

การพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์แบบรู้ผลรวดเร็ว
ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

วิมล แสงนาค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

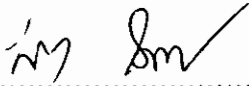
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2558

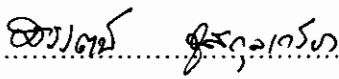
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

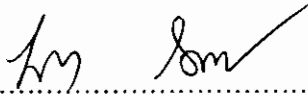
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ วิมล แสงนาค ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

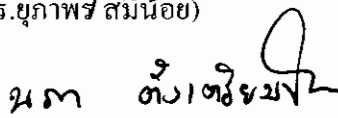
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

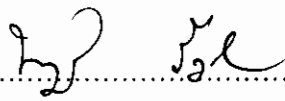

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร.ยuthaporn สมิน้อย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

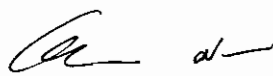

..... ประธาน
(ดร.ศิริรัตน์ ชุสกุลเกรียง)


..... กรรมการ
(ดร.ยuthaporn สมิน้อย)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น)


..... กรรมการ
(ดร.นวนศิชฎ์ รักษ์บำรุง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัต ศรีสุข)

วันที่ 31 เดือน

พ.ศ. 2558

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ 2558

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร. ยูภาพร สมีน้อย อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัยพร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติ วิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อวิเชียร แสงนาค คุณแม่สายทิพย์ กล้าศรี และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

วิมล แสงนาค

54990031: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ / ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ / วิธีดีพีพีเอช / อุปกรณ์ตรวจวัดแบบ

กระดาษ

วิมล แสงนาค : การพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์แบบรู้ผลรวดเร็วของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (DEVELOPMENT OF PAPER-BASED DPPH ASSAY FOR HIGH THROUGHPUT ANALYSIS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN FOODS AND NATURAL PRODUCTS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ยูภาพร สมีน้อย, Ph.D. 65 หน้า. ปี พ.ศ. 2558.

งานวิจัยนี้พัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบรู้ผลรวดเร็ว สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการเคลือบด้วยพลาสติกให้มีบริเวณตรวจวัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร การวิเคราะห์ทำได้โดยหยดสารละลายดีพีพีเอชในเอทานอล 0.5 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ 0.5 ไมโครลิตร ปล่อยให้ทำปฏิกิริยากันในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มสีม่วงของดีพีพีเอชที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง เริ่มต้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ได้แก่ ความเข้มข้นของดีพีพีเอชเริ่มต้น และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน กรดแกลลิก โทรลิกอิก จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของดีพีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ และเวลาที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างดีพีพีเอชและสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเท่ากับ 30 นาที จากนั้นศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง ความสามารถในการทำซ้ำ และขีดจำกัดการตรวจวัด ของการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นในสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน กรดแกลลิก โทรลิกอิก กรดคาร์แพอิก เควอซิทินและกรดแอสคอร์บิก สุดท้ายทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยการศึกษากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาทั้ง 9 ชนิดเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิม พบว่าค่าสมมูลกรดแกลลิก ที่วิเคราะห์ได้ทั้งสองวิธี มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95

54990031: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)

KEYWORDS: ANTIOXIDANTS / ANTIOXIDANT ACTIVITY / DPPH ASSAY / PAPER –
BASED DEVICE

WIMON SANGNAK: DEVELOPMENT OF PAPER-BASED DPPH ASSAY FOR HIGH THROUGHPUT ANALYSIS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN FOODS AND NATURAL PRODUCTS. ADVISORY COMMITTEE: YUPAPORN SAMEENOI, Ph.D. 65 P. 2015.

This research focused on the development of DPPH paper-based assay for high throughput analysis of antioxidant activity. The paper-based device was fabricated using lamination method to create a 5 mm diameter circular test zone. The analysis was carried out by depositing 0.5 μ L of DPPH in ethanol solution followed by dropping 0.5 μ L antioxidant sample onto the test zone. The mixture was allowed to react in the dark for 30 min and the remaining violet color intensity of DPPH was measured using imaging software. Firstly, parameters affecting the analysis were optimized including DPPH starting concentration and reaction time for the analysis of gallic acid and trolox antioxidant standards. Optimal DPPH starting amount was 1.5 mM and the optimal reaction time of DPPH and antioxidant standards on the paper-based device was 30 min. Analytical features including linear range, reproducibility and limit of detection were then studied for the analysis of antioxidant standards including gallic acid, trolox, caffeic acid, quercetin and L-ascorbic acid using the developed device. Finally, the performance of the developed paper-based device was validated against the traditional spectrophotometric DPPH assay by analyzing antioxidant activity of 9 tea samples and the results showed no significant difference for gallic acid equivalent obtained from the two methods at 95% confidence level.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ.....	5
Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay	7
อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (Paper based device).....	8
ข้อมูลเกี่ยวกับใบชาแห้ง.....	9
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี.....	16
แผนการดำเนินการวิจัย.....	17
การเตรียมสารละลาย.....	18
การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	19
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	20
การวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ.....	24
4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	28
การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสม.....	28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid และ trolox	29
ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (Analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน	30
การวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ (ใบชาแห้ง) ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและวิธี DPPH แบบดั้งเดิม.....	40
5 สรุปผลการวิจัย.....	44
บรรณานุกรม.....	46
ภาคผนวก.....	49
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของยอดใบแห้งชา	10
4-1 ค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ดีพีพีเอชแบบกระดาษ.....	40
4-2 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ช่วงความเข้มข้น 0.1-4.0 mM บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ(paper-based assay).....	50
4-3 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay).....	50
4-4 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid (n=10).....	51
4-5 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid (n=3).....	51
4-6 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay).....	52
4-7 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox (n=10).....	53
4-8 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox (n=3).....	53
4-9 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ caffeic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay).....	53
4-10 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid (n=10).....	54
4-11 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid (n=3).....	54
4-12 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay).....	55
4-13 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin (n=10).....	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4-14 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin (n=3).....	56
4-15 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay).....	56
4-16 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำ ของสารต้านอนุมูลอิสระ L-ascorbic acid (n=10).....	57
4-17 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระ L-ascorbic acid (n=3).....	57
4-18 แสดงชื่อตัวอย่างชาที่นำมาใช้วิเคราะห์.....	58
4-19 แสดงค่า Average \pm SD ของการวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ(ใบชาแห้ง) ด้วยวิธี spectrophotometric DPPH assay และวิธี paper-based DPPH assay.....	58

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1-1	แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	4
2-1	แสดงรูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ที่สร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ลงบนกระดาษ.....	9
2-2	แสดงลักษณะขดใบชาและ ใบชาแห้ง.....	11
2-3	แสดงโครงสร้างของคาเทชินที่พบในใบชา.....	11
2-4	แสดงรูปร่างของกระดาษกรองที่ตรึงด้วยสารรีเอเจนต์และการใช้อุปกรณ์ microtiter plate ที่ทำงานร่วมกับกระดาษในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของ Gallic acid ด้วย DPPH assay.....	13
2-5	แสดงกราฟมาตรฐานแสดงที่ได้จากการพล็อตความเข้มสีของอนุภาคนาโนซีเรีย ที่เปลี่ยนไปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ gallic acid (GA) และepigallocatechin gallate(EGCG).....	14
3-1	แสดงแผนผังขั้นตอนการทำวิจัย.....	17
3-2	แสดงการเตรียมกระดาษกรองและแผ่นพลาสติกเคลือบบัตร.....	19
3-3	แสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	19
3-4	แสดงการเปิดโปรแกรม ImageJ.....	24
3-5	แสดงการ Set scale ของบริเวณที่ตรวจวัดในโปรแกรม ImageJ.....	25
3-6	แสดงการปรับสีใน โปรแกรม ImageJ.....	25
3-7	แสดงการปรับเป็นสี gray ใน โปรแกรม ImageJ.....	26
3-8	แสดงการปรับเป็น gray intensity ใน โปรแกรม ImageJ.....	26
3-9	แสดงการ set measurements ใน โปรแกรม ImageJ.....	27
3-10	แสดงการ Analyze Measurement ใน โปรแกรม ImageJ.....	27
4-1	แสดงสีของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆและกราฟพลอต ระหว่างค่าความเข้มสีและความเข้มข้นของสารละลาย DPPH (n=3).....	28
4-2	แสดงการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ระหว่าง DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid (n=3) และ trolox (n=3).....	29

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-3	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ gallic acid.....	31
4-4	แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 30 นาทีและค่าความเข้มสี (color intensity)หลังจากการทำปฏิกิริยา ระหว่างสารละลาย DPPH กับ gallic acidความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 30นาที (n=3).....	31
4-5	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ trolox.....	32
4-6	แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ trolox ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 30 นาทีและค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยา ระหว่างสารละลาย DPPH กับ trolox ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 30นาที (n=3)...	33
4-7	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ caffeic acid.....	34
4-8	แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ caffeic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 30 นาทีและค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยา ระหว่างสารละลาย DPPH กับ caffeic acid ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 30นาที (n=3).....	35
4-9	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ quercetin.....	36
4-10	แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ quercetin ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 30 นาทีและค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยา ระหว่างสารละลาย DPPH กับ quercetin ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 30นาที (n=3).....	37
4-11	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ L-ascorbic acid.....	38
4-12	แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ L-ascorbic acid ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 30 นาทีและค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับ L-ascorbic acid ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 30นาที (n=3).....	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-13 แสดงแผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา sample 1-9 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay).....	41
4-14 แสดงกราฟ linear regression แสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา sample 1-9 ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay).....	42
4-15 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 500 – 520 nm.....	61
4-16 แสดงกราฟมาตรฐาน gallic acid ของวิธี spectrophotometric assay.....	62
4-17 แสดงกราฟมาตรฐาน gallic acid ของวิธี paper-based DPPH assay.....	63

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล พบในสิ่งแวดล้อม เช่น บรรยากาศ คาร์บอนหรือไนโตรเจนในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา เมื่ออยู่ในร่างกายสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทำให้เกิดความเสียหายแก่โมเลกุลที่ได้รับผลกระทบ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคความจำเสื่อม เป็นต้น ถ้าอนุมูลอิสระปนเปื้อนอยู่ในอาหาร จะทำให้อาหารมีกลิ่น สีและรสชาติเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันในอาหารได้

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารพวกเอนไซม์หรือสารอื่นที่สามารถชะลอหรือทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาถูกใช้ไม่ให้ดำเนินต่อไป โดยปกติแล้วในร่างกายของคนเราจะสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะสมดุล แต่ถ้าร่างกายอยู่ในพื้นที่ที่เสี่ยงจะทำให้ร่างกายผลิตอนุมูลอิสระมากเกินไป เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ผู้ที่อยู่ในภาวะเสี่ยงจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกเข้าไปด้วยเป็นประจำ ซึ่งสารดังกล่าวอยู่ใน ผัก ผลไม้และสมุนไพร นอกจากนี้ทางด้านเศรษฐกิจ ธุรกิจส่งออกอาหารได้นำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในการชะลอการเน่าเสียของอาหาร ด้วยเหตุนี้สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นข้อมูลแก่ผู้บริโภค อุตสาหกรรมเกี่ยวกับการผลิตยารักษาโรคและธุรกิจส่งออกอาหาร

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยการทำให้เกิดสี โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง HPLC ส่วนวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณที่นิยม ได้แก่ วิธี FRAP assay, วิธี ABTS radical cation decolorization assay และ วิธี DPPH radical

scavenging assay ซึ่งวิธี DPPH radical scavenging assay เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สามารถรู้ผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเกี่ยวข้องกับ DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเท่านั้น

วิธี DPPH radical scavenging assay แบบดั้งเดิม เป็นการทดสอบโดยใช้สารอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•], 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสีม่วงทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในสารละลายเอทานอล เป็นระยะเวลาประมาณ 30 นาที สีม่วงของดีพีพีเอชจะจางลง ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยวัดสีที่จางลงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธี DPPH radical scavenging assay แบบดั้งเดิมคือ ต้องใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ปริมาณมากในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่าง และใช้เวลานานในการวิเคราะห์

ต่อมาได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยการวิเคราะห์บนถาดหลุม (96 well microtiter plate) โดยใส่สารละลายดีพีพีเอชผสมกับตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระบนถาดแล้วใช้เครื่อง microplate reader spectrophotometer วิเคราะห์สีที่จางลงของสารละลายดีพีพีเอช ซึ่งสามารถวิเคราะห์ครั้งเดียวได้หลายตัวอย่าง แต่เครื่อง microplate reader spectrophotometer เป็นเครื่องมือเฉพาะ มีราคาแพง และผู้ใช้ต้องมีความรู้ในการใช้

เทคโนโลยีของไหลจุลภาค (microfluidic technology) เป็นเทคโนโลยีที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชิงชีวเคมี หรือทางการแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากมีข้อดีคือใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์ในปริมาณต่ำ ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์สั้น อีกทั้ง ณ ปัจจุบัน กระดาษกรอง (filter paper) เป็นวัสดุที่ได้รับความนิยมในการนำมาสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาค เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีราคาถูก

ในงานวิจัยนี้จะได้พัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อวิเคราะห์แบบรู้ผลเร็วของความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่สนใจ โดยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีคุณสมบัติ ได้แก่ ทดสอบตัวอย่างได้หลายๆตัวอย่างในคราวเดียวกัน ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย ใช้เวลาการวิเคราะห์น้อย มีค่าการวิเคราะห์ถูก และใช้เครื่องมือการตรวจวัดสัญญาณที่ไม่แพง อีกทั้งให้ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่สนใจ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. พัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (gallic acid , trolox, caffeic acid, quercetin และ L-ascorbic acid) โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สภาวะที่ศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของ DPPH เริ่มต้นที่เหมาะสม เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระ (gallic Acid และ trolox) ที่เหมาะสม โดยสภาวะที่ดีจะต้องสามารถตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้รวดเร็ว แม่นยำ มีความไวสูง และมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่รวดเร็ว

3. ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ที่พัฒนาขึ้นด้วยสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (gallic acid , trolox, caffeic acid, quercetin และ L-ascorbic acid) โดยหาค่าการวิเคราะห์ (analytical feature) ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility, %RSD) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection)

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพความสามารถในการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติระหว่างวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น กับวิธีดีพีพีเอชแบบดั้งเดิม โดยใช้ตัวอย่างใบชาแห้ง

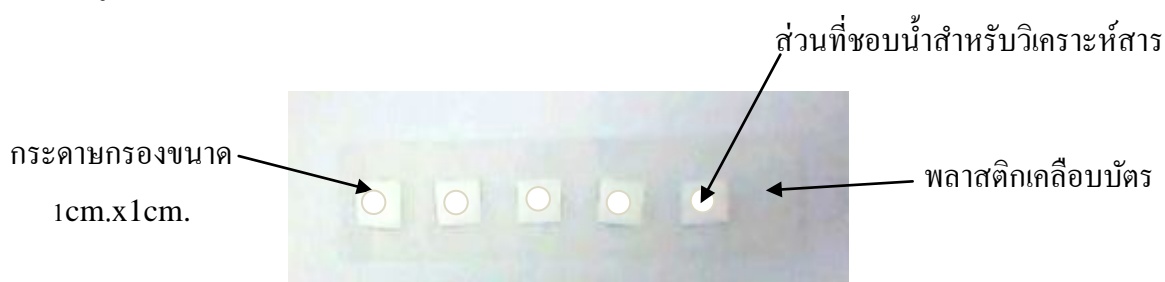
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. วิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เป็นประโยชน์แก่หน่วยงานที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ค้นพบ เพื่อนำไปรักษาสภาพผักผลไม้ที่ส่งออก

2. วิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เป็นประโยชน์แก่ประชาชนที่ต้องการทราบถึงคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในผักและผลไม้ทั่วไป

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. วิธีดีพีพีเอช (DPPH assay) หมายถึง วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งใช้รีเอเจนต์ คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
2. Intensity หมายถึง ค่าความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์ใน โปรแกรม ImageJ
3. อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (A microfluidic paper-based analytical device, microPAD) หมายถึง ตัวตรวจวัดของไหลจุลภาคที่ทำมาจากกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 สร้างบริเวณส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ด้วยการตัดกระดาษกรองขนาด 1 cm. x 1 cm. และเคลือบกระดาษกรองดังกล่าวด้วยพลาสติกเคลือบบัตรที่มีการเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm. ไว้สำหรับการวิเคราะห์สาร



ภาพที่ 1-1 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาประกอบการดำเนินการตามลำดับดังนี้

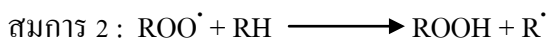
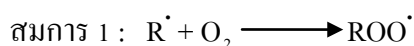
- 2.1 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ
- 2.2 Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay
- 2.3 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (Paper based device)
- 2.4 ข้อมูลเกี่ยวกับไบซาแห้ง
- 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

บุหรัน พันธุ์สุวรรณ (2556, หน้า 277-279) ได้กล่าวถึงอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระไว้ดังนี้

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา

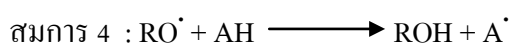
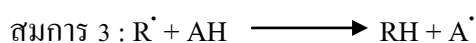
ดังสมการ 1 และ 2



นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภททั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคกล้ามเนื้อ

อีกเสบ เป็นต้น อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ เป็นต้น จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น คาร์บอนหรือแก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนโตรไดออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้ซ้ำ การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียมไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่างจากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารที่มีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์ อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ(radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ 3 และ 4



โดย R^{\cdot} และ RO^{\cdot} คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propylgallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylated hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆ

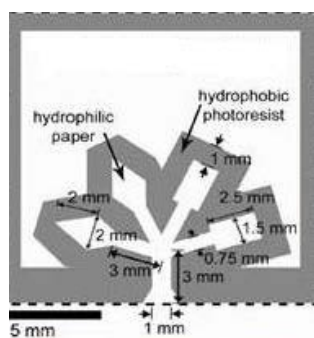
ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น vitamin C (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไฮโดรพลาซึม) vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และ glutathione (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไฮโดรพลาซึมและเมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathionereductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxid dismutase(SOD) สามารถเปลี่ยน O_2^- เป็น H_2O_2 สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ได้แก่ carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์

ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และอีกส่วนได้จากสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายรับประทานเข้าไปจำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวได้จากพืชผักและผลไม้ ตัวอย่างอาหารที่มีเบต้าแคโรทีนสูง ได้แก่ ผักใบเขียว เช่น ตำลึง และผักนึ่ง อาหารที่มีสีเหลือง เช่น แครอท มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ พริกทอง อาหารที่มีวิตามินซี (vitamin C หรือ ascorbic acid) สูง ได้แก่ พืชผักสีเขียว และผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ตำลึง ผักนึ่ง พริกหยวก ฝรั่ง มะขามป้อม ส้ม มะนาว สับปะรด (วิตามินซีจากพืชผักดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระที่แรงมากและละลายน้ำได้ดี) วิตามินอี (vitamin E หรือ tocopherol) ละลายได้ดีในน้ำมัน โดยวิตามินอีมีในน้ำมันจากเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ เช่น รำละเอียดในพวกธัญพืชที่ไม่ขัดขาว ข้าวโพด ข้าวกล้อง ถั่วแดง ถั่วเหลือง ผักกาดหอม เมล็ดทานตะวัน งา น้ำมันรำ

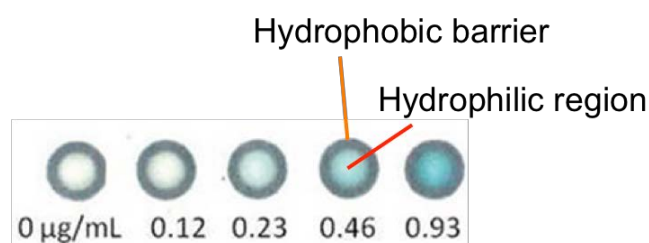
2.2 Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้อนุมูลอิสระดีฟิพีเอซ (DPPH[•], diphenylpicrylhydrazyl radical) (Pisoschi และ Negulescu ; 2011) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (สารที่ให้อิเล็กตรอน) DPPH จะกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ซึ่งจะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ดังสมการ 5

ในปัจจุบันอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำให้เป็นลวดลายต่าง ๆ ได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น การฉายแสง (photolithography) (Martine et al., 2008) การพิมพ์ด้วยไข (wax printing) (Carrilho et al., 2009) การวาดด้วยปากกาคันน้ำ (permanent marker plotting) (Jana et al., 2012) การฉาบเคลือบ (screen-printing) (Dungchai et al., 2011) และการใช้มีดตัด (cutting knives) (Fenton et al., 2009) เป็นต้น รูปแบบลวดลายของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีอยู่สองแบบ ได้แก่ แบบช่องการไหลด้านข้าง (lateral flow) ดังภาพที่ 2-1 (A) ซึ่งสารตัวอย่างสามารถไหลไปบนแผ่นกระดาษในท่อการไหลด้วยแรงแคปิลลารี (capillary action) เรียงตามเยื่อกระดาษไปยังบริเวณตรวจวัด (test zone) แล้วเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับรีเอเจนต์และแบบหลุม (well) (Lisowski & Zarzycki, 2012) ดังภาพที่ 2-1(B) วิเคราะห์ได้โดยการนำสารตัวอย่างผสมกับรีเอเจนต์หยดลงไปบริเวณที่ชอบน้ำของกระดาษ การวิเคราะห์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารตัวอย่างกับรีเอเจนต์ สามารถทำได้โดยการถ่ายภาพ จากนั้นนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ แล้ววัดค่าความเข้มสี ซึ่งค่าความเข้มสีจะแปรผันตรงกับปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง



(A)



(B)

ภาพที่ 2-1 แสดงรูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ลงบนกระดาษ (A) แบบช่องการไหลด้านข้าง (lateral flow) (B) แบบหลุม (well) (Jokerst et al., 2012)

2.4 ข้อมูลเกี่ยวกับใบชาแห้ง

พัชรีย์ พริบตีเวช (2552) ได้กล่าวถึงชาเกี่ยวกับลักษณะทั่วไป และสรรพคุณไว้ดังนี้ ชามีชื่อสามัญ คือ Tea ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Camellia sinensis* ชาแบ่งได้เป็น 6 ประเภท ได้แก่ ชาขาว ชาเหลือง ชาเขียว ชาอูหลง ชาดำ และชาผูเออร์ แต่ที่พบเห็นได้ทั่วไป ได้แก่ ชาขาว ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ ซึ่งชาทุกชนิดสามารถทำได้จากต้นชาต้นเดียวกัน แต่ผ่านกรรมวิธีแตกต่างกันออกไป องค์ประกอบทางเคมีในยอดใบชาสดจะประกอบด้วยความชื้นประมาณ 75-80 % ส่วนที่

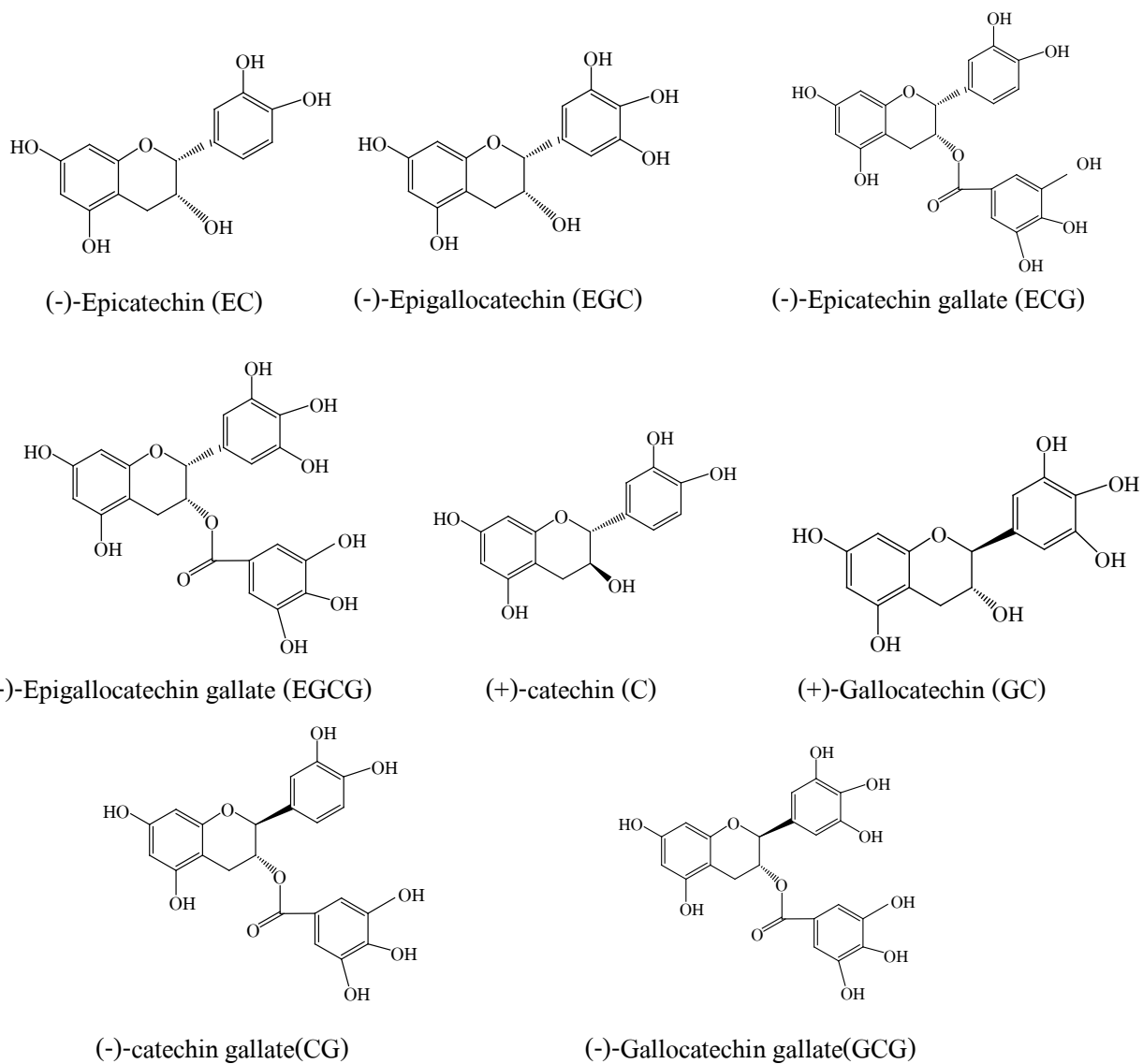
เหลือเป็นของแข็งทั้งหมด องค์ประกอบทางเคมีในส่วนที่เป็นของแข็งทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 2-1 ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะส่งผลต่อคุณภาพของชา

ตารางที่ 2-1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของยอดใบแห้งชา

Components	Dry weight (%)
Flavanois	18-32
(-)-EGCG	9-14
(-)-EGC	4-7
(-)-ECG	2-4
(-)-EC	1-3
(+)-GC	1-2
(+)-C	0.5-1
Flavonal glucosides	3-4
Proanthocyanidins	2-3
Caffeine	3-4
Amino acids	2-4
Carbohydrates	3-5
Organic acids	0.5-2
Saponins	0.04-0.07
Pigments	0.5-0.8
Vitamins	0.6-1.0
Soluble minerals	2-4
Cellulose	6-8
Lignin	4-6
Polysaccharides	4-10
Lipids	2-4
Volatiles	0.01-0.02



ภาพที่ 2-2 แสดงลักษณะยอดใบชาและ ใบชาแห้ง (<http://www.icontea.com/article-49.html>)



ภาพที่ 2-3 แสดง โครงสร้างของคาเทชินที่พบในใบชา

ในยอดใบชาจะมีปริมาณโพลีฟีนอล (polyphenols) ทั้งหมดประมาณ 10-35% (dry weight) โดยสารประกอบโพลีฟีนอลนี้ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ฟลาโวนอยด์เป็น secondary metabolite ที่แบ่งได้ 6 กลุ่มคือ Flavones, flavanones, isoflavones, flavonols, flavanols และ anthocyanins กลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่พบมากที่สุดชนิดในชาคือ Flavanols ซึ่งเรียกว่า Catechins (คาเทชิน)

คาเทชิน (Catechins) เป็นชื่อเรียก Flavanols ในชา ซึ่งมีประมาณ 60-70% ของโพลีฟีนอลทั้งหมด กลุ่มของ Catechins ที่พบมากในชา ได้แก่ (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-Epicatechin (EC) โดย Catechins เหล่านี้มีอยู่ประมาณ 90% ของคาเทชินทั้งหมด กลุ่มของ Catechins ที่พบในปริมาณน้อยลงมาได้แก่ (-)-Gallocatechin (GC), (+)-Catechin (C), (-)-Gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-Catechin gallate (CG) คาเทชินเป็นสารไม่มีสี ละลายน้ำได้ ให้รสขม และฝาด

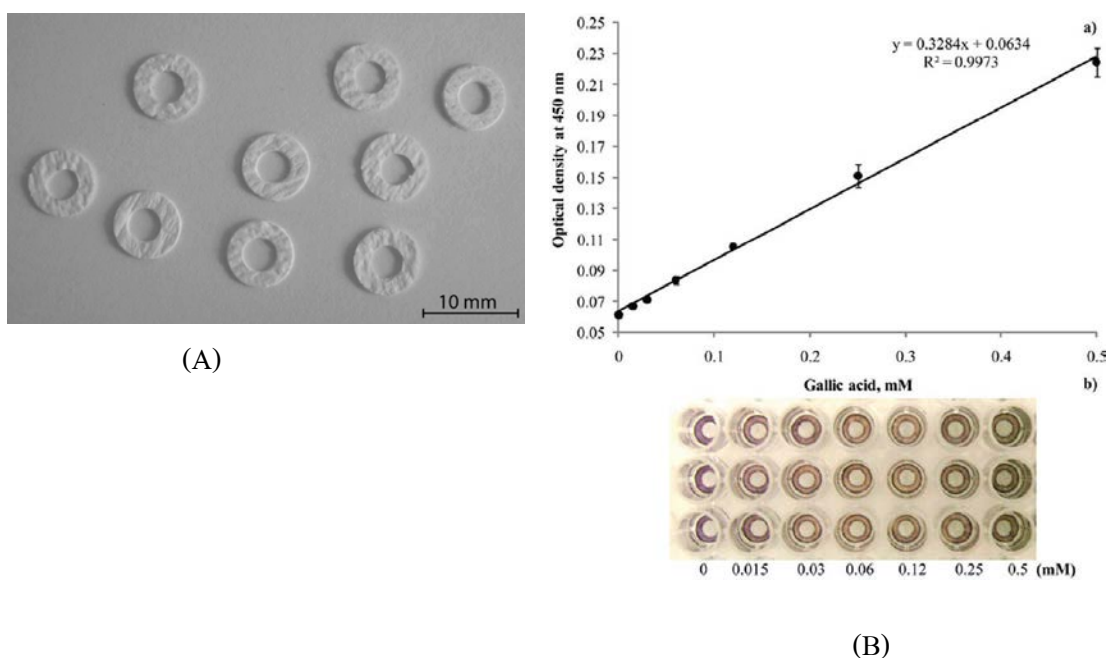
ในชาประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระประเภทฟลาโวนอยด์ ที่ทรงพลังหลายชนิด โดยเฉพาะสาร Epigallocatechin gallate (EGCG) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรง โดยมีฤทธิ์มากกว่าวิตามินอีถึง 20 เท่า คาเทชินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถจับกับอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และภาวะไขมันในเลือดสูง เป็นต้น

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Fenton et al. (2009, pp. 124-129) ได้สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษรูปแบบช่องกรงไพล์ด้านข้างใช้สำหรับวิเคราะห์สารชีวภาพที่หลากหลาย โดยสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธีการตัดด้วยเครื่องตัดอัตโนมัติ (craft cutting machine) เคลือบกระดาษด้วยพลาสติกใส (lamination) ซึ่งอุปกรณ์ที่สร้างมีข้อดีได้แก่ ช่วยลดการระเหยของรีเอเจนต์ ช่วยป้องกันไม่ให้พื้นผิวที่จะทำการทดสอบปนเปื้อนและไม่ให้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์รั่วออกจากอุปกรณ์ มีราคาถูก เหมาะสำหรับไปใช้ในประเทศที่กำลังพัฒนา ผลิตุอุปกรณ์ได้ครั้งละหลายอุปกรณ์

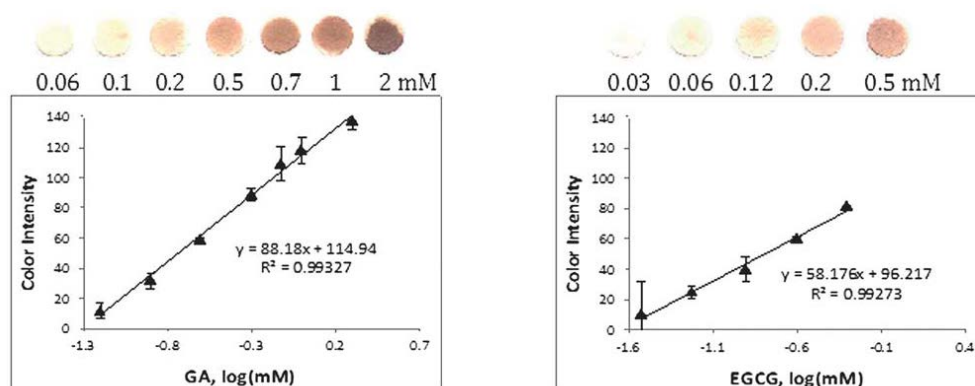
Zhang et al. (2006, pp. 219-224) ได้ใช้วิธี 96-well microplate method วิเคราะห์หาปริมาณสารโพลีฟีนอล (polyphenol) ในสาหร่าย ณ ประเทศแคนาดา ด้วยวิธี DPPH ทำการวิเคราะห์โดยผสมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างลงใน 96-well microplate แล้ววัดสีที่จางลงของ DPPH ด้วยเครื่อง microplate reader จากการทดลองพบว่า การวิเคราะห์ด้วยวิธี 96-well microplate method จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารได้น้อย วิเคราะห์ได้ครั้งละหลายตัวอย่างและสามารถทำซ้ำได้ดี

Piletska et al. (2012, pp. 2038-2043) ได้พัฒนารูปแบบใหม่ของ Microtiter Plate สำหรับตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ ซึ่งพัฒนาโดยมีการตรึงสารชีวภาพและรีเอเจนท์ไว้ที่กระดาษ ดังภาพที่ 2-4(A) แล้วนำไปไว้ที่ถาดหลุมที่เปิดแล้ววิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาด้วย microtiter plate readers โดยไม่มีขั้นตอนอื่น ๆ เพิ่มเติม แนวคิดดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ได้ หลากหลาย เช่น การตรวจสอบสารบ่งชี้ชีวภาพชนิดต่างๆโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเอนไซม์ เช่น การวิเคราะห์กลูโคส และกรดยูริก การตรวจสอบโปรตีน การวิเคราะห์ค่า pH และการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายโดยมีเพียงขั้นตอนการเติมสารและ ขั้นตอนการตรวจวัด จึงทำให้สามารถคัดกรองสารตัวอย่างได้รวดเร็วเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ทางการแพทย์ที่ต้องวิเคราะห์สารหลายๆอย่างในคราวเดียวกัน อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการ (laboratory based analysis) เนื่องจากเครื่อง microplate reader เป็น เครื่องมือที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถพกพาไปตรวจวัดภาคสนามได้



ภาพที่ 2-4 (A) แสดงรูปร่างของกระดาษกรองที่ตรึงด้วยสารรีเอเจนท์ (B) แสดงการใช้อุปกรณ์ microtiter plate ที่ทำงานร่วมกับกระดาษในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Gallic acid ด้วย DPPH assay

Sharpe et al. (2012) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจสอบแบบพกพาสำหรับวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอาหารโดยใช้การตรึงอนุภาคนาโนซีเรีย (Ce) ไว้ที่กระดาษ ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับเซ็นเซอร์ขนาดเล็ก อุปกรณ์ดังกล่าววิเคราะห์ได้โดยวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีเรีย ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีเหลืองกลายเป็นสีน้ำตาล อุปกรณ์แบบพกพาดังกล่าวนำไปวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ascorbic acid, gallic acid, vanillic acid, quercetin, caffeic acid, epigallocatechin gallate และได้นำไปวิเคราะห์กับสารตัวอย่างจริง ได้แก่ ชาและเห็ด ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม แต่วิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถทดสอบได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง เนื่องจากมีการใช้โปรแกรมประมวลผลภาพแทน microplate reader spectrophotometer จึงมีศักยภาพในการวิเคราะห์ในสถานที่ที่นอกเหนือจากห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 2-5 แสดง กราฟมาตรฐานแสดงที่ได้จากการพล็อตความเข้มสีของอนุภาคนาโนซีเรียที่เปลี่ยนไปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ gallic acid (GA) และ epigallocatechin gallate(EGCG)

Kriengsak (2006) ได้วิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลฝรั่ง ด้วยวิธี DPPH assay วัดการลดลงของ DPPH ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ด้วยวิธีนี้สามารถสร้างกราฟมาตรฐานของ trolox ที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 25 -800 μ M จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่ให้สัญญาณการวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน รายงานผลการวิเคราะห์ในรูปของ μ MTE/g fresh mass

พัชรีย์ พริบตีเวช (2552) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชา พบว่าสารสกัดชามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากมีปริมาณสารฟีนอลสูง ซึ่งการทดลองพบว่า ชาเขียวมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมา คือ ชาสีถั่ว ชาอู่หลงก้านอ่อน ชาพันธุ์ ชาเขียวอู่หลง และชาอู่หลง ตามลำดับ

ต้นฉบับไม่ปรากฏ

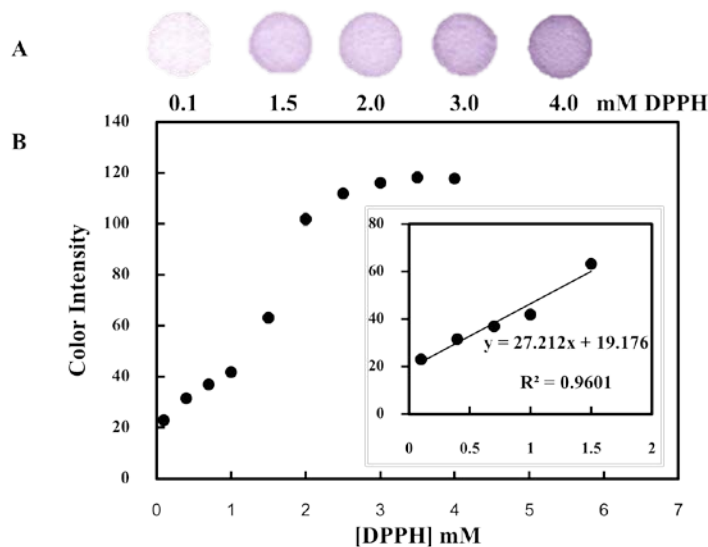
บทที่ 3

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสม

เนื่องด้วยการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการวัดการลดลงของสัญญาณของ DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ในการนำไปวิเคราะห์จึงเป็นปัจจัยสำคัญ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจะต้องเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นที่ให้สัญญาณที่สูงและนอกจากนั้นยังต้องสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่ลดลงได้อย่างรวดเร็วเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปเพียงเล็กน้อย งานวิจัยนี้ ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ศึกษา DPPH เริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.1-4 mM โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นหยดสารละลาย DPPH แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.5 μ L ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (n=3) ปล่อยให้ไวในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำอุปกรณ์ที่ได้ไปสแกนแล้วนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดความเข้มของสีม่วงที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 4-2 ภาคผนวก) นำค่าความเข้มสีมาสร้างกราฟ โดยพลอตแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น DPPH และค่าความเข้มสีจะได้กราฟดังแสดงในภาพที่ 4-1

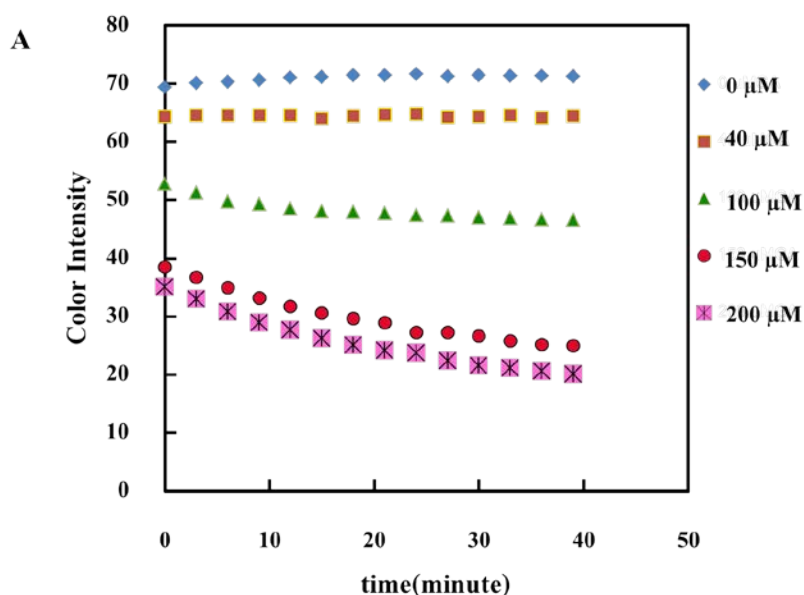


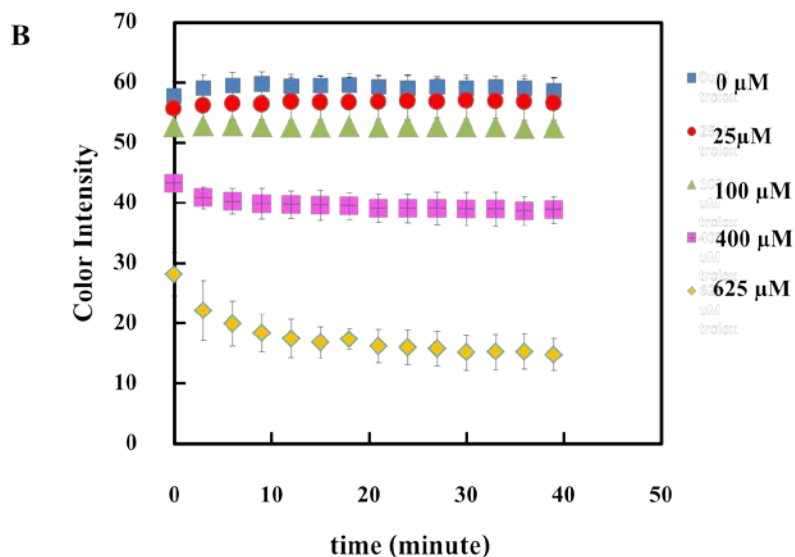
ภาพที่ 4-1 (A) แสดงสีของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างค่าความเข้มสีและความเข้มข้นของสารละลาย DPPH (n=3)

จากกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและความเข้มสีของ DPPH พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DPPH เพิ่มขึ้น ความเข้มสีของ DPPH ก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย จุดที่สัญญาณเริ่มต้นมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือความเข้มข้นของ DPPH ประมาณ 1.5 mM ในการทดลองนี้จึงเลือก DPPH ที่มีความเข้มข้น 1.5 mM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากจะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณได้อย่างชัดเจนเมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงเล็กน้อยและความเข้มข้นของ DPPH ลดต่ำลง

4.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid และ trolox

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid และ trolox ทำการทดสอบโดยหยดสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหลุมละ 0.5 μL ($n=3$) ทิ้งไว้ 4 นาทีหลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH หลุมละ 0.5 μL จากนั้นสแกนภาพโดยสแกนทุก ๆ 3 นาทีเป็นเวลา 39 นาที นำภาพไปเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี แล้วพลอตกราฟระหว่างระยะเวลาและค่าความเข้มสี จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้งสองชนิดคือ gallic acid และ trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในกราฟที่พลอตระหว่างความเข้มสีของ DPPH กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 4-2 (A) และ 4-2 (B) สำหรับการวิเคราะห์ gallic acid และ trolox ตามลำดับ





ภาพที่ 4-2 การศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (A) gallic acid (n=3) (B) trolox (n=3)

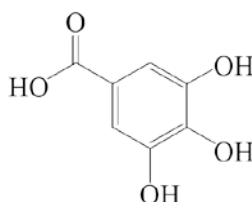
จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH 1.5 mM กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid และ trolox ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การศึกษาในสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสองให้ผลคล้ายคลึงกันกล่าวคือสัญญาณของ DPPH จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสองกับ DPPH และค่าความเข้มข้นจะคงที่เมื่อเกิดปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 30 นาที เป็นต้นไปในทุกๆความเข้มข้นที่ศึกษา แสดงว่าระยะเวลา 30 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้นซึ่งสอดคล้องกับวิธี DPPH ที่มีระบบตรวจวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (Cheng et al., 2006; Mishra et al., 2012 ; Noipa et al., 2011)

4.3 ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (Analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

4.3.1 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

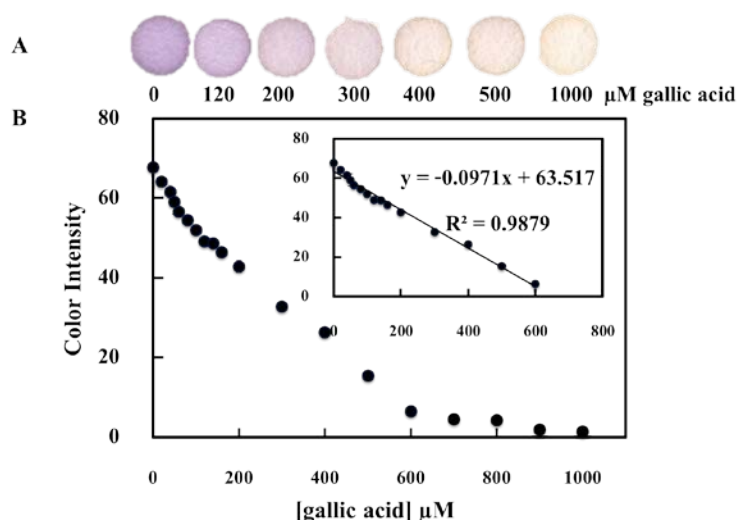
gallic acid เป็นกรดอินทรีย์ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียดเมื่ออายุมากขึ้นซึ่งช่วย

ลดโรคหัวใจและโรคมะเร็งในผู้สูงอายุ โดยสามารถพบได้ในอาหาร เช่น บลูเบอร์รี่ แอปเปิ้ล ใบชา
วอลนัท (Pulugurtha, 2011; Tremblay, 2011)



ภาพที่ 4-3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ gallic acid

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ gallic acid โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1.5 mM ในเอทานอล และเตรียมสารตั้งต้นอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ช่วงความเข้มข้น 0-100 μM ในเอทานอล ทำการทดสอบโดยหยดสารละลาย gallic acid ความเข้มข้นต่างๆลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหุ้มละ 0.5 μL ($n=3$) ทิ้งไว้ 4 นาทีหลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH หุ้มละ 0.5 μL วางทิ้งไว้ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาทีได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-4 และตารางที่ 2 ภาคผนวก จะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ gallic acid เพิ่มขึ้น ความเข้มสีของ DPPH มีค่าลดลงเนื่องจากอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วง ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นอนุมูลอิสระ gallic acid ส่งผลให้สีจางลงเมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นและกราฟดังแสดงในรูปที่ 4-4B มีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ gallic acid เท่ากับ 0-600 μM $R^2 = 0.9879$



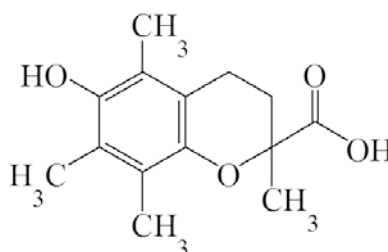
ภาพที่ 4-4 (A) แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 30 นาที (B) แสดงค่าความเข้มสี (color intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับ gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 30 นาที ($n=3$)

ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของ gallic acid ในช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 50 และ 250 μM ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ซ้ำทั้ง 2 ความเข้มข้น มีค่าใกล้เคียงกัน และจากการคำนวณให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percentage of relative standard deviation, %RSD) เท่ากับ 5.88 และ 17.30 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-4 ภาคผนวก) จะเห็นว่าที่ gallic acid ความเข้มข้นต่ำ จะมีค่า %RSD ต่ำ เนื่องจากสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าสูง แต่ที่ความเข้มข้นของ gallic acid ที่สูงจะให้ค่า %RSD สูงเนื่องจากสัญญาณเฉลี่ยมีค่าต่ำ (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแล้วจะเห็นว่าวิธี DPPH บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน gallic acid

ศึกษาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) โดยนำค่าความเข้มข้นของการวิเคราะห์ 0 μM gallic acid (blank) ด้วยวิธี DPPH มาคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด gallic acid (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก) พบว่าความเข้มข้นของ gallic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 2.90 μM ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Piletska et al., 2012)

4.3.2 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

trolox เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น จึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี พบว่าวิตามินอีต้องใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน แต่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในหลายโมเดล (ณัฐวณิชระนาวิน, 2547) ดังนั้นในงานวิจัยจึงได้ศึกษาการวิเคราะห์สารมาตรฐาน trolox ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

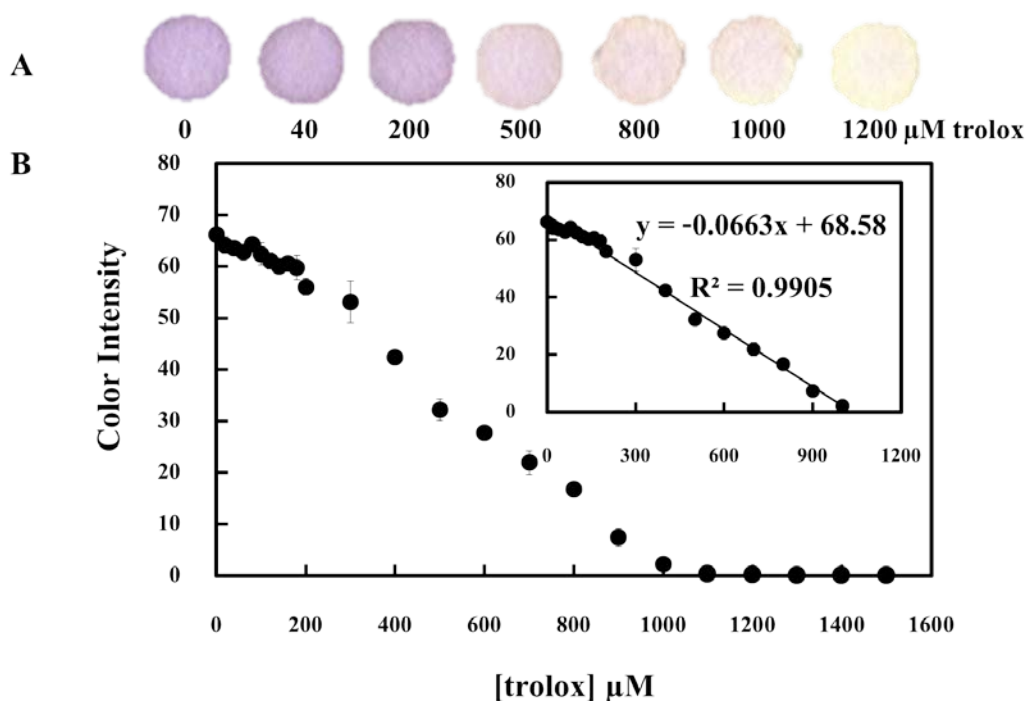


ภาพที่ 4-5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ trolox

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1.5 mM ในเอทานอล และเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระ

มาตรฐาน trolox ความเข้มข้น 0-1500 μM ในเอทานอล ทำการทดสอบโดยหยดสารละลาย trolox ความเข้มข้นต่างๆบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหุ้มละ 0.5 μL ($n=3$) ทิ้งไว้ 4 นาทีหลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH หุ้มละ 0.5 μL วางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปสแกนภาพ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4 - 6 จะเห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ trolox จะพบว่าความเข้มสีของ DPPH มีค่าลดลง ดังแสดงในภาพที่ 4 - 6 (A) นำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี (ตารางที่ 4-6 ภาคผนวก) จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสี ม่วงกับความเข้มข้นของ trolox พบว่าสัญญาณมีค่าลดลงเมื่อ trolox เพิ่มขึ้นดังภาพที่ 4 - 6 (B) และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ trolox เท่ากับ

0-1000 μM $R^2 = 0.9905$



ภาพที่ 4 - 6 (A) แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 30 นาที (B) แสดงค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับ trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 30 นาที ($n=3$)

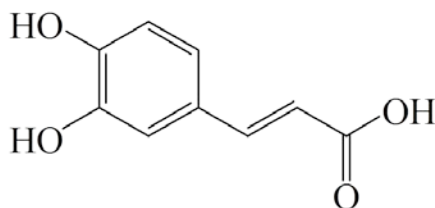
ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของ trolox ในช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 50 และ 500 μM ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage of relative

standard deviation, %RSD) เท่ากับ 2.22 และ 7.64 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-7 ภาคผนวก) ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธี DPPH บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน trolox (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก)

ศึกษาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) โดยนำค่าความเข้มข้นของการวิเคราะห์ 0 μM trolox (blank) ด้วยวิธี DPPH มาคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด trolox (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก) พบว่าความเข้มข้นของ trolox ที่ต่ำที่สุดที่วิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 67.56 μM ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าที่เคยได้รายงานก่อนหน้านี้ (Cheng et al., 2006)

4.3.3 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน caffeic acid

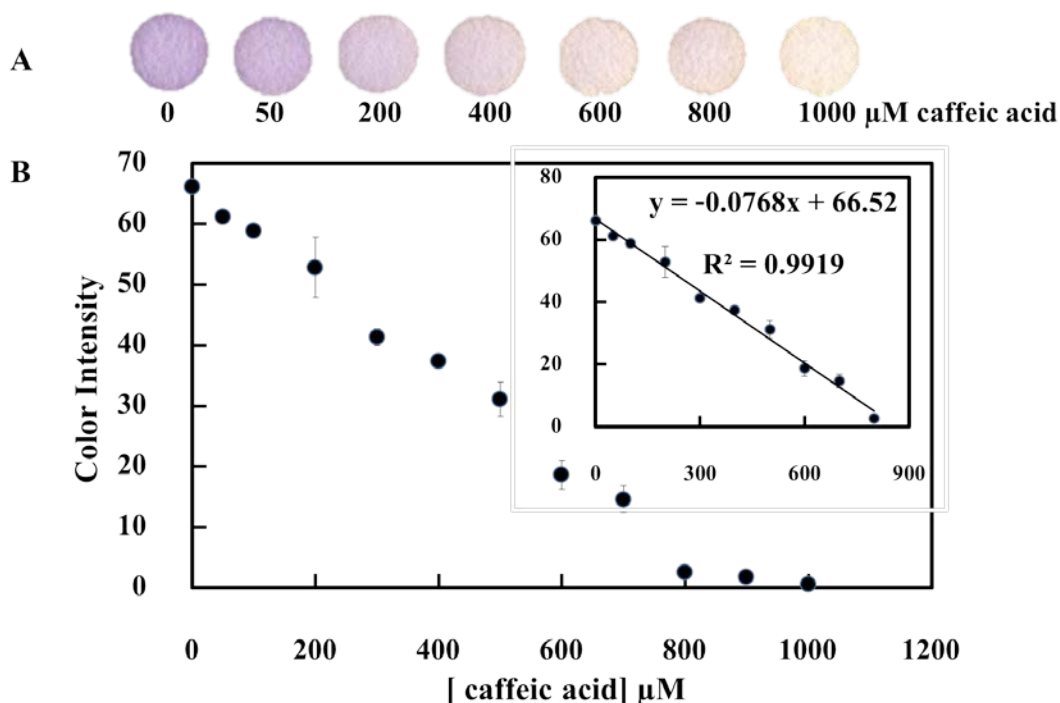
caffeic acid สามารถพบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช มีสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจและยับยั้งการดูดซึม Cu^{2+} ที่มีส่วนไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein) ในร่างกายมนุษย์ (Gorinstein et al., 2001)



ภาพที่ 4-7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ caffeic acid

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ caffeic acid โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1.5 mM ในเอทานอล และเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน caffeic acid ความเข้มข้น 0-1000 μM ในเอทานอล ทำการวิเคราะห์คล้ายกับการศึกษา gallic acid และ trolox ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-8 จะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ caffeic acid เพิ่มขึ้น ความเข้มสีของ DPPH มีค่าลดลง เนื่องจากอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วง ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid ส่งผลให้สีจางลงเมื่อความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4-8 (A) แล้วนำไปสแกนภาพ นำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี (ตารางที่

4-9 ภาคผนวก) พบว่าให้กราฟที่พล็อตระหว่างความเข้มสีและความเข้มข้นของ caffeic acid ดังภาพที่ 4-8 (B) และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ caffeic acid เท่ากับ 0-800 μM $R^2 = 0.9919$



ภาพที่ 4 - 8 (A) แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ caffeic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 30 นาที (B) แสดงค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับ caffeic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 30 นาที (n=3)

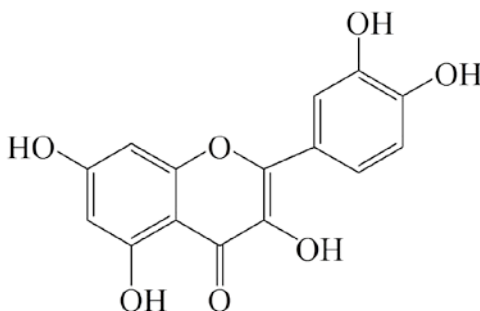
ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน caffeic acid โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของ caffeic acid ในช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 50 และ 300 μM ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percentage of relative standard deviation, %RSD) เท่ากับ 1.50 และ 2.87 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-10 ภาคผนวก) แสดงให้เห็นว่าวิธี DPPH บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน caffeic acid (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก)

ศึกษาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) โดยนำค่าความเข้มสีของของการวิเคราะห์ 0 μM caffeic acid (blank) ด้วยวิธี DPPH มาคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด caffeic

acid (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก) พบว่าความเข้มข้นของ caffeic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 7.01 μM

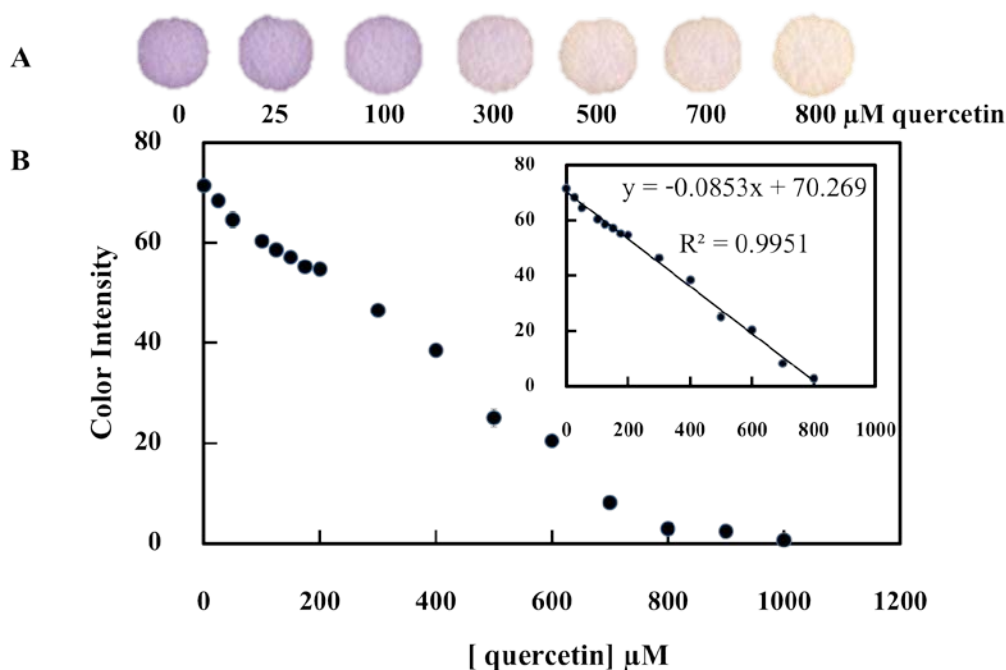
4.3.4 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin

quercetin เป็นสารเคมีที่พบได้ในพืช มักจะอยู่ตามเปลือกไม้และผลไม้อย่างเช่น แอปเปิ้ล, ชา, หัวหอม และไวน์แดง เป็นไบโอฟลาโวนอยด์ที่มีประสิทธิภาพต่อต้านอนุมูลอิสระและลดอาการอักเสบ ซึ่งทำให้นามาน่าใช้ช่วยบำรุงสุขภาพได้มากมาย เช่น ใช้ลดอาการแพ้ได้เนื่องจากช่วยลดการปล่อยฮิสตามีนจากเซลล์มาสต์โตไซท์ได้ (วินัย คะหลั่น, 2550)



ภาพที่ 4-9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ quercetin

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ quercetin โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1.5 mM ในเอทานอล และเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 0-1000 μM ในเอทานอล ทำการวิเคราะห์คล้ายกับการศึกษา gallic acid และ trolox ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-10 จะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ quercetin เพิ่มขึ้น ความเข้มสีของ DPPH มีค่าลดลง เนื่องจากอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วง ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin ส่งผลให้สีจางลงเมื่อความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4-10 (A) แล้วนำไปสแกนภาพ นำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี (ตารางที่ 4-12 ภาคผนวก) พบว่ากราฟที่ได้จากการพลอตระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ quercetin มีลักษณะดังภาพที่ 4-10 (B) และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ quercetin เท่ากับ 0-800 μM $R^2 = 0.9951$



ภาพที่ 4 - 10 (A) แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 30 นาที (B) แสดงค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับ quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 30 นาที (n=3)

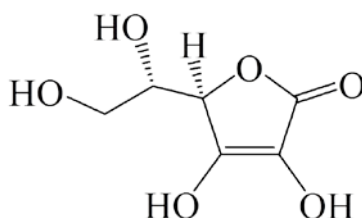
ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของ quercetin ในช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 50 และ 400 μM ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage of relative standard deviation, %RSD) เท่ากับ 3.32 และ 6.82 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-13 ภาคผนวก) แสดงให้เห็นว่าวิธี DPPH บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน quercetin (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก)

ศึกษาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) โดยนำค่าความเข้มสีของของการวิเคราะห์ 0 μM quercetin (blank) ด้วยวิธี DPPH มาคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด quercetin (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก) พบว่าความเข้มข้นของ quercetin ที่ต่ำที่สุดที่วิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.90 μM

4.3.5 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน L-ascorbic acid

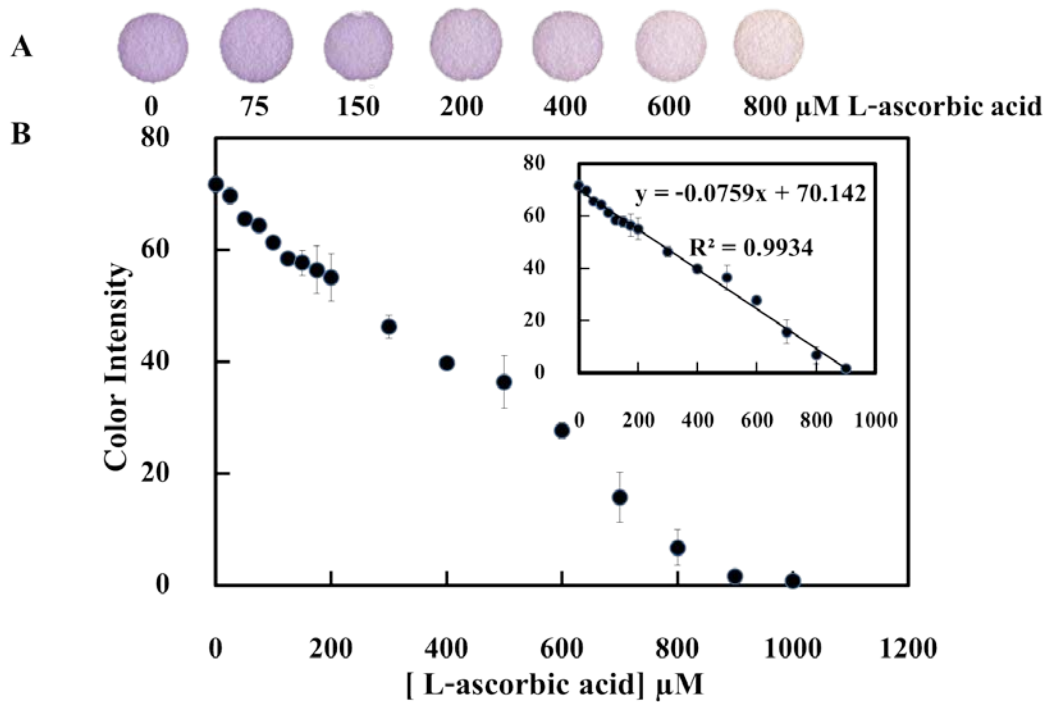
L-ascorbic acid เป็นรูปที่ออกฤทธิ์ของวิตามินซี วิตามินซีมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ที่สามารถละลายน้ำได้ดีมาก คงตัวในอากาศเมื่ออยู่ในสภาวะบริสุทธิ์และแห้ง แต่สลายตัวอย่าง

รวดเร็วมื่อโดนความชื้นและแสง (ณัฐฐา รัชตะนาวิน, 2547) วิตามินซีแสดงสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น บริเวณพันธะคู่ของกรดไขมัน โดยทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นด้วยการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ไปเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น (Mitsumoto et al.,1991) และจับกับโลหะไอออนที่เป็นสารเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Frankel, 1996)



ภาพที่ 4-11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ L-ascorbic acid

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ L-ascorbic acid โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1.5 mM ในเอทานอล และเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน L-ascorbic acid ความเข้มข้น 0-1000 μ M ในเอทานอล ทำการวิเคราะห์คล้ายกับการศึกษา gallic acid และ trolox ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-12 จะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ L-ascorbic acid เพิ่มขึ้น ความเข้มสีของ DPPH มีค่าลดลง เนื่องจากอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วง ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ L-ascorbic acid ส่งผลให้สีจางลงเมื่อความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4-12 (A) แล้วนำไปสแกนภาพ นำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี (ตารางที่ 4-15 ภาคผนวก) พบว่าค่าความเข้มสีมีค่าลดลงเมื่อ L-ascorbic acid เพิ่มขึ้นดังภาพที่ 4-10 (B) และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ L-ascorbic acid เท่ากับ 0-900 μ M $R^2 = 0.9934$



ภาพที่ 4 - 12 (A) แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ L-ascorbic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 30 นาที (B) แสดงค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับ L-ascorbic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 30 นาที (n=3)

ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน L-ascorbic acid โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของ L-ascorbic acid ในช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 50 และ 400 μM ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percentage of relative standard deviation, %RSD) เท่ากับ 0.52 และ 2.23 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-16 ภาคผนวก) แสดงให้เห็นว่าวิธี DPPH บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน L-ascorbic acid (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก)

ศึกษาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) โดยนำค่าความเข้มสีของของการวิเคราะห์ 0 μM L-ascorbic acid (blank) ด้วยวิธี DPPH มาคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด L-ascorbic acid (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก) พบว่าความเข้มข้นของ L-ascorbic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 37.23 μM

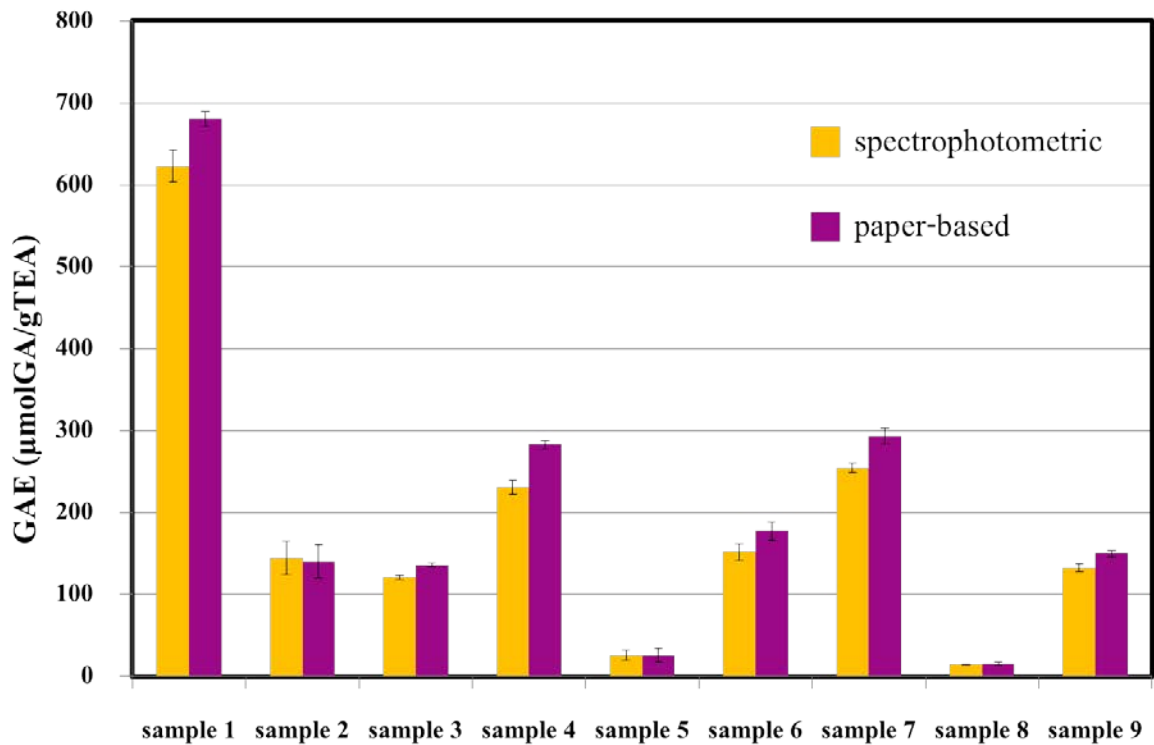
จากการวิเคราะห์สามมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถสรุปค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ได้ดังนี้

ตารางที่ 4-1 ค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ด้วยอุปกรณ์ดีพีพีเอชแบบกระดาษ

Antioxidant standards	Linear range		Reproducibility (%RSD)	LOD (μM)
	μM	R^2		
gallic acid	0-600	0.9879	5.88-17.30	2.90
trolox	0-1000	0.9905	2.22-7.64	67.56
caffeic acid	0-800	0.9919	1.50-2.87	7.01
quercetin	0-800	0.9951	3.32-6.82	0.90
L-ascorbic acid	0-900	0.9934	0.52-2.23	37.23

4.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ (ใบชาแห้ง) ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและวิธี DPPH แบบดั้งเดิม

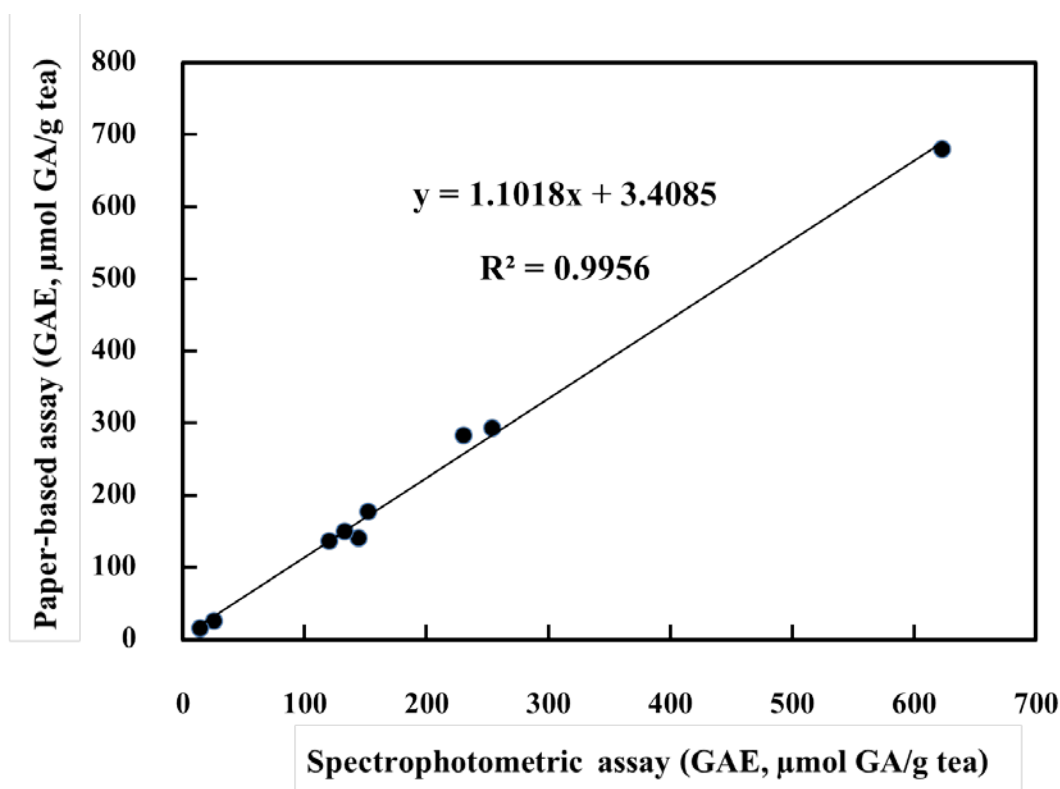
จากการศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid, trolox, caffeic acid, quercetin และ L-ascorbic acid พบว่าสามารถทำได้โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ปริมาตร 0.5 μL และ DPPH ความเข้มข้น 1.5 mM ปริมาตร 0.5 μL ทำปฏิกิริยากันใช้ระยะเวลา 30 นาที สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกันและใช้สารในการวิเคราะห์เพียง 1 μL ให้ค่าการวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงสูง แสดงให้เห็นว่าวิธี DPPH บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ได้จริง ขั้นตอนต่อไปจึงทำการเปรียบเทียบระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในใบชาแห้ง ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay) และวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยใช้ตัวอย่างชาชงทั้งหมด 9 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในค่า gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วย $\mu\text{mol gallic acid equivalent/g tea}$ ซึ่งหมายถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า $\mu\text{mol gallic acid}$ ต่อหนึ่งกรัมของชา จากการวิเคราะห์ได้ผลการทดลองดังแสดงภาพที่ 4-13 (แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ตารางที่ 4-17, 4-18 และแสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก)



ภาพที่ 4 - 13 แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา sample 1-9 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างชาทั้ง 9 ชนิดนำค่าจากการทดลองไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติโดยใช้ linear regression ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธีทั้งสอง ทำได้โดยพลอตกราฟค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ได้จากวิธีดั้งเดิม (spectrophotometric assay) เทียบกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) หากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีทั้งสองมีค่าไม่แตกต่างกัน จะได้ค่า slope และ intercept ของกราฟ ใกล้เคียง 1 และ 0 ตามลำดับ (Miller et al., 2000)

ดังแสดงภาพที่ 4-14



ภาพที่ 4 – 14 กราฟ linear regression แสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา sample 1-9 ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

จากสมการ $y = 1.1018 (\pm 0.0653)x + 3.4085 (\pm 16.6245)$, $R^2 = 0.9956$ กราฟมีค่า intercept เท่ากับ $3.4085 (\pm 16.6245)$ ค่าใกล้เคียง 0 และกราฟมีค่า slope เท่ากับ $1.1018 (\pm 0.0653)$ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าค่า GAE ที่วิเคราะห์ได้ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เป็นการยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แม่นยำเทียบเท่ากับวิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม นอกจากนี้จะเห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) เป็นวิธีที่ใช้ปริมาตรสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ปริมาตรรวมเพียง $1 \mu\text{L}$ ซึ่งน้อยกว่าปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมถึง 2000 เท่า สามารถลดของเสียที่เกิดขึ้นหลังจากการวิเคราะห์ได้มาก อุปกรณ์สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันที่หลาย ๆ ตัวอย่าง (>20 ตัวอย่างต่อครั้ง) ใช้อุปกรณ์แบบกระดาษที่มีราคาถูกในการวิเคราะห์และใช้สแกนเนอร์ร่วมกับโปรแกรมประมวลผลภาพเป็นระบบตรวจวัดสัญญาณ ทำให้การวิเคราะห์สามารถทำได้ในสถานที่ที่ไม่มีเครื่องมือใน

ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์มีแนวโน้มสามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่างที่สนใจ
คราวละหลายๆ ได้เป็นอย่างดี

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อวิเคราะห์แบบรู้ผลเร็วของความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่น่าสนใจโดยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีคุณสมบัติได้แก่ ทดสอบตัวอย่างได้หลายๆตัวอย่างในคราวเดียวกัน ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย ใช้เวลาการวิเคราะห์น้อย มีค่าการวิเคราะห์ถูก และใช้เครื่องมือการตรวจวัดสัญญาณที่ไม่แพงอีกทั้งให้ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ

จากการทดลองได้สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยสร้างบริเวณส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ด้วยการตัดและเคลือบด้วยพลาสติก มีลักษณะบริเวณวิเคราะห์เป็นแบบหลุม พบว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์สารละลายสารต้านอนุมูลอิสระที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายได้ดี บริเวณที่ไม่ชอบน้ำสามารถกั้นสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ให้อยู่ภายในหลุมได้เป็นอย่างดี การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยการใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ในสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ได้แก่ gallic acid, trolox, caffeic acid, quercetin และ L-ascorbic acid พบว่า DPPH ที่มีความเข้มข้น 1.5 mM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากจะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณได้อย่างชัดเจนเมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงเล็กน้อยและความเข้มข้นของ DPPH ลดต่ำลง ระยะเวลา 30 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้น เนื่องจากค่าความเข้มสีจะคงที่เมื่อเกิดปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 30 นาที เป็นต้นไปในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ศึกษา ซึ่งในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยการใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ในสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานนั้น สามารถทำได้โดยหยดสารต้านอนุมูลอิสระ 0.5 μ L หลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH 1.5 mM ปริมาตร 0.5 μ L ปล่อยให้สารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ DPPH เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปสแกนและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ImageJ ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี มีความสามารถในการทำซ้ำได้ดี และมีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ เมื่อวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาทั้ง 9 ชนิดระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) พบว่าค่า GAE ที่วิเคราะห์ได้ทั้งสอง

วิธีมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาขึ้น(paper-based assay)เป็นวิธีที่ใช้ปริมาตรสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ปริมาตรรวมเพียง $1\mu\text{L}$ ซึ่งเป็นปริมาตรรวมในการวิเคราะห์ที่น้อยกว่าการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมถึง2000เท่าอุปกรณ์ถูกออกแบบให้สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันทีละหลายๆตัวอย่าง (>20ตัวอย่างต่อครั้ง) เหมาะกับการวิเคราะห์แบบรู้ผลรวดเร็ว (high throughput analysis) สามารถนำไปใช้วิเคราะห์แบบคัดกรอง (screening) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สนใจได้ อุปกรณ์แบบกระดาษเป็นอุปกรณ์ที่มีราคาถูกและใช้สแกนเนอร์ร่วมกับโปรแกรมประมวลผลภาพเป็นระบบตรวจวัดสัญญาณไม่จำเป็นต้องพึ่งพาเครื่องมือราคาแพงในการวิเคราะห์ อุปกรณ์สามารถพกพาไปตรวจวัดภาคสนามได้เนื่องจากมีขนาดเล็กและน้ำหนักเบา จากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่างที่สนใจได้จริง

บรรณานุกรม

- ณัฐฐา รัชตะนาวิณ. (2547). สารต้านอนุมูลอิสระ. *แสงแดด และผิวหนัง*, 433-449.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์, ไมตรี สุทธิจิตต์ และสุพัตร์ พวงบางโพ. (2553). *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่าเพกา และมะระขี้นก ในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา*. รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา.
- ปริญนันท์ บัวสด. (2549). *การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิเจนของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- เสาวนีย์ เหล่าสิงห์, ศิริธร อ่างแก้ว และมะลิวรรณ อมตขงไชย. (2554). *เทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A., & Callea, A. (2010). Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chemistry* 2010, 118(2), 256-265.
- Cao, G., Verdon, C. P., Wu, A., Wang, H., & Prior, R. L. (1995). Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1738-1744.
- Chevion, S., Roberts, M. A., & Chevion, M. (2000). The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(6), 860-870.

- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7429-7436.
- Dungchai, W., Chailapakul, O., & Henry, C. (2011). A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst*, 136(1), 77-82.
- Hung, P. V., Maeda, T., Miyatake, K., & Morita, N. (2009). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*, 42(1), 185-190.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research*, 31(4), 261-272.
- Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., & Yamane, Y. (2004). Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(8), 2391-2396.
- Kedare, S. B., & Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- Kriengsak, T. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (7), 669-675.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2008). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1318-1320.
- Miller, J. C., & Miller, J. N. (2000). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (4th ed.). England: Pearson Education.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84, 407-407.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.

- Mulholland, C. W., & Strain, J. J. (1991). Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clinical Biochemistry*, 24(5), 437-441.
- Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sakamoto, K., Tsuchimoto, D., Tsuzuki, T., & Nakatsu, Y. (2006). Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biological chemistry*, 387(4), 373-379.
- Piletska, E. V., Piletsky, S. S., Whitcombe, M. J., Chianella, I., & Piletsky, S. A. (2012). Development of a New Microtiter Plate Format for Clinically Relevant Assays. *Analytical Chemistry*, 84(4), 2038-2043.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem*, 1(106).
- Prior, R. L., & Wu, X. (2005). Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1315S-1321S.
- Sharpe, E., Frasco, T., Andreescu, D., & Andreescu, S. (2013). Portable ceria nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (NanoCerac). *Analyst* 2012, 138(1), 249-262.
- Shapoval, G., & Gromovaia, V. (2003). Mechanism of antioxidant protection of an organism from oxidative stress]. *Ukrainskiĭ biokhimiĭskiĭ zhurnal*, 75(2), 5.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., & Dennis, D. A. (2007). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. In C. J., Barrow. (Ed.), *Eighteenth International Seaweed Symposium*, Springer (pp.219-224).

ภาคผนวก

1. ข้อมูลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 4-2 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ช่วงความเข้มข้น 0.1- 4.0 mM บนอุปกรณ์

ตรวจวัดแบบกระดาษ(paper-based assay)

ความเข้มข้น DPPH (mM)	ความเข้มสี (Color Intensity)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
1.59	1.59	1.59	1.59	1.59	1.59
3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15
0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
1.59	1.59	1.59	1.59	1.59	1.59

ตารางที่ 4-3 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay)

ความเข้มข้น gallic acid (μ M)	ความเข้มสี (Color Intensity)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
1.59	1.59	1.59	1.59	1.59	1.59
3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15
0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

ความเข้มข้น gallic acid (μM)	ความเข้มสี (Color Intensity)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
1.59	1.59	1.59	1.59	1.59	1.59
3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15
0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
1.59	1.59	1.59	1.59	1.59	1.59
3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15
0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52

ตารางที่ 4-4 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid (n=10)

ความเข้มข้น gallic acid (μM)	Average Intensity	Standard Deviation	% RSD
50	53.66	3.15	5.88
250	30.99	5.36	17.30

ตารางที่ 4-5 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid (n=3)

ครั้งที่	1	2	3	Average Intensity	SD
ความเข้มสี (Color Intensity)	66.80	68.08	68.20	67.69	0.78

ตารางที่ 4-6 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay)

ความเข้มข้น trolox (μM)	ความเข้มสี (Color Intensity)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	66.96	65.94	65.63	66.18	0.69
20	65.53	62.39	64.59	64.17	1.61
40	64.76	63.09	62.91	64.59	1.02
60	63.67	62.99	61.79	62.81	0.95
80	64.27	64.85	64.05	64.39	0.41
100	64.68	62.33	60.39	62.47	2.15
120	60.21	60.24	62.87	61.10	1.53
140	59.66	61.62	58.93	60.07	1.39
160	60.64	60.64	60.61	60.63	0.02
180	57.82	59.15	62.37	59.78	2.34
200	54.11	56.89	57.11	56.05	1.65
300	56.39	54.46	48.57	53.14	4.07
400	40.97	42.56	43.80	42.44	1.42
500	29.90	33.04	33.87	32.27	2.10
600	27.72	28.31	27.09	27.71	0.61
700	19.55	22.32	24.11	21.99	2.30
800	17.51	15.80	17.14	16.82	0.90
900	5.68	7.41	9.25	7.45	1.78
1000	3.97	1.47	1.33	2.25	1.49
1100	0.39	0.24	0.46	0.36	0.11
1200	0.60	0.22	0.20	0.16	0.09
1300	0.02	0.12	0.05	0.03	0.02
1400	0.06	0.08	0.06	0.07	0.01
1500	0.01	0.00	0.03	0.01	0.02

ตารางที่ 4-7 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox (n=10)

ความเข้มข้น trolox (μM)	Average Intensity	Standard Deviation	% RSD
50	58.83	1.31	2.22
500	37.91	2.89	7.64

ตารางที่ 4-8 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox (n=3)

ครั้งที่	1	2	3	Average Intensity	SD
ความเข้มสี (Color Intensity)	66.96	65.94	65.63	66.18	0.69

ตารางที่ 4-9 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ caffeic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay)

ความเข้มข้น caffeic acid (μM)	ความเข้มสี (Color Intensity)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	66.32	66.28	65.92	66.18	0.22
50	60.79	60.92	62.03	61.25	0.68
100	59.18	57.55	59.88	58.87	1.20
200	54.95	47.25	56.51	52.90	4.96
300	40.07	42.78	41.24	41.36	1.36
400	38.46	37.64	36.15	37.42	1.17
500	34.27	29.02	30.09	31.13	2.77
600	17.80	21.37	16.84	18.67	2.39
700	12.26	16.45	15.22	14.64	2.16

ตารางที่ 4-9 (ต่อ)

ความเข้มข้น caffeic acid (μM)	ความเข้มสี (Color Intensity)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
800	2.52	2.84	2.55	2.64	0.17
900	1.49	1.94	2.32	1.92	0.41
1000	0.71	0.72	0.65	0.69	0.04

ตารางที่ 4-10 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ
caffeic acid (n=10)

ความเข้มข้น caffeic acid (μM)	Average Intensity	Standard Deviation	% RSD
50	63.93	0.96	1.50
300	44.42	1.27	2.87

ตารางที่ 4-11 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของ
สารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid (n=3)

ครั้งที่	1	2	3	Average Intensity	SD
ความเข้มสี (Color Intensity)	66.32	66.28	65.92	66.18	0.22

ตารางที่ 4-12 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay)

ความเข้มข้น quercetin (μM)	ความเข้มสี (Color Intensity)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	71.83	71.18	71.11	71.37	0.39
25	67.50	68.93	68.73	68.38	0.78
50	63.93	63.38	66.39	64.56	1.60
100	60.24	61.20	59.49	60.31	0.86
125	58.85	58.58	58.24	58.56	0.31
150	56.28	58.73	56.43	57.15	1.37
175	54.92	55.02	55.67	55.21	0.41
200	54.42	54.85	54.76	54.67	0.22
300	45.11	46.63	47.62	46.45	1.26
400	38.36	38.29	38.77	38.47	0.26
500	26.88	24.95	23.26	25.03	1.81
600	20.38	20.95	20.14	20.49	0.42
700	8.62	8.40	7.49	8.17	0.60
800	2.26	2.47	3.95	2.89	0.92
900	2.51	2.17	2.68	2.45	0.26
1000	0.25	0.64	1.02	0.64	0.39

ตารางที่ 4-13 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin (n=10)

ความเข้มข้น quercetin (μM)	Average Intensity	Standard Deviation	% RSD
50	59.62	1.98	3.32
400	39.26	2.68	6.82

ตารางที่ 4-14 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์หึ่งดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin (n=3)

ครั้งที่	1	2	3	Average Intensity	SD
ความเข้มสี (Color Intensity)	71.83	71.18	71.11	71.37	0.39

ตารางที่ 4-15 แสดงค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based assay)

ความเข้มข้น L-ascorbic acid (μM)	ความเข้มสี (Color Intensity)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	72.68	72.46	70.02	71.72	1.47
25	68.26	69.48	71.42	69.72	1.59
50	65.18	65.62	65.92	65.57	0.38
75	64.94	63.81	64.60	64.45	0.58
100	61.75	61.81	60.63	61.39	0.66
125	57.78	57.80	59.81	58.46	1.17
150	59.61	58.21	55.31	57.71	2.19
175	51.72	60.20	57.54	56.48	4.34
200	50.65	58.96	55.67	55.09	4.19
300	45.07	45.23	48.62	46.30	2.01
400	40.89	39.89	38.68	39.82	1.10
500	40.08	31.07	38.02	36.39	4.72
600	29.38	27.08	26.75	27.73	1.43
700	10.75	17.23	19.23	15.73	4.44
800	4.78	5.02	10.46	6.75	3.22
900	1.26	1.86	1.79	1.64	0.33
1000	0.55	0.31	1.41	0.75	0.58

ตารางที่ 4-16 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำของสารต้านอนุมูลอิสระ

L-ascorbic acid (n=10)

ความเข้มข้น	Average Intensity	Standard Deviation	% RSD
L-ascorbic acid (μM)			
50	72.10	0.38	0.52
400	56.89	1.27	2.23

ตารางที่ 4-17 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ของ

สารต้านอนุมูลอิสระ L-ascorbic acid (n=3)

ครั้งที่	1	2	3	Average Intensity	SD
ความเข้มสี (Color Intensity)	72.68	72.46	70.02	71.72	1.47

2. ข้อมูลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ(ใบชาแห้ง) ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและวิธี DPPH แบบดั้งเดิม

ตารางที่ 4-18 แสดงชื่อตัวอย่างชาที่นำมาใช้วิเคราะห์

ตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่างชา
Sample 1	ชาอูหลงตรา ชาระมิงค์
Sample 2	ชาลิปตัน
Sample 3	ชาดำปรุงสำเร็จกลิ่นเลมอนชนิดซอง
Sample 4	กรีนที(ใบชาเขียวตราจัสอะมินิท)
Sample 5	ชาเขียวมะลิตราบ้านไร่ 5 ดาว
Sample 6	ชาเขียวจีน ตรา Tops
Sample 7	ชาเขียวญี่ปุ่น ตรา Tops
Sample 8	ชาเขียวกลิ่นข้าวคั่ว (ฟูจิเกนมายชะ)

ตารางที่ 4-18 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่างชา
Sample 9	ชาเขียวคาเมลเลีย

ตารางที่ 4-19 แสดงค่า Average \pm SD ของการวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ(โพลีฟีนอล) ด้วยวิธี spectrophotometric DPPH assay และวิธี paper-based DPPH assay

สารละลายชาตัวอย่าง	Average \pm SD ($\mu\text{molGA/g tea}$)	
	วิธี Spectrophotometric DPPH assay	วิธี paper-based DPPH assay
Sample 1	622.92 \pm 19.56	680.36 \pm 8.78
Sample 2	144.40 \pm 20.00	140.13 \pm 20.66
Sample 3	120.38 \pm 2.92	136.07 \pm 2.27
Sample 4	230.70 \pm 8.65	282.66 \pm 5.19
Sample 5	25.76 \pm 6.12	25.71 \pm 7.92
Sample 6	151.95 \pm 10.21	177.23 \pm 11.21
Sample 7	253.97 \pm 5.70	293.01 \pm 9.95
Sample 8	14.07 \pm 0.39	15.22 \pm 2.06
Sample 9	132.70 \pm 5.03	149.82 \pm 4.14

3. การคำนวณความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

คำนวณได้จาก $\% \text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\text{Average}} \times 100$

ตัวอย่างการหา % RSD ของ gallic acid

$$\% \text{RSD ที่ } 50 \mu\text{M} ; \frac{3.15}{53.66} \times 100 = 5.88$$

$$\% \text{RSD ที่ } 250 \mu\text{M} ; \frac{5.36}{30.99} \times 100 = 17.30$$

การหาค่า % RSD ของสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นใช้วิธีคำนวณข้างต้นดังแสดงใน gallic acid

4. การคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) ของวิธีการวิเคราะห์ด้วย DPPH

ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการวิเคราะห์ด้วย DPPH (Limit of detection, LOD) คือ ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้สัญญาณของ DPPH ต่ำว่าสัญญาณเริ่มต้นเป็นสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลนค์

$$I_{LOD} = I_0 - 3SD_{blank}$$

เมื่อ I_{LOD} คือค่าความเข้มสีของ DPPH เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้นระดับขีดจำกัดการตรวจวัด

I_0 คือค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ไม่ได้เติมสารต้านอนุมูลอิสระ (Blank)

SD_{blank} คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความเข้มสีของ DPPH

การคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการวิเคราะห์ด้วย DPPH

$$\text{จาก } I_{LOD} = -mx_{LOD} + c$$

เมื่อ m และ c คือ ความชันและจุดตัดแกนในกราฟมาตรฐาน ตามลำดับ

x_{LOD} คือ ขีดจำกัดการตรวจวัด

คำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid

$$\text{จาก } I_0 - 3SD_{blank} = 67.6936 - 3(0.7798)$$

$$= 65.3542$$

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = -0.1239x + 65.713$

แทนค่า y จะได้ $65.3542 = -0.1239x + 65.713$

$$x = 2.90$$

$$[GA] = 2.90 \mu\text{M}$$

ดังนั้นขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ

2.90 μM

คำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox

$$I_0 - 3SD_{\text{blank}} = 66.1773 - 3(0.6922) \\ = 64.1007$$

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = -0.0663x + 68.58$

แทนค่า y จะได้ $64.1007 = -0.0663x + 68.58$

$$x = 67.56$$

$$[\text{trolox}] = 67.56 \mu\text{M}$$

ดังนั้นขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ $67.56 \mu\text{M}$

คำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid

$$I_0 - 3SD_{\text{blank}} = 66.1753 - 3(0.2204) \\ = 65.5141$$

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = -0.0744x + 66.036$

แทนค่า y จะได้ $65.5141 = -0.0744x + 66.036$

$$x = 7.01$$

$$[\text{caffeic acid}] = 7.01 \mu\text{M}$$

ดังนั้นขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ $7.01 \mu\text{M}$

คำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ quercrtin

$$I_0 - 3SD_{\text{blank}} = 71.3747 - 3(0.3941) \\ = 70.1925$$

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = -0.0853x + 70.269$

แทนค่า y จะได้ $70.1925 = -0.0853x + 70.269$

$$x = 0.90$$

$$[\text{quercrtin}] = 0.90 \mu\text{M}$$

ดังนั้นขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ quercrtin ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ $0.90 \mu\text{M}$

คำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ L-ascorbic acid

$$I_0 - 3SD_{\text{blank}} = 71.7173 - 3(1.4723)$$

$$= 67.3004$$

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = -0.0758x + 70.123$

แทนค่า y จะได้ $67.3004 = -0.0758x + 70.123$

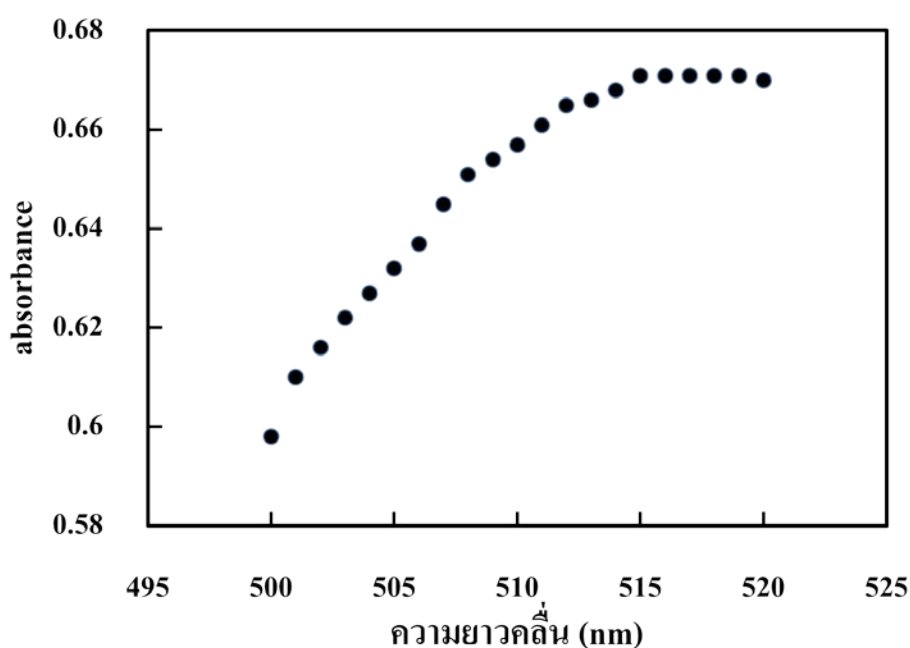
$$x = 37.24$$

$$[\text{L-ascorbic acid}] = 37.24 \mu\text{M}$$

ดังนั้นขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ L-ascorbic acid ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ $37.24 \mu\text{M}$

5. การคำนวณหา gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วย $\mu\text{mol gallic acid equivalent/g tea}$ จากสารละลายตัวอย่างชา ด้วยวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

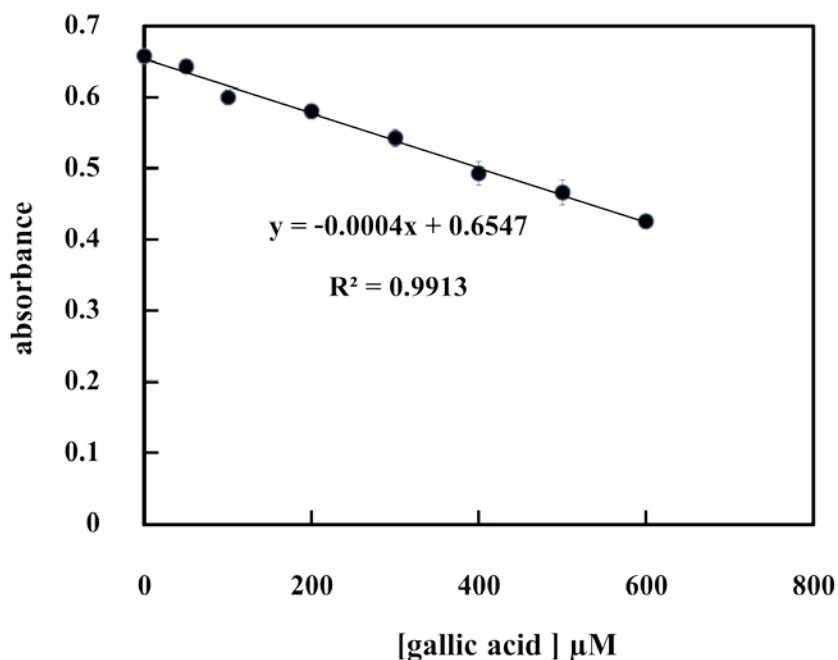
5.1 หาความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ของ DPPH ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทำการสแกน DPPH ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 500 – 520 nm



ภาพที่ 4 - 15 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 500 – 520 nm

เนื่องจากที่ความยาวคลื่น 515 nm เป็นความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืน (absorbance) สูงสุด จึงเลือกความยาวคลื่น 515 nm เป็นความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา

5.2 สร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid ของวิธี spectrophotometric assay



ภาพที่ 4 - 16 แสดงกราฟมาตรฐาน gallic acid ของวิธี spectrophotometric assay

5.3 การคำนวณหา gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วย $\mu\text{mol gallic acid equivalent/g tea}$ จากสารละลายตัวอย่างชา ด้วยวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

ตัวอย่างชา sample 1

จากสมการเส้นตรง $y = -0.0004x + 0.6547$

ครั้งที่ 1 ค่า $y =$ ค่า absorbance ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.589

จะได้ $0.589 = -0.0004x + 0.6547$

$$x = 164.25$$

ดังนั้นในสารละลายตัวอย่างชา 1000 mL มี gallic acid 164.25 μmol

นำสารละลายตัวอย่างชาใส่วิเคราะห์ 0.02 mL มี gallic acid $(164.25/1000) \times 0.02$

$$= 3.285 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$$

แสดงว่าในสารละลายตัวอย่างชาที่เจือจาง 1 mL มี gallic acid $(3.285 \times 10^{-3}/0.02) \times 1$

$$= 0.16425 \mu\text{mol}$$

นั่นคือในสารละลายตัวอย่างชา 0.025 mL มี gallic acid 0.16425 μmol
 เตรียมสารละลายตัวอย่างชาเริ่มแรก 200 mL มี gallic acid $(0.16425/0.025) \times 200$
 $= 1314 \mu\text{mol}$

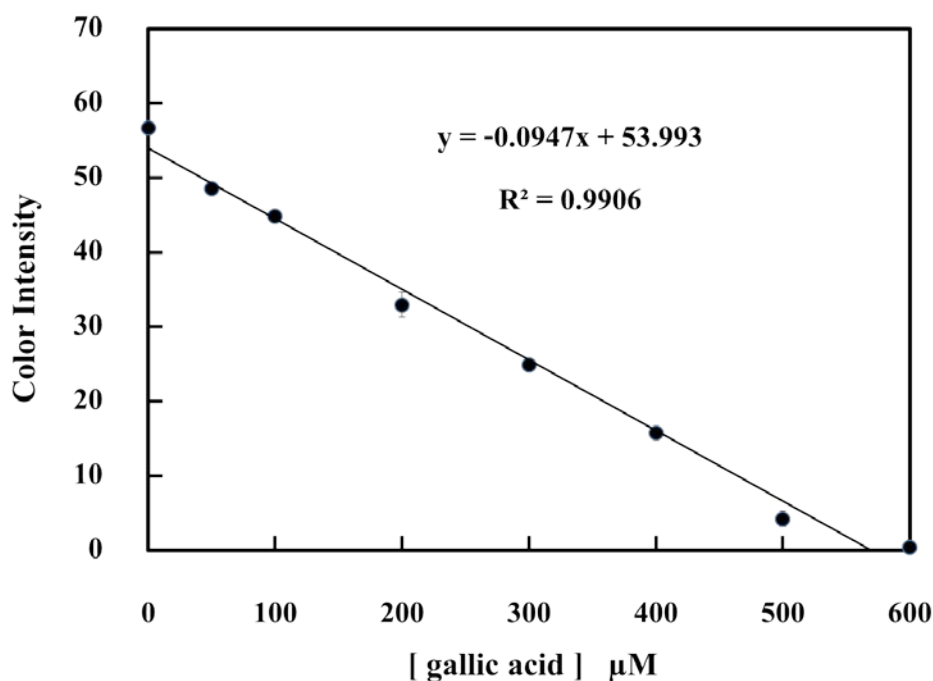
แสดงว่าในชา 2.0452 g มี gallic acid 1314 μmol

คิดเป็นในชา 1 g มี gallic acid $1314/2.0452 = 642.48 \mu\text{mol}$

เพราะฉะนั้น GAE ของตัวอย่างชา sample 1 มีค่าเท่ากับ 642.48 μmol

หมายเหตุ สารละลายตัวอย่างชา sample 1 เตรียมจากชั่งชาผงหนัก 2.0452 g ปริมาตรน้ำ 200 ml
 นำสารละลายชาตัวอย่างไปไปเจือจาง (สารละลายชา 25 μL + น้ำ 975 μL = สารละลาย 1 mL) และ
 นำสารละลายที่เจือจางแล้วไปวิเคราะห์ปริมาตร 0.02 μL ผสมกับ DPPH 100 μL และ ethanol 2 mL
 คำนวณ gallic acid equivalent (GAE) ของตัวอย่างชาอื่นๆ ได้ด้วยวิธีดังกล่าว

6. การคำนวณหา gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วย $\mu\text{mol gallic acid equivalent/g tea}$ จากสารละลายตัวอย่างชา ด้วยวิธี paper-based DPPH assay



ภาพที่ 4 - 17 แสดงกราฟมาตรฐาน gallic acid ของวิธี paper-based DPPH assay
 ตัวอย่างชา sample 1

จากสมการเส้นตรง $y = -0.0947x + 53.993$

ครั้งที่ 1 ค่า y = ค่า Color Intensity ซึ่งมีค่าเท่ากับ 37.615

$$\text{จะได้ } 37.615 = -0.0947x + 53.993$$

$$x = 172.9461$$

ดังนั้นในสารละลายตัวอย่างชา 1000 mL มี gallic acid 172.9461 μmol

นำสารละลายตัวอย่างชาใส่วิเคราะห์ 0.0005 mL มี gallic acid $(172.9461/1000) \times 0.0005$
 $= 8.65 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$

แสดงว่าในสารละลายตัวอย่างชาที่เจือจาง 1 mL มี gallic acid $(8.65 \times 10^{-5} / 0.0005) \times 1$
 $= 0.1729461 \mu\text{mol}$

นั่นคือในสารละลายตัวอย่างชา 0.025 mL มี gallic acid 0.1729461 μmol

เตรียมสารละลายตัวอย่างชาเริ่มแรก 200 mL มี gallic acid $(0.1729461/0.025) \times 200$
 $= 1383.57 \mu\text{mol}$

แสดงว่าในชา 2.0452 g มี gallic acid 1383.57 μmol

คิดเป็นในชา 1 g มี gallic acid $1383.57/2.0452 = 676.50 \mu\text{mol}$

เพราะฉะนั้น GAE ของตัวอย่างชา sample 1 มีค่าเท่ากับ 676.50 μmol

คำนวณ gallic acid equivalent (GAE) ของตัวอย่างชาอื่นๆได้ด้วยวิธีดังกล่าว