแครมเบลอร์โดยใช้ PLS-1 และ FCV

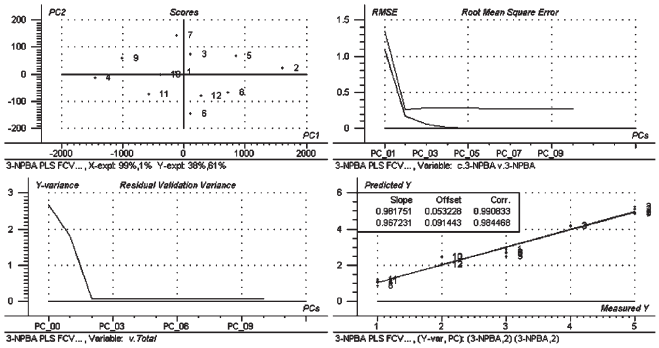
จากภาพที่ 5 สกอร์กราฟสำหรับชุดเทียบมาตรฐานของโซเดียมออโธวานาเดต โดยใช้PLS-1 และ FCV แสดงให้เห็นว่าข้อมูลทั้งหมดของตัวอย่างอยู่ในช่วงภาพแบบเฉลี่ยของข้อมูล X ค่า RYVV แสดง PCs เป็น 3 ดังนั้นจะใช้ค่านี้ในการทำนายต่อไป ค่า RMSE ที่ 3PCs นั้นค่อนข้างต่ำ (0.006 สำหรับ RMSE ของการเทียบมาตรฐาน, RMSEC และ 0.02 สำหรับ RMSE ของการตรวจสอบความใช้ได้, RMSEP) ส่วนค่า r = 0.998771 ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าชุดการเทียบมาตรฐานนี้ให้ภาพแบบ PLS-1 ที่ดี สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนการทำนายได้ อย่างไรก็ตาม ในภาพที่ 6 ได้ค่า r เพียง 0.973940 และค่า RMSE ก็ค่อนข้างสูง (0.29 สำหรับ RMSEC และ 0.44 สำหรับ RMSEP) และค่า RYVV ของตัวอย่างที่ 13 แตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 7) ดังนั้นตัวอย่างนี้จึงจัดเป็นตัวอย่างที่ไม่เข้าเกณฑ์ (outlier) จึงต้องกำจัดออกจากชุดเทียบมาตรฐานนี้ แล้วจึงทำการคำนวณอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งจากการคำนวณพบว่าได้ผลการทดสอบที่ดีขึ้นดังแสดงในภาพที่ 8 ค่า RYVV แสดงค่า PCs ที่เหมาะสม = 2 และ RMSE ที่ PCs = 2 ดีขึ้นมาก อีกทั้งค่า r สูงขึ้นด้วย (0.990833) จึงใช้ชุดเทียบมาตรฐานที่ปรับแล้วนี้ในการทำนายต่อไป

2. การทำนายและค่าการเบี่ยงเบน (Prediction and deviations)

เพื่อทดสอบความเหมาะสมและการใช้ได้ของวิธี จึงเตรียมของผสมจำนวน 10 ตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นของทั้ง 2 องค์ประกอบ (3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด และ โซเดียมออโธวานาเดต) ที่ความเข้มข้นระดับไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในระดับความเข้มข้นต่างๆ (แสดงในตารางที่ 2)



ภาพที่ 7 กราฟของความแปรปรวนของตัวอย่างที่คงเหลือสำหรับการตรวจสอบตัวอย่างที่ไม่เข้าเกณฑ์ของ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด



ภาพที่ 8 กราฟของชุดเทียบมาตรฐานที่ไม่มี outlier ของ 3-ไนโตร เฟนนิลโบโรนิกแอซิด จากการวิเคราะห์ด้วยอันสแครมเบลอร์

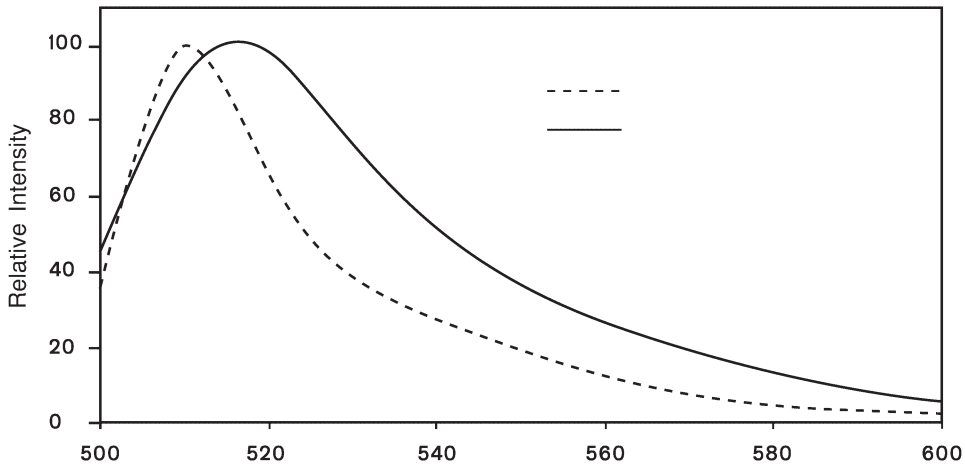
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารผสม (3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด, 3-NPBA และ โซเดียมออโธวานาเดต, VI) ที่ใช้ในชุดข้อมูลสำหรับการทำนาย

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ 3-NPBA, μg/ml	ความเข้มข้นของ VI, μg/ml
1	3	0.25
2	5	0.45
3	4	0.15
4	5	0.25
5	1	0.45
6	2	0.35
7	5	0.05
8	4	0.35
9	2	0.25
10	4	0.45

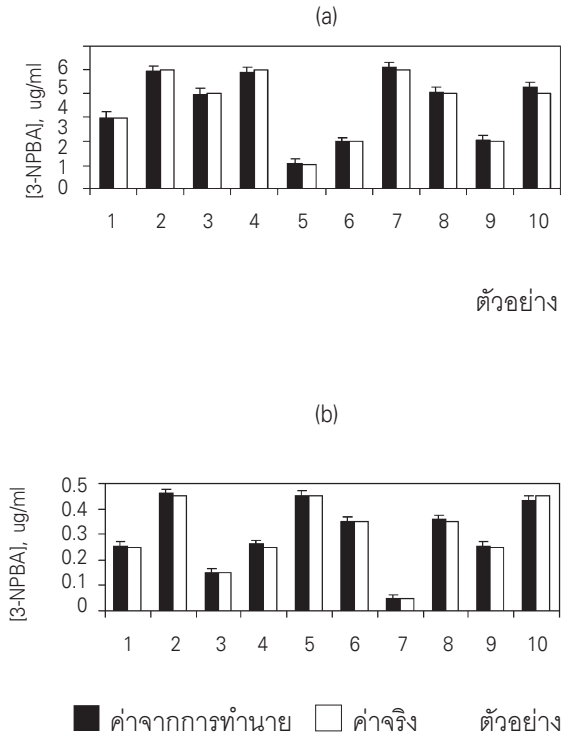
จากผลการทดลองในตารางที่ 3 และภาพที่ 10 จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกันเป็นอย่างมากกับค่าจริง โดยความเข้มข้นของค่าที่ทำนายได้อยู่ในช่วง 98-103% และ 93-105% ของความเข้มข้นจริงของ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด และโซเดียมออโธวานาเดต ตามลำดับ ค่าการเบี่ยงเบนอยู่ ในช่วง 10% สำหรับทั้ง 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด และโซเดียมออโธวานาเดต ยกเว้น ตัวอย่างที่ 5 (23%) สำหรับ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด และตัวอย่างที่ 7 (34%) สำหรับโซเดียมออโธวานาเดต ผลการทดลองที่ได้นับเป็นที่น่าพอใจเนื่องจากสเปคตรัมของบอดีปี และฟลูออเรสซีนมีการเหลื่อมซ้อนกันมาก (แสดงในภาพที่ 9) และวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ก็เพียงเพื่อการตรวจสอบเบื้องต้น (Screening) เท่านั้น

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ด้วยอันสแครมเบลอร์สำหรับ 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด (3-NPBA) และโซเดียมออโธวานาเดต (VI) ด้วย PLS-1 และ FCV

ตัวอย่าง	[ค่าจริง], μg/ml		[ค่าจากการทำนาย], μg/ml		% การเบี่ยงเบน		% Recovery	
	3-NPBA	VI	3-NPBA	VI	3-NPBA	VI	3-NPBA	VI
1	3.00	0.25	2.97	0.25	9.2	7.5	99.0	100.8
2	5.00	0.45	4.94	0.46	4.5	3.6	98.8	102.2
3	4.00	0.15	3.99	0.15	5.9	10.1	99.9	99.3
4	5.00	0.25	4.91	0.26	4.3	6.3	98.3	105.2
5	1.00	0.45	1.03	0.44	23.1	3.7	103.4	100.4
6	2.00	0.35	1.96	0.35	10.2	5.0	98.0	100.3
7	5.00	0.05	5.09	0.05	4.7	34.4	101.8	93.3
8	4.00	0.35	4.09	0.36	5.4	4.4	102.3	103.1
9	2.00	0.25	2.06	0.25	9.9	8.6	102.9	100.8
10	4.00	0.45	4.11	0.43	5.8	3.7	102.8	96.4



ภาพที่ 9 สเปกตรัมที่ซ้อนเหลื่อมกันของบอดีปีเอฟแอล และฟลูออเรสซีน



ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบผลการทำนายกับค่าจริง (a) 3-ไนโตรเฟนนิลโบโรนิกแอซิด และ (b) โซเดียมออโธวานาเดต

สรุป

ปัจจุบันคีโมเมตริกส์ได้ถูกพัฒนาทั้งทางทฤษฎีและเทคนิคการใช้อย่างกว้างขวางในหลายสาขา โดยเฉพาะเคมีวิเคราะห์[15-17] บ่อยครั้งที่ฟลูออเรสเซนซ์สเปคตรัมมีการซ้อนเหลื่อมกันเป็นอย่างมาก ทำให้ต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการแยกสารก่อนการทดสอบ แต่เทคนิคการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร เช่น PLS-1 ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ทั้งสเปคตรัมในการวิเคราะห์เป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถทำการทดสอบของผสมหลายองค์ประกอบอย่างต่อเนื่องโดยไม่จำเป็นต้องทำการแยกสารออกจากกันก่อน ระบบที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้เป็นรูปแบบที่ง่ายซึ่งสามารถจะพัฒนาได้อีกมากโดยใช้เครื่องมือที่เหมาะสม เช่น ระบบโฟลอินเจ็กชันอาจใช้ระบบอัตโนมัติแทนการใช้มือ ซึ่งจะช่วยลดความคลาดเคลื่อนของการทดสอบได้เนื่องจากการใช้ระบบการฉีดสารและการหยุดปั๊มแบบอัตโนมัติสามารถช่วยให้การจับ (capture) สเปคตรัมของสารผสมได้ถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามระบบการทดสอบเบื้องต้นของสารยับยั้งเอนไซม์อย่างต่อเนื่องโดยใช้โฟลอินเจ็กชันฟลูออริเมทรีและ PLS-1 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ และการทำนายให้ผลการทดลองที่ดี หากมีการพัฒนาและปรับปรุงต่อไปจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการทดสอบของผสมหลายองค์ประกอบที่มีการซ้อนเหลื่อมของสเปกตรัมสูง และสามารถนำไปพัฒนาในการตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับ drug candidates หรือขบวนการตรวจสอบเบื้องต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

(1) Brereton, R. G. 2000. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. Analyst 125: 2125-2154.

(2) Bautista, R. D., et al. 1996. Simultaneous spectrophotometric determination of drugs in pharmaceutical preparations using multiple linear regression and partial least-squares regression, calibration and prediction methods. Talanta 43: 2107-2115.

(3) Miller, J. N. a. M., J. C. 2000. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry; fourth ed.; Pearson Education Limited: Essex.

(4) Wold, H. 1985. Partial Least Squares. Encyclopedia of statistical Sciences, Vol. 6; Wiley: New York p 581-591.

(5) Thomas, E. V., and Haaland, D. M. 1990. Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis. Analytical Chemistry 62: 1091-1099.

(6) El-Gindy, A., Emara, S., and Mostafa, A. 2006. Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41: 421-430.

(7) De Jong, S. 1993. Short communication: PLS fits closer than PCR. Journal of Chemometrics 7: 551-557.

(8) Ragno, G., Loele, G., and Risoli, A. 2004. Multivariate calibration techniques applied to the spectrophotometric analysis of one-to-four component systems. Analytica Chimica Acta, 512: 173-180.

(9) PIECE Chemical Company. 1999. PIERCE Instructions: UltraLink™ Biosupport Medium.

(10) Molecular Probes Inc. Amines-reactive probes.[online] [cited date : 30 September 2002] Available from internet : www. probes.com.

(11) Molecular Probes Inc. 2002. Product information: alkaline and acid phosphatase substrates: FDP, MUP, DiFMUP and DDAO phosphate.

(12) Kownarumit, S. 2006. Multiplex screening using enzyme inhibition, fluorescence detection and chemometrics. In *Chemistry;* Loughborough University: Loughborough.

(13) Martens, H., and Naes, T. 1989. Multivariate Calibration; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester.

(14) CAMO ASA. 1998. User manual: The Unscrambler; CAMO ASA: Norway.

(15) Lavine, B. K., and Workman, J. Jr. 2002. Chemometrics. Analytical Chemistry. 74: 2763-2770.

(16) Mammarella, E. J.; Rubiolo, A. C. 2006. Predicting the packed-bed reactor performance with immobilized microbial lactase. Process Biochemistry 41: 1627-1636.

(17) Wang, Z. P., Shi, L. L., Chen, G. S., and Cheng, K. L. 2000. Multivariate spectrofluorimetry of ultra trace zirconium(IV) and hafnium(IV) assisted by several chemometrics methods. Talanta 51: 315-326.