

อุปกรณ์แบบกระดาษอย่างง่ายสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา
โดยอาศัยการวัดระยะทาง

ชาวิต สุวรรณไทร

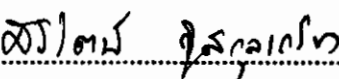
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ธันวาคม 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

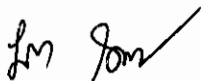
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ธาวิต สุวรรณ ไคร ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

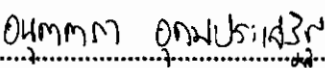

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร.ยuthaporn สมิน้อย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

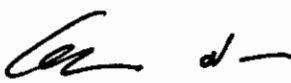

.....ประธานกรรมการ
(ดร.ศิริรัตน์ ชุตกุลเกรียง)


.....กรรมการ
(ดร.ยuthaporn สมิน้อย)


.....กรรมการ
(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)


.....กรรมการ
(ดร.อนุดตรา อุคมประเสริฐ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษิตตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา


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

วันที่ 30 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2554

การวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษาจาก
โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์(สควค.)
จากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ระดับปริญญาโท ปีการศึกษา 2556

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.บุภาพร สมิษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมาส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.อนันต์ อธิพรชัย, ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง และ ดร.อนุตตรา อุดมประเสริฐ ที่ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะที่ดีในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่ให้ทุนการศึกษาในการศึกษาต่อในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อปิยะ คุณแม่ดวง สุวรรณไตรและเพื่อนนิสิตระดับปริญญาโท สควค. สาขาเคมีศึกษาทุกคนที่ให้อาหารใจและสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูคุณเวทิตาแด่บุพการีบูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน ทั้งในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

ชาวิต สุวรรณไตร

56920130: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)

คำสำคัญ: อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ/ สารต้านอนุมูลอิสระ/ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ธาวิต สุวรรณไตร: อุปกรณ์แบบกระดาษอย่างง่ายสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาโดยอาศัยการวัดระยะทาง (A SIMPLE PAPER-BASED DEVICE FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS IN TEA SAMPLES USING DISTANCE-BASED MEASUREMENT) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ยูภาพร สมีน้อย, Ph.D. 76 หน้า. ปี พ.ศ. 2558.

งานวิจัยชิ้นนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายที่สร้างด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์ โดยอาศัยการตรวจวัดแบบการวัดระยะทาง ที่ทำงานร่วมกับอนุภาคนาโนซีเรียในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์และเคมีพื้นผิวบนอนุภาคนาโนซีเรีย ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีส้มน้ำตาล ระยะทางที่เกิดขึ้นจะแปรผัน โดยตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง โดยใช้สารมาตรฐาน epigallocatechin gallate (EGCG) พบว่า ในช่วงความเป็นเส้นตรง 3 ช่วง คือ 0.03-0.30, 0.30-2.00 และ 2.50-10.00 มิลลิโมลาร์ ความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ในช่วงความเป็นเส้นตรงโดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในช่วงร้อยละ 4.3-13 (ซ้ำ 10 ครั้ง) ชัดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.0214 มิลลิโมลาร์และขีดจำกัดการหาปริมาณเท่ากับ 0.0269 มิลลิโมลาร์ จากการศึกษาการวิเคราะห์สารมาตรฐานเทียบกับเทคนิควิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิมพบว่าให้ผลการวิเคราะห์ในแนวโน้มเดียวกัน จากนั้นอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาพร้อมดื่มและชาชงได้อย่างรวดเร็ว จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางมีแนวโน้มสามารถใช้เป็นวิธีคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่สนใจได้

56920130: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)

KEYWORD: PAPER-BASES DEVICE/ ANTIOXIDANT/ ANTIOXIDANT ACTIVITY

THAWIT SUWANNATRAI: A SIMPLE PAPER-BASED DEVICE FOR
ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS IN TEA SAMPLES USING DISTANCE-BASED
MEASUREMENT. ADVISORY COMMITTEE: YUPAPORN SAMEENOI, Ph.D. 76 P. 2015.

A simple paper-based device fabricated using polymer screen-printed method has been developed for antioxidant activity analysis in tea samples using distance-based detection method. The analysis is based on a redox reaction and surface chemistry of nanoceria changing color from colorless to brown. Distance of the color developed is directly proportional to amount of antioxidants. Epigallocatechin gallate (EGCG) was used as a standard antioxidant. The calibration curve was found to be linear in the three ranges including 0.03-0.30, 0.30-2.00 and 2.50-10.00 mM. High reproducibility was observed by the analysis of antioxidant at the concentrations in the linear range-giving relative standard deviation in the range of 4.3-13% (n=10). Limit of detection was 0.0214 mM (n=10) and limit of quantification was 0.0269 mM (n=10). Results obtained from the analysis standard antioxidant compared with those obtained from traditional antioxidant assay gave well correlation results. The paper-based device was then successfully applied for rapid antioxidant analysis in tea samples including ready to drink teas and bagged teas. These results indicated that a simple paper-based device using distance-based measurement detection is promising for screening of antioxidant activity in the interested samples.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
ขอบเขตของการศึกษา.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
อนุมูลอิสระ (free radical).....	4
สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant).....	4
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาเขียว.....	5
Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay.....	8
Curpirc ion reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC).....	9
Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	9
อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	10
การตรวจวัดแบบระยะทางบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	12
อนุภาคนาโนซีเรีย.....	13
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	18
เครื่องมือและอุปกรณ์.....	18
สารเคมี.....	18
การเตรียมสารละลาย.....	19

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	20
การวิเคราะห์ด้วยวิธีตรวจวัดแบบกระดาษ	21
ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น	22
ศึกษาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับ วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบอื่น	24
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษ ที่มีการตรวจวัดแบบวัดกระดาษ	26
4 ผลการวิจัย	27
การศึกษาการวิเคราะห์สารมาตรฐาน epigallocatechin gallate (EGCG) ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น	27
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิม	34
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษ ที่มีการตรวจวัดแบบวัดกระดาษ	39
5 อภิปรายและสรุปผล	46
สรุปผลการวิจัย	46
ข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม	48
ภาคผนวก	50
ประวัติย่อของผู้วิจัย	76

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.10, 0.60, 1.00, 2.50 และ 4.00 มิลลิโมลาร์เพื่อวิเคราะห์หาความสามารถในการทำซ้ำ.....	31
4.2 ตัวอย่างผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิโมลาร์เพื่อวิเคราะห์หาความสามารถในการทำซ้ำ.....	33
4.3 สรุปค่าทางการวิเคราะห์ของอุปกรณ์แบบกระดาษร่วมกับการตรวจวัดแบบการวัดระยะทางในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG.....	34
4.4 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1.00 มิลลิโมลาร์.....	35
4.5 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน DPPH ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์.....	36
4.6 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน FRAP ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1.00 มิลลิโมลาร์.....	37
4.7 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน CUPRAC ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1.00 มิลลิโมลาร์.....	38
4.8 การวิเคราะห์เปรียบเทียบและจัดอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH, FRAP, CUPRAC.....	39
4.9 ผลการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา น้ำพร้อมดื่ม.....	39
4.10 ผลการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชนิดขง.....	40
ก-1 แสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน.....	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข-1 แสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อหาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ	57
ค-1 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ.....	61
ค-2 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.60 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ.....	63
ค-3 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ.....	65
ค-4 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 2.50 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ.....	67
ค-5 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 4.00 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ.....	69
ง-1 แสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ช่วง 2.50-10.00 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา.....	71
จ-1 แสดงรายชื่อตัวอย่างชาทั้งชาน้ำพร้อมดื่มและชาชนิดชง	75

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
2.1		
2.1	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารกลุ่ม catechin และ catechin gallate ester ซึ่งพบได้มาในชาเขียวและค่าในวงเล็บเป็นค่า TEAC.....	6
2.2	โครงสร้างทางเคมีของ epigallocatechin gallate.....	7
2.3	(A) กระจายกรองและรูพรุนในกระจายกรอง (B) วิธีการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) แบบต่าง ๆ.....	12
2.4	(A) วิธีการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระจายที่อาศัยการตรวจวัด ระยะทาง (B) ระยะทางที่เปลี่ยนแปลงที่กับปริมาณของกลูโคสที่มีในตัวอย่าง และวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของ poly(DAB).....	13
2.5	(A) microtiter plate ที่ทำงานร่วมกับกระจายในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระของ gallic acid ด้วยวิธี DPPH (B) รูปร่างของกระจายที่ตัดเป็นวง สำหรับตรึงสารรีเอเจนท์.....	15
2.6	แสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จากการพล็อตความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีเรีย ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ascorbic acid (AA) และ epigallocatechin gallate (EGCG).....	16
2.7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน epigallocatechin gallate (EGCG) กับการเปลี่ยนสีเมื่อทำปฏิกิริยากับ อนุภาคนาโนซีเรียบนกระจาย.....	16
2.8	(A) ขั้นตอนการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำโดยใช้สารละลาย polystyrene พิมพ์ลง ผ่านบล็อกสกรีน (B) อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระจายแบบวัดระยะทางสำหรับการ วิเคราะห์หา H_2O_2 โดยใช้อนุภาคนาโนซีเรียเป็นตัวให้สี (C) กราฟมาตรฐานที่ พล็อตระหว่างระยะทางที่ปรากฏกับความเข้มข้นของ H_2O_2 (D) การวิเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid โดยวิธี DPPH โดยใช้อุปกรณ์แบบหลุม ขนาด 5 mm ที่ความเข้มข้น 0-450 μM (E) กราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่าง gray scale intensity กับความเข้มข้นของ gallic acid.....	17
3.1	การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบวัดระยะทาง.....	21
3.2	ภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อนุภาค นาโนซีเรียแบบวัดระยะทาง.....	22

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.1 การวิเคราะห์หาช่วงความเป็นเส้นตรงโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบ กระดาษวัดระยะทางในช่วงความเข้มข้น EGCG 0.03-0.30, 0.30-2.00, 2.50-10.00 มิลลิโมลาร์.....	28
4.2 กราฟมาตรฐานแสดงการวิเคราะห์สารละลาย EGCG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่มีการตรวจวัดแบบการวัดระยะทาง.....	28
4.3 สัญญาณเป็นระยะทางที่ได้จาก blank.....	30
4.4 สัญญาณเป็นระยะทางที่ได้จาก EGCG ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์.....	30
4.5 ตัวอย่างการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิโมลาร์ ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษที่มีการตรวจวัดแบบการวัดระยะทาง.....	32
ค-1 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ ด้วยการวัดระยะทาง.....	60
ค-2 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.60 มิลลิโมลาร์ ด้วยการวัดระยะทาง.....	62
ค-3 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิโมลาร์ ด้วยการวัดระยะทาง.....	64
ค-4 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 2.50 มิลลิโมลาร์ ด้วยการวัดระยะทาง.....	66
ค-5 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 4.00 มิลลิโมลาร์ ด้วยการวัดระยะทาง.....	68
ง-1 กราฟมาตรฐานในการคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา.....	71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมาคนจำนวนมากได้ให้ความสนใจสารต้านอนุมูลอิสระ เพราะสารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีความสามารถในการต่อต้านโรคมะเร็ง ช่วยป้องกันและส่งเสริมให้สุขภาพดีขึ้น สามารถป้องกันโรคต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวางรวมถึงโรคหัวใจ ช่วยป้องกันริ้วรอยที่จะเกิดขึ้น รวมไปถึงโรคทางระบบประสาท ตัวอย่างเช่น โรคพาร์กินสันส์และโรคอัลไซเมอร์ นักวิทยาศาสตร์และนักระบาดวิทยาได้แนะนำให้บริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เพราะสามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากออกซิเจนที่มีความว่องไวสูง (reactive oxygen species, ROS) และไนโตรเจนที่มีความว่องไวสูง (reactive nitrogen species, RNS) ได้ (Sharpe, Frasco, & Andreescu, 2013)

อนุมูลอิสระ เป็นสารที่ประกอบด้วยอิเล็กตรอนเดี่ยว 1 ตัวหรือมากกว่า ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ถ้ากระบวนการนี้ไม่ถูกยับยั้งโดยสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์ทำให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป และเมื่อปล่อยทิ้งไว้จะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์มากขึ้น การได้รับสารของเซลล์ต่าง ๆ รวมทั้งกระบวนการทำงานที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชันในร่างกาย เช่น คาร์บอนหรือและหมอกควันจากสิ่งแวดล้อมรอบตัว สามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้ ซึ่งอาจไปทำลายไซโทพลาสซึมและอวัยวะเล็ก ๆ ในเซลล์และขัดขวางการซึมผ่านของสารอาหารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ทำให้เซลล์ตายได้ การที่มีการทำลายส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์นั้น โดยปกติจะถูกซ่อมแซมโดยร่างกายอย่างมีประสิทธิภาพแต่ในบางโอกาสซึ่งมักจะมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ร่างกายไม่สามารถซ่อมแซมได้ จึงทำให้เซลล์ถูกทำลายอย่างถาวรทำให้เกิดความแก่ชราและเกิดเป็นโรคเรื้อรังต่าง ๆ ขึ้น เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคมะเร็ง โรคข้อกระดูก และข้ออักเสบจากโรครูมาตอยด์ เป็นต้น ในกรณีเช่นนี้ร่างกายควรได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปเพื่อช่วยเหลือไม่ให้เกิดโรคต่าง ๆ ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อให้ทราบและเป็นแหล่งข้อมูลแก่ผู้บริโภคโดยรวมถึงภาคส่วนที่เกี่ยวข้องต่อไป (ประสงค์ เทียนบุญ, 2553)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาหลากหลายวิธีด้วยกัน เช่น hydroxyl radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP), metal chelating activity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH assay) และ cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) เป็นต้น วิธีการดังกล่าวสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง พืช ผลไม้ และสมุนไพร ได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลการทดลองที่ถูกต้องแม่นยำ แต่จำเป็นต้องทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งต้องพึ่งพาเครื่องมือที่มีขนาดใหญ่และราคาแพง ตัวอย่างเช่น UV-Visible spectrophotometer, gas chromatography, HPLC ผู้ทำการทดลองต้องเป็นผู้ชำนาญการในการวิเคราะห์โดยวิธีนั้น ๆ ใช้สารตัวอย่างปริมาณมากในการวิเคราะห์ บางวิธีใช้เวลานานในการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่าง จึงไม่เหมาะกับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในหลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน ส่งผลให้เกิดความล่าช้าในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper based device) ที่ทำงานร่วมกับอนุภาคนาโนซีเรียโดยอาศัยการตรวจวัดระยะทางเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีข้อดีดังนี้

1. อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ประยุกต์ใช้มีราคาถูก (ราคาน้อยกว่า 1 บาทต่อชิ้น) เนื่องจากใช้กระดาษเป็นวัสดุหลักในการทำอุปกรณ์ และสามารถวัดได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกัน
2. ใช้รีเอเจนต์และปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์น้อยมาก (ระดับ 10 ไมโครลิตร) ทำให้ลดของเสียที่เกิดจากการวิเคราะห์ จึงประหยัดสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในการวิเคราะห์ได้
3. อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ประยุกต์ใช้สามารถตรวจวัดสัญญาณได้จากการวัดระยะทางด้วยไม้มบรทัดจึงไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์ต่อพ่วงที่ซับซ้อนเพื่อวิเคราะห์สัญญาณเหมือนเทคนิคอื่น ๆ
4. อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ประยุกต์ใช้มีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา สามารถพกพาไปตรวจวัดภาคสนามได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางที่ทำงานร่วมกับอนุภาคนาโนซีเรียในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาโดยใช้สาร epigallocatechin gallate เป็นสารมาตรฐาน

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. ทำการวิเคราะห์สารมาตรฐาน epigallocatechin gallate ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษที่มีการตรวจวัดแบบการวัดระยะทางที่ได้พัฒนาขึ้นแล้ว โดยศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity), ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection), ขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of quantification), ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility)
2. ประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างชาที่มีขายในท้องตลาด
3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานของอุปกรณ์เทียบกับวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH, FRAP และ CUPRAC

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางที่ทำงานร่วมกับอนุภาคนาโนซีเรียในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาโดยใช้สาร epigallocatechin gallate เป็นสารมาตรฐาน และเป็นการยืนยันว่าอุปกรณ์ที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลายอย่างพร้อมกันโดยไม่ต้องพึ่งพาเครื่องมือราคาแพงในการตรวจวัด ใช้สารตัวอย่างน้อย มีราคาถูก น้ำหนักเบาและสามารถนำไปตรวจภาคสนามได้อย่างแม่นยำ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว ดังนั้นเพื่อต้องการให้ประจุไฟฟ้าเกิดความสมดุล อนุมูลอิสระจึงไปปรับอิเล็กตรอนจากสารประกอบอื่นในร่างกายซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์ เนื้อเยื่อหรือส่วนสำคัญต่าง ๆ ภายในเซลล์จะถูกทำลาย อะตอมหรือโมเลกุลที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปจะกลายเป็นอนุมูลอิสระเสียเอง ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ แต่อนุมูลอิสระไม่ได้เป็นอันตรายต่อร่างกายไปเสียทั้งหมด อนุมูลอิสระที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันจะทำลายเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย ส่วนอนุมูลอิสระอื่นจะเกี่ยวข้องในการผลิตฮอร์โมนที่สำคัญและกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต ถ้าร่างกายของเราได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อมในปริมาณสูง เช่น หมอกควัน ควันบุหรี่ โลหะหนัก สารที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล รังสีอัลตราไวโอเล็ต จะทำให้ร่างกายของเราได้รับสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ถ้าเกินกว่าความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายกำจัดออกไปได้หมดจะก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา เช่น โรคหลอดเลือดแข็งตัว โรคความจำเสื่อม โรคแก่ก่อนวัย เป็นต้น (กมลวรรณ นันทเพ็ชร, 2543)

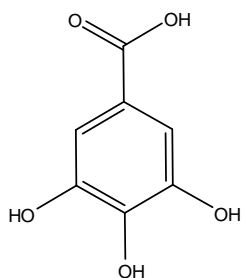
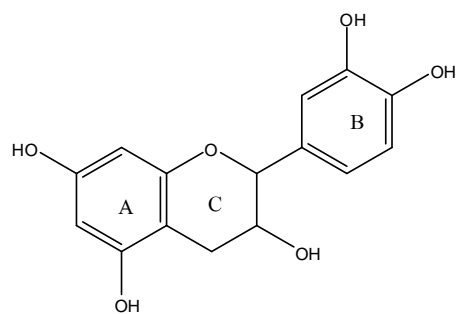
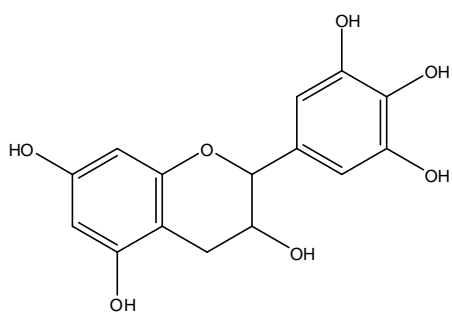
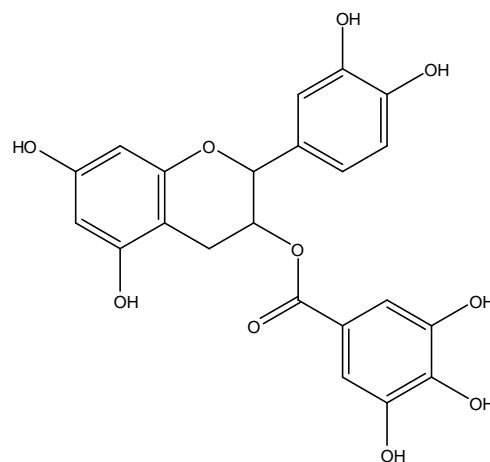
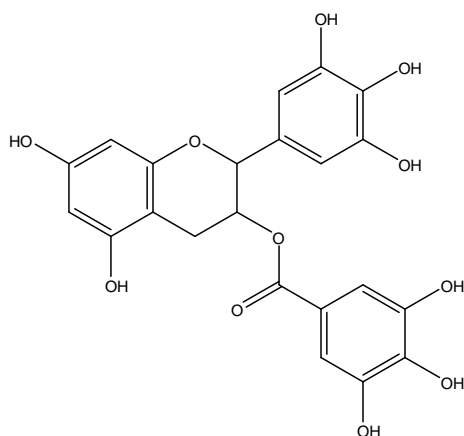
2.2. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารที่มีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

ตามปกติร่างกายที่มีสุขภาพแข็งแรงจะสามารถรักษาระดับของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่พอดี แต่ถ้าระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอหรือร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไปจะทำให้เซลล์ถูกทำลาย การทำลายของอนุมูลอิสระมีผลสะสมในลักษณะที่ไปแทรกแซงการทำงานของเซลล์ ปฏิกริยาเคมี และการสื่อสารทางประสาทระหว่างเซลล์ ขณะเดียวกันก็ไปเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติและโรคที่เกิดจากความจำเสื่อมของร่างกาย เช่น โรคเมเร็ง โรคหัวใจ และโรคข้ออักเสบ ซึ่งเป็นโรคที่พบมาก เมื่อเรามีอายุมากขึ้นอนุมูลอิสระจะสะสมในร่างกายเรามากขึ้น ดังนั้นการรับประทานที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น ผักและผลไม้ต่าง ๆ หรือแม้แต่ชาเขียวจะสามารถช่วยปกป้องเราจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาเขียว

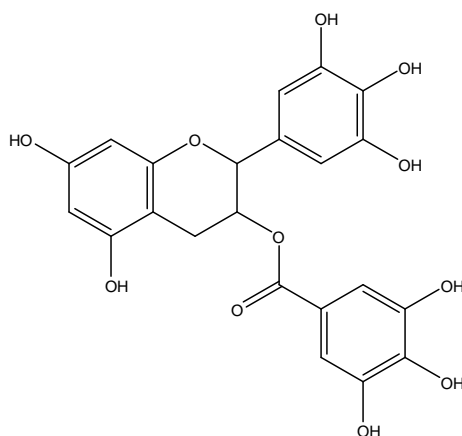
กลุ่มสาร catechins ถือว่าเป็นสารที่สำคัญของพืชตระกูลชา จากภาพที่ 2.1 จะเห็นได้ว่า โครงสร้างหลักของสารกลุ่มนี้เป็น flavan-3-ol ซึ่งวง C ที่แสดงในรูปจะอ้อมตัวไม่มีพันธะคู่ ทำให้อิเล็กตรอนไม่สามารถเคลื่อนที่ไปมาระหว่างวง A และ B ดังนั้น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจึงขึ้นกับจำนวนหมู่ฟีนอลิกในโครงสร้าง โดยสารที่มีจำนวนหมู่ฟีนอลิกมากกว่า จะให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่า ดังจะเห็นได้จากค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) จากการทดสอบด้วยวิธี radical cation decolorization assay (ABTS) ซึ่ง epigallocatechin (TEAC 3.82 mM) จะมีฤทธิ์ดีกว่า catechin (TEAC 2.40 mM) และสารที่เป็น catechin-gallate ester ที่เพิ่มหมู่ gallate เข้าไปที่ตำแหน่ง 3-OH ทำให้มีจำนวนหมู่ฟีนอลิกเพิ่มขึ้นจะมีฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อเรียงลำดับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารกลุ่ม catechins จากมากไปน้อยดังนี้ epigallocatechin gallate ~ epicatechin gallate > epigallocatechin > gallic acid > epicatechin อย่างไรก็ตาม พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารกลุ่ม catechins (TEAC > 2.4 mM) จะมากกว่าของวิตามินอีหรือวิตามินซี (TEAC ~ 1 mM) ประมาณ 2 เท่า

Gallic acid (3.01 ± 0.05 mM)Catechin (2.40 ± 0.05 mM)Epigallocatechin (3.82 ± 0.06 mM)Epicatechin gallate (4.93 ± 0.02 mM)Epigallocatechin gallate (4.75 ± 0.06 mM)

ภาพที่ 2.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี radical cation decolorization assay (ABTS) ของสารกลุ่ม catechin และ catechin gallate ester ซึ่งพบได้มากในชาเขียวและค่าในวงเล็บเป็นค่า TEAC (โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง, 2550)

จากรายงานผลการศึกษาในชาเขียวพบว่า จะมีส่วนประกอบที่เป็น โพลีฟีนอลิกมากกว่า 44 % ในจำนวนนี้เป็นสารในกลุ่ม catechins ถึงประมาณ 26.7 % และค่าที่ได้จากสารสกัดที่เป็นเฉพาะ โพลีฟีนอลิก จะได้ค่า TEAC เท่ากับ 3.36 mM ซึ่งบ่งบอกให้รู้ว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของชาเขียวเกือบ 90 % มาจากสารในกลุ่มนี้ และมีรายงานการวิจัยยืนยันว่าฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ที่ได้จากชาเขียว เกิดมาจากสารกลุ่ม โพลีฟีนอลิก โดยเฉพาะจากสาร epigallocatechin gallate ดังนั้นในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะกล่าวถึงสารต้านอนุมูลอิสระเพียง 1 ชนิดในรายละเอียด คือ epigallocatechin gallate

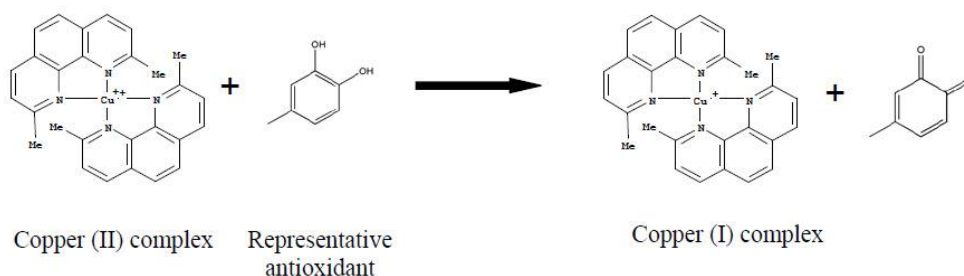
epigallocatechin gallate (EGCG) เป็นสารโพลีฟีนอลิก ในกลุ่มของ catechins มีประโยชน์กับสุขภาพมากที่สุด โดยฤทธิ์ของสารพวกนี้ คือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยจัดการไอออนของ โลหะหนัก, oxygen species และ อนุมูลอิสระ EGCG มีผลยับยั้งการเกิด nitric oxide (NO) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบและการเกิดมะเร็ง โดย EGCG จะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) โดยการลดการสร้าง transcription factor ของ NOS (Hsu et al., 2003)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ Epigallocatechin gallate

2.5 Cupric ion reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC)

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้การทำให้อิออนแดงเปลี่ยนเลขออกซิเดชัน (Apak et al., 2007) ใช้หลักการทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์โดยเลขออกซิเดชันของทองแดงจะเปลี่ยนเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ มีการควบคุมระดับความเป็น pH เท่ากับ 7 เพื่อให้ใกล้เคียงกับความเป็นกรด - เบสในร่างกายของมนุษย์ด้วย acetate buffer สารละลาย CuCl_2 ที่มีสีฟ้าเมื่อเติมสารละลาย neocuproin แล้วทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะให้สีส้มน้ำตาลมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ดังสมการ



2.6 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Angelica, de la Torre, Henderson, Nigam, & Owusu-Apenten, 2015) เป็นการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบแก่อนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ เมื่อรับอิเล็กตรอนแล้วจะเปลี่ยนเป็นสารที่เสถียรอีกทั้งยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระอีกด้วย ในการวิเคราะห์โดยการเตรียม FRAP reagent จาก 300 mM acetate buffer pH 3.6 กับ 20 มิลลิโมลาร์ ferric chloride solution และ 10 มิลลิโมลาร์ 2,4,6-tripyridyl-2-triazine (TPTZ) ผสมในอัตราส่วน (10:1:1) ตามลำดับ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม FRAP reagent ลงในสารสกัดที่มีความเข้มข้น 0.05 mg/ml ในน้ำ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนของแสง ที่ 593 nm คำนวณค่า FRAP value เทียบกับสารมาตรฐาน trolox

จะเห็นได้ว่าวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ต้องทำในห้องปฏิบัติการและกระทำโดยผู้ที่มีความชำนาญการในการตรวจวิเคราะห์นั้น ๆ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานต่อ 1 ตัวอย่าง ใช้สารตัวอย่างในการวิเคราะห์มาก จำเป็นต้องใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง จึงไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่มีอยู่ปริมาณมาก ทำให้เกิดความล่าช้าในการวิเคราะห์เบื้องต้นสำหรับการคัดกรองสารต้าน

อนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้จึงได้ประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางที่ทำงานร่วมกับอนุภาคนาโนซีเรียในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา โดยใช้สาร epigallocatechin gallate เป็นสารมาตรฐาน

2.7 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

การตรวจวิเคราะห์สารในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์หาโลหะหนักในน้ำ ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม หรือแม้กระทั่งการวิเคราะห์สารบ่งชี้ในตัวอย่างของเหลวในทางการแพทย์หรือทางวิทยาศาสตร์สุขภาพเพื่อประกอบการวินิจฉัยโรค ตัวอย่างเช่น เซรัม ปัสสาวะ เลือด หรือสารคัดหลั่งต่าง ๆ ในร่างกายของมนุษย์ส่วนใหญ่จะทำให้ห้องปฏิบัติการ ผู้ที่ทำการวิเคราะห์ต้องเป็นผู้ที่มีความชำนาญการ มีราคาในการวิเคราะห์ค่อนข้างแพงและใช้เวลานานในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง

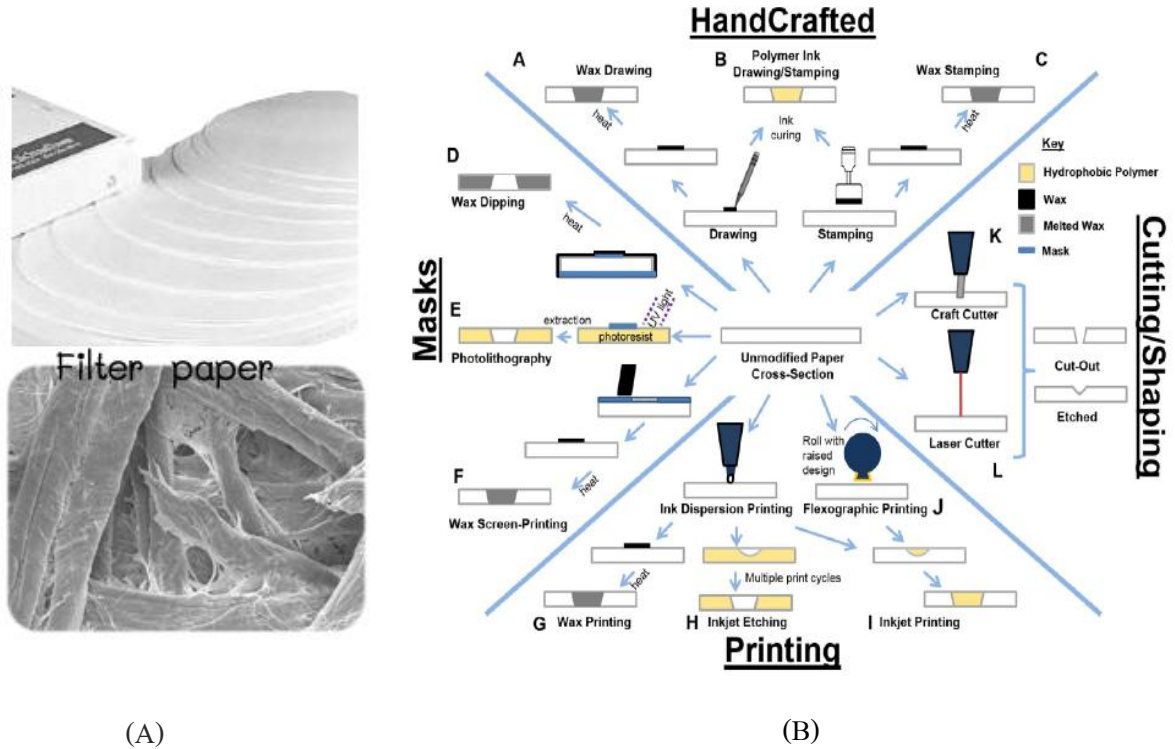
เทคโนโลยีของไหลจุลภาค (microfluidic technology) เป็นเทคโนโลยีที่ว่าด้วยการจัดการกับของไหลปริมาณน้อย ประกอบด้วยท่อระดับจุลภาค (microchannel) ซึ่งเป็นท่อขนาดเล็กสำหรับให้ของเหลวหรือสารละลายประเภทต่าง ๆ ไหลไปได้ในระดับไมโครลิตร โดยขนาดของท่อเหล่านี้จะมีขนาดประมาณเส้นผมของคนเราเท่านั้น โดยมีท่อของไหลจุลภาคเป็นส่วนเชื่อมต่อให้ทั่วถึงกัน (Lisowski & Zarzycki, 2013) ทั้งนี้ได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีดังกล่าวให้เป็นทางเลือกใหม่สำหรับการวิเคราะห์สาร โดยการทำให้กระบวนการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมนั้นมาไว้ในตัวตรวจวัดขนาดเล็กที่เรียกว่าอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาค (microfluidic device) เป้าหมายหลักเพื่อให้การวิเคราะห์ทั้งหมดทุกขั้นตอนเกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดเพียงอันเดียว โดยใช้สารรีเอเจนต์และสารตัวอย่างในปริมาณที่น้อย มีราคาที่ถูก สามารถที่จะพกพาไปใช้ในการตรวจวัดสารในภาคสนามได้ วัสดุที่นิยมใช้ในการสร้างอุปกรณ์การตรวจวัดนั้น ได้แก่ พลาสติก แก้ว (SiO_2) และซิลิกอน แต่ปัจจุบันนั้นได้พบคุณสมบัติบางประการของกระดาษกรอง (filter paper) ที่ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีในการนำมาใช้ทำเป็นอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดได้

กระดาษกรอง (filter paper) เป็นกระดาษที่มีคุณสมบัติที่คัดเลือกอนุภาค หรือสิ่งเจือปนออกจากสารละลาย หรืออากาศโดยการวางแบบตั้งฉากกับทิศทางการไหลของสารละลายที่ต้องการกรอง กระดาษกรองจะมีขนาดของช่องว่างแตกต่างกันไปหลายขนาดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับลักษณะงานแต่ละชนิด คุณสมบัติที่สำคัญของกระดาษกรองประกอบด้วย ความคงทนเมื่อเปียก ขนาดของช่องว่าง ความสามารถในการกรองอนุภาคดังภาพที่ 2.3 (A) อัตราการไหลของสารที่ต้องการกรอง ประสิทธิภาพและความจุ กลไกที่สำคัญในการกรองด้วยกระดาษกรองจะมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ ปริมาตร

(volume) และผิว (surface) โดยแบบปริมาตรอนุภาคจะถูกดักไว้ชั้นในหรือในตัวของกระดาษกรอง ส่วนแบบผิวอนุภาคจะถูกดักไว้ที่ผิวของกระดาษกรอง

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหรืออุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษ (microfluidic paper-based analytical devices) ความหนาของกระดาษปกติอยู่ในระดับไมโครเมตร โดยเป็นวัสดุที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เมื่อจุ่มกระดาษลงในน้ำหรือหยดน้ำลงบนกระดาษน้ำจะซึมไปทั่วกระดาษ สามารถที่จะสร้างช่องขนส่งควบคุมทิศทางการไหลของน้ำไปยังบริเวณที่ต้องการได้ โดยทำให้บางส่วนของกระดาษไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อุปกรณ์ตรวจวัดชนิดนี้มีวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ มีราคาถูก ตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่จะทำให้แนวโน้มที่ตัวตรวจวัดแบบกระดาษนี้จะเป็นที่แพร่หลายสามารถเข้าถึงได้อย่างง่ายดาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนา (Martinez, Phillips, Whitesides, & Carrilho, 2009)

การสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) บนตัวอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีหลายวิธี เช่น วิธีการพิมพ์ด้วยไข (wax printing) การพิมพ์ด้วยหมึก (inkjet printing) การพิมพ์ด้วยแสง (photolithography) การพิมพ์แบบยืดหยุ่น (flexography printing) การพิมพ์ด้วยเครื่องพล็อตเตอร์ (plotter) การปรับสภาพด้วยเลเซอร์ (laser treatment) การปรับสภาพด้วยพลาสมา (plasma treatment) (Cate, Dungchai, Cunningham, Volckens, & Henry, 2013) ดังภาพที่ 2.3 (B) เมื่อสร้างช่องขนส่งของไหลและบริเวณทดสอบบนกระดาษแล้วสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์จะถูกหยดลงบริเวณทดสอบเพื่อเกาะจับบนช่องว่างหรือเส้นใยกระดาษแล้วจึงหยดสารละลายซึ่งมีสารที่จะถูกวิเคราะห์ลงในช่องขนส่งให้ซึมไปยังบริเวณทดสอบ (test zone)



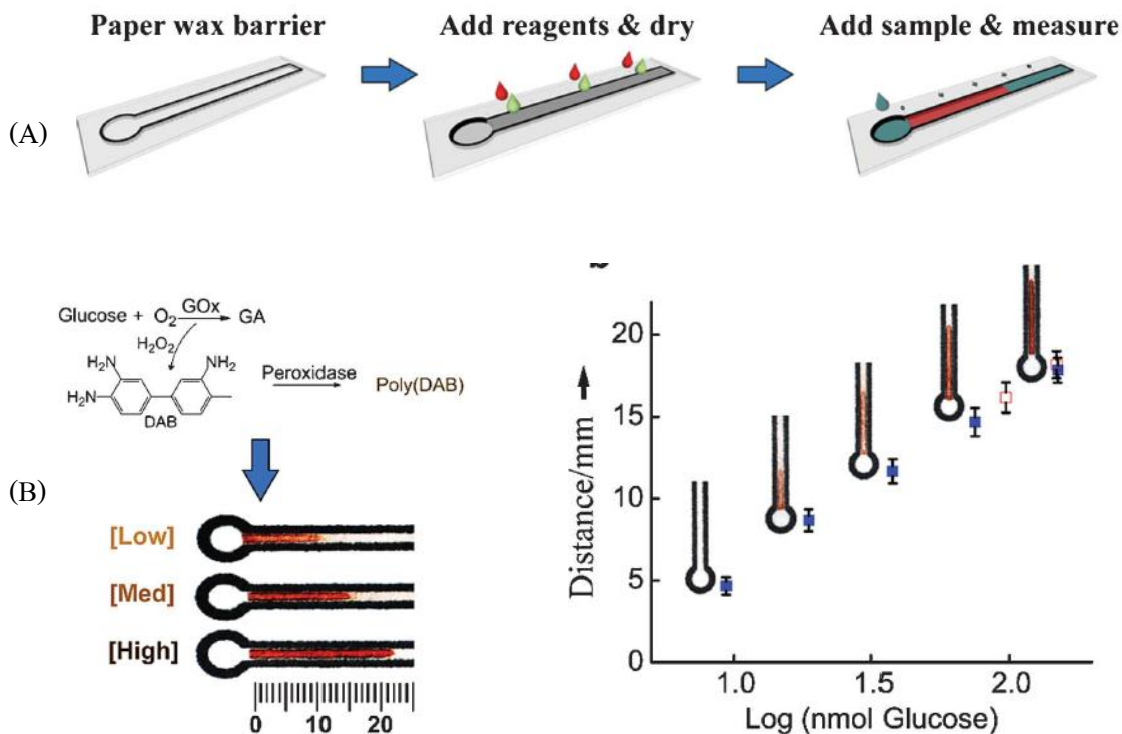
(A)

(B)

ภาพที่ 2.3 (A) กระดาษกรองและรูพรุนในกระดาษกรอง (B) วิธีการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) แบบต่าง ๆ

2.8 การตรวจวัดแบบระยะทางบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

กลุ่มนักวิจัยของ Charles S. Henry ได้ค้นพบวิธีการตรวจวัดแบบใหม่โดยไม่ต้องพึ่งพาเครื่องถ่ายภาพ, เครื่องสแกน และโปรแกรมประมวลผลภาพ (ImageJ) แต่ใช้การตรวจวัดระยะทางสีที่เกิดขึ้นแทน จึงเรียกวิธีการตรวจวัดแบบใหม่นี้ว่า การตรวจวัดด้วยระยะทาง (Cate et al., 2013) ส่วนของการวิเคราะห์สารทำได้โดยการสร้างอุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษให้มีช่องทางสำหรับการตรวจวัดหรือที่เรียกว่าท่อการไหล ดังภาพ 2.4 (A) โดยการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำขึ้นมาโดยใช้วิธีการพิมพ์ด้วยไข แล้วหยดสารรีเอเจนต์ที่มีคุณสมบัติที่สามารถตกตะกอนกับสารตัวอย่างได้ลงในช่องที่สร้างขึ้นเมื่อหยดตัวอย่างลงในช่องใส่ตัวอย่าง (sample zone) สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ไปทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์โดยจะเคลื่อนที่ไปเรื่อย ๆ จนสารตัวอย่างทำปฏิกิริยาหมด ระยะทางของสีที่เกิดขึ้นนั้นจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณสารตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องอาศัยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำให้ลดความผิดพลาดที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2.4 (B)

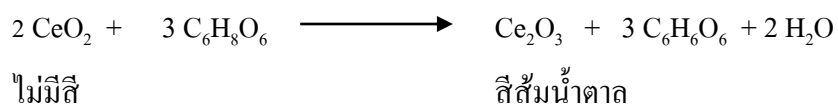


ภาพที่ 2.4 (A) วิธีวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่อาศัยการตรวจวัดระยะทาง (B) ระยะทางที่สีเคลื่อนที่กับปริมาณของกลูโคสที่มีในตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของ poly(DAB)

2.9 อนุภาคนาโนซีเรียม (Sharpe et al., 2013)

อนุภาคนาโนซีเรียม หรือ ซีเรียม (IV) ออกไซด์ (CeO_2 NPs) สามารถใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยอาศัยหลักการการรบกวนพื้นที่ผิวของอนุภาคนาโนซีเรียม ซึ่งจะส่งผลให้เลขออกซิเดชันของอนุภาคนาโนซีเรียมเปลี่ยนไป ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสามารถรีดิวซ์ Ce (IV) เป็น Ce (III) สถานะดังกล่าวจะทำให้มีปริมาณ Ce (III) มากขึ้นกว่าสถานะปกติซึ่งมีทั้ง Ce (IV) และ Ce (III) ผสมกันอยู่แต่ Ce (III) มีปริมาณน้อย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและการเปลี่ยนแปลงเชิงแสงของอนุภาคนาโนและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า กล่าวคือจะเห็นการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีจากไม่มีสีเป็นสีส้มน้ำตาล โดยการเปลี่ยนแปลงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ

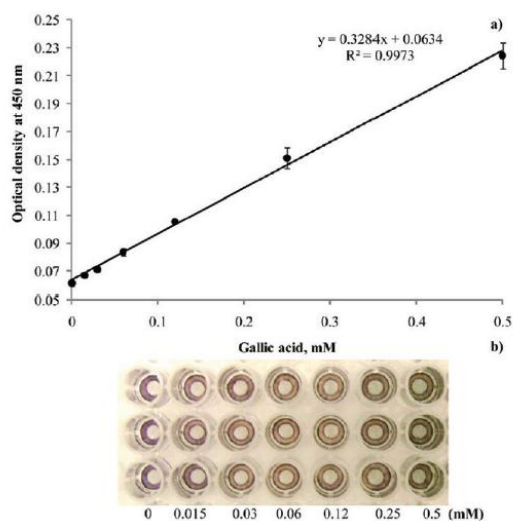
ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (ตัวรีดิวซ์) ตัวอย่างปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid ด้วยอนุภาคนาโนซีเรียเป็นดังสมการ



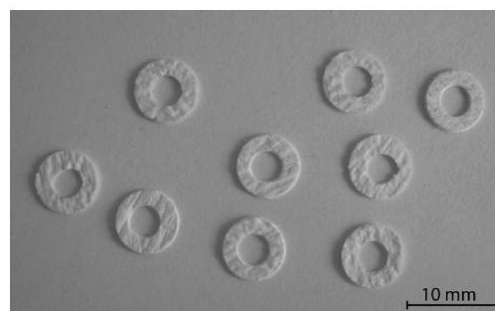
โดยทั่วไปแล้วอนุภาคนาโนซีเรียสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการใช้งานเร่งปฏิกิริยาการเผาไหม้ของเครื่องยนต์และเซลล์เชื้อเพลิง มีการประยุกต์ใช้ในด้านทางการแพทย์โดยพบว่ามีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาคำจัดอนุมูลอิสระและมีความเป็นพิษต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาคลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กลุ่มนักวิจัยของ Piletska พัฒนาอุปกรณ์ microtiter plate ที่ทำงานร่วมกับกระดาษ โดยการตัดกระดาษให้เป็นรูปร่างกลม ดังภาพที่ 2.21 ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านนอกและด้านใน 7 มิลลิเมตร และ 5 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากนั้นจุ่มกระดาษลงไปในสารละลายรีเอเจนต์ DPPH แล้วทำให้แห้งบรรจุแผ่นกระดาษลงไปในหลุมของ microtiter plate จากนั้นเติมสารอนุมูลอิสระทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของ stable DPPH (สีเหลือง) ที่เกิดขึ้นด้วย microplate reader spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 nm วิธีนี้สะดวกในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถวิเคราะห์เพื่อคัดกรองสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็วและไม่จำเป็นต้องเตรียมสารละลาย DPPH ขึ้นมาใหม่ทุกครั้ง ทำให้ลดขั้นตอนการตรวจวัดและสามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังต้องพึ่งพาเครื่องมือที่มีราคาแพง และไม่สามารถที่จะใช้วิธีการนี้ไปตรวจวัดในภาคสนามได้ เนื่องจากเครื่องมือมีขนาดใหญ่และมีราคาแพง (Piletsk, Piletsky, Whitcombe, Chianell, & Piletsky, 2012)



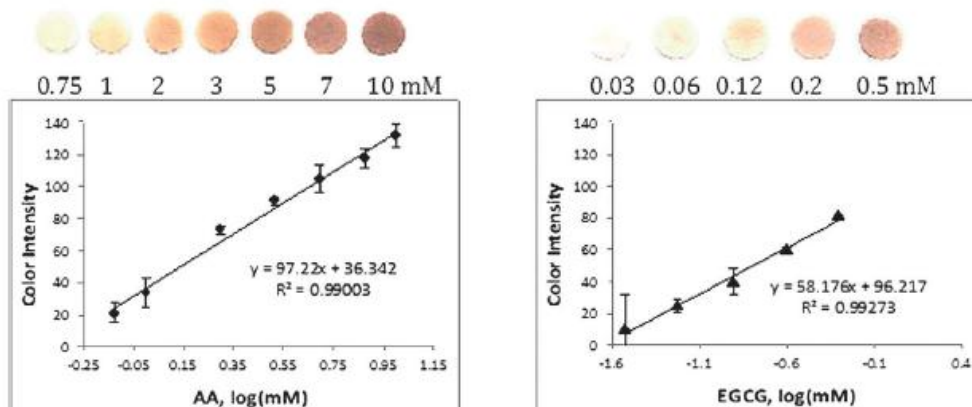
(A)



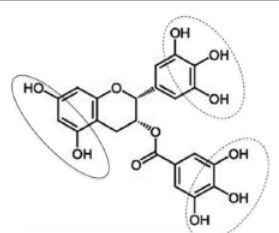
(B)

ภาพที่ 2.5 (A) microtiter plate ที่ทำงานร่วมกับกระดาษในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Gallie acid ด้วยวิธี DPPH (B) รูปร่างของกระดาษที่ตัดเป็นวงสำหรับตรึงสารรีเอเจนท์

Sharpe et al. (2013) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สามารถพกพาได้ โดยใช้ในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในอาหารโดยใช้อุณหภูมิในการเกิดสี ในสภาพปกติ อุณหภูมิของน้ำจะมีความเข้มข้นของ Ce (III) และ Ce (VI) ปะปนกันอยู่ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระจะเกิดการรีดิวซ์ให้อุณหภูมิของน้ำมีความเข้มข้นของ Ce (III) มากยิ่งขึ้น สภาวะดังกล่าวจะทำให้สีของอุณหภูมิของน้ำเปลี่ยนไปจากสีเหลืองอ่อนกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม ในส่วนของการวิเคราะห์ทำได้โดยใช้กระดาษกรองตัดเป็นแผ่นวงกลม แล้วจุ่มลงในสารละลายอุณหภูมิของน้ำจากนั้นจึงเติมสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานได้หลายช่วงความเข้มข้นและสามารถวัดความเข้มข้นโดยใช้โปรแกรมประมวลผลภาพ ทำให้การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและไม่จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการ



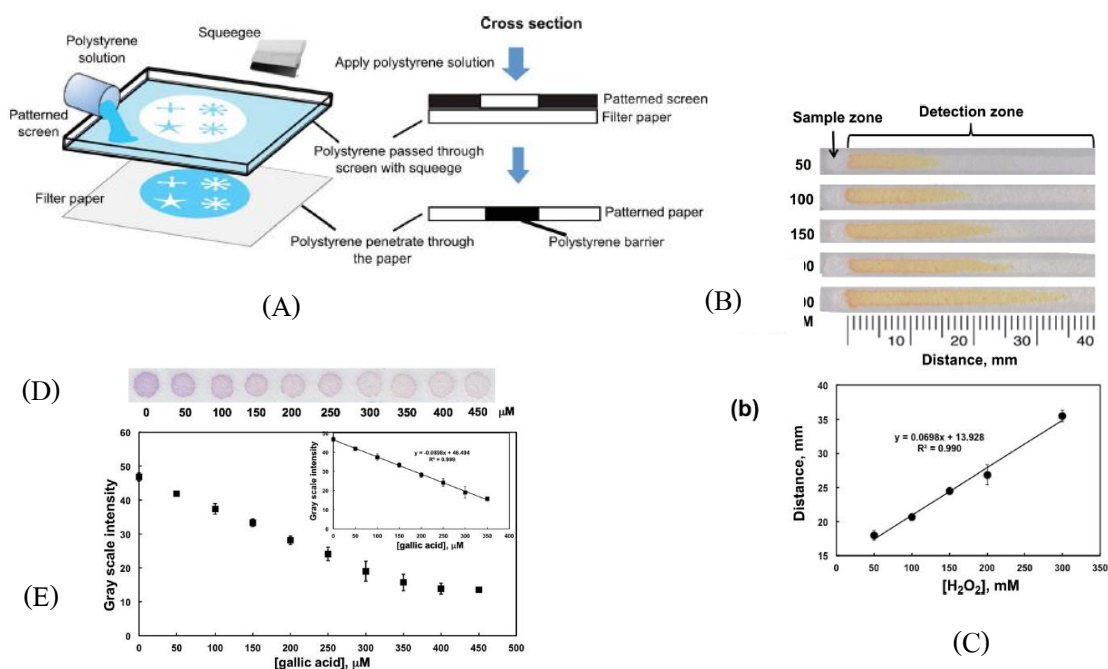
ภาพที่ 2.6 แสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จากการพล็อตความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีเรียที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ascorbic acid (AA) และ epigallocatechin gallate (EGCG)

Antioxidant	Class of polyphenol	Oxidation potential (V)	Ceria sensor GAE	Ceria sensor sensitivity/LOD	Binding ratio ceria : AOX
 EGCG	Flavonoids: <i>flavanols</i> (monomeric: epicatechin (<i>cis</i>); catechin (<i>trans</i>); polymeric: procyanidins)	0.19 (solid)	0.7	58.176/0.02	1 : 8 ± 4
		0.12			

ภาพที่ 2.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน epigallocatechin gallate (EGCG) กับการเปลี่ยนสีเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนซีเรียบนกระดาษ

กลุ่มนักวิจัยของ ดร.ยุภาพร สมีน้อย ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่าย โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนั้นสร้างขึ้นมาจากสารละลาย polystyrene พิมพ์ลงบนกระดาษกรอง เพื่อสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำสามารถสร้างลวดลายแบบต่าง ๆ ได้ รูปร่างสำหรับการตรวจวัดสำหรับงานวิจัยนี้คือ แบบหลุม (well based) สำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid และแบบวัด

ระยะทาง (distance based) สำหรับการตรวจวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในการตรวจวิเคราะห์เมื่อมีการสร้างอุปกรณ์ตรวจแบบกระดาษแล้วจะมีการเพิ่มอนุภาคนาโนซีเรียลงในอุปกรณ์กระดาษที่สร้างขึ้นแล้วจึงหยดสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid ในอุปกรณ์ตรวจวัดแบบหลุม และหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ลงใน sample zone ในอุปกรณ์ตรวจวัดแบบระยะทาง จุดเด่นของวิธีนี้คือสามารถสร้าง hydrophilic channel ที่มีขนาดเล็กได้ และอุปกรณ์ตรวจวัดแบบวัดระยะทางสามารถที่จะวัดระยะทางการเกิดสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนช่องของการไหลซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับปริมาตรสารตัวอย่าง ลดอุปกรณ์ต่อพ่วงทำให้ลดข้อผิดพลาด จากการปรับวัดสีของผู้ศึกษาพบว่าระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (Sameenoi, Nongkai, Nouanthavong, Henry & Nacapricha, 2014) ดังแสดงในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 (A) ขั้นตอนการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำโดยใช้สารละลาย polystyrene พิมพ์ลงบนบล็อกสกรีน (B) อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษแบบวัดระยะทางสำหรับการวิเคราะห์หา H_2O_2 โดยใช้ อนุภาคนาโนซีเรียเป็นตัวให้สี (C) กราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่างระยะทางที่ปรากฏกับความเข้มข้นของ H_2O_2 (D) การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid โดยวิธี DPPH โดยใช้ อุปกรณ์กระดาษแบบหลุมขนาด 5 mm ที่ความเข้มข้น 0 – 450 μM (E) กราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่าง gray scale intensity กับความเข้มข้นของ gallic acid

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, ประเทศไทย)
- 3.1.2 เครื่อง ultrasonic sonicator (Crest-ultrasonics, ประเทศไทย)
- 3.1.3 micro pipette 100 - 1000 μ L, 10 - 100 μ L, 2 - 20 μ L, 0.5 - 10 μ L (Eppendorf Research Plus, Germany)
- 3.1.4 กระดาษกรอง เบอร์ 4 (Whatman International Ltd, China)
- 3.1.5 บล็อกสกรีน
- 3.1.6 ไม้บรรทัด
- 3.1.7 spectrophotometer (Thermoscientific, United States)

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 epigallocatechin gallate (M.W. 458.37 g/mol, Sigma Aldrich CAS 989-51-5)
- 3.2.2 gallic acid (M.W. 170.12 g/mol, Sigma Aldrich CAS 149-91-7)
- 3.2.3 ascorbic acid (M.W. 176.12 g/mol, Sigma Aldrich CAS 50-81-7)
- 3.2.4 nano-ceria dispersion solution (20 wt. % colloidal dispersion in 2.5 % acetic acid) (size=20 nm) (Sigma Aldrich CAS 1306-38-3)
- 3.2.5 toluene (AR grade บริษัท Fluka)
- 3.2.6 polystyrene (ซื้อจากร้านบัณฑิตเครื่องเขียน, ชลบุรี ประเทศไทย)
- 3.2.7 polyethylene glycol (M.W. 600 g/mol, Fluka CAS 25322-68-3)
- 3.2.8 ethanol (M.W. 46.07 g/mol, Emsure CAS 64-17-5)
- 3.2.9 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (M.W. 394.32 g/mol, Sigma Aldrich CAS 1898-66-4)

- 3.2.10 iron (III) chloride (M.W. 270.27 g/mol, Sigma Aldrich CAS 7705-08-0)
- 3.2.11 2,4,6-tripyridyl-3-triazine (M.W.312.33 g/mol,Sigma Aldrich CAS 3682-35-7)
- 3.2.12 hydrochloric acid (AR grade บริษัท Fluka)
- 3.2.13 copper (II) chloride (M.W. 134.45 g/mol, Sigma Aldrich CAS 7447-39-4)
- 3.2.14 neocuproin (M.W. 208.3 g/mol, Sigma Aldrich CAS 484-11-7)

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate

epigallocatechin gallate (M.W. 458.37 g/mol) 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.001 – 10 มิลลิโมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

3.3.2 สารละลายอนุภาคนาโนซีเรียความเข้มข้น 1% w/v

ปีเปตสารละลายอนุภาคนาโนซีเรียความเข้มข้น 20 %w/v ปริมาตร 250 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 4,750 ไมโครลิตร

3.3.3 สารละลาย polyethylene glycol (PEG) ความเข้มข้น 10 mg/mL

เตรียมจากการละลาย polyethylene glycol 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

3.3.4 การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

เตรียม stock DPPH ความเข้มข้น 6.590 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร โดยชั่ง DPPH 0.0026 กรัม ละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์

3.3.5 สารละลายมาตรฐาน iron (III) chloride ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

เตรียมจากการละลาย iron (III) chloride (M.W. 270.27 g/mol) 0.054 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.3.6 สารละลายมาตรฐาน 2,4,6-tripyridyl-3-triazine ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

เตรียมจากการละลาย 2,4,6-tripyridyl-3-triazine (M.W.312.33 g/mol) 0.156 กรัม ละลายในเอทานอล 50 มิลลิลิตร

3.3.7 สารละลายมาตรฐาน acetate buffer ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ pH 3.6

เตรียมจากการละลาย CH_3COONa 3.1 กรัม ใน CH_3COOH 16 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 3.6 โดยสารละลายกรด HCl และสารละลายเบส NaOH

3.3.8 สารละลายมาตรฐาน copper (II) chloride ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

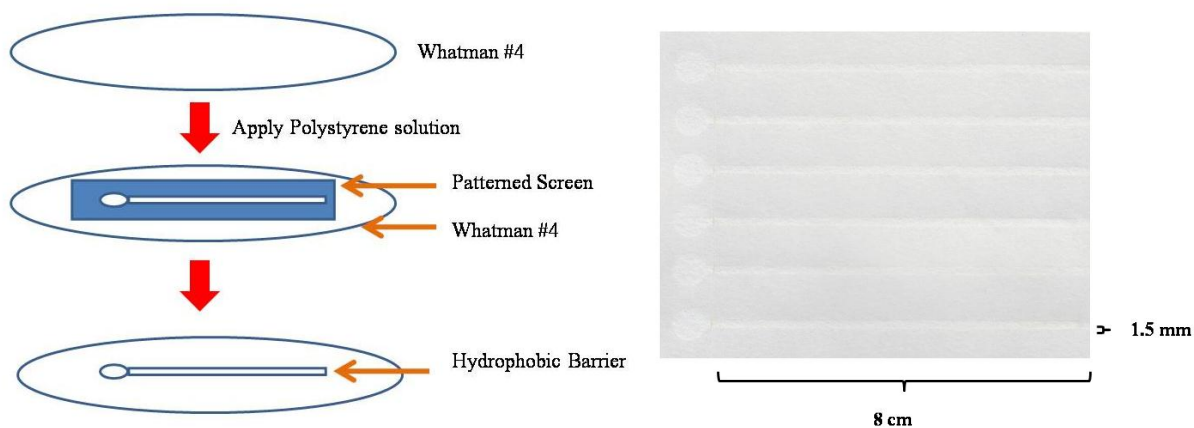
เตรียมจากการละลาย copper (II) chloride (M.W. 134.45 g/mol) 0.4262 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.3.9 สารละลายมาตรฐาน neocuproin ความเข้มข้น 7.5 มิลลิโมลาร์

เตรียมจากการละลาย neocuproin (M.W. 208.3 g/mol) 0.078 กรัม ละลายในเอทานอล 50 มิลลิลิตร

3.4 การเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

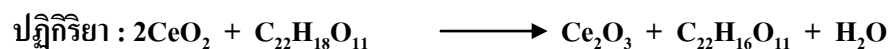
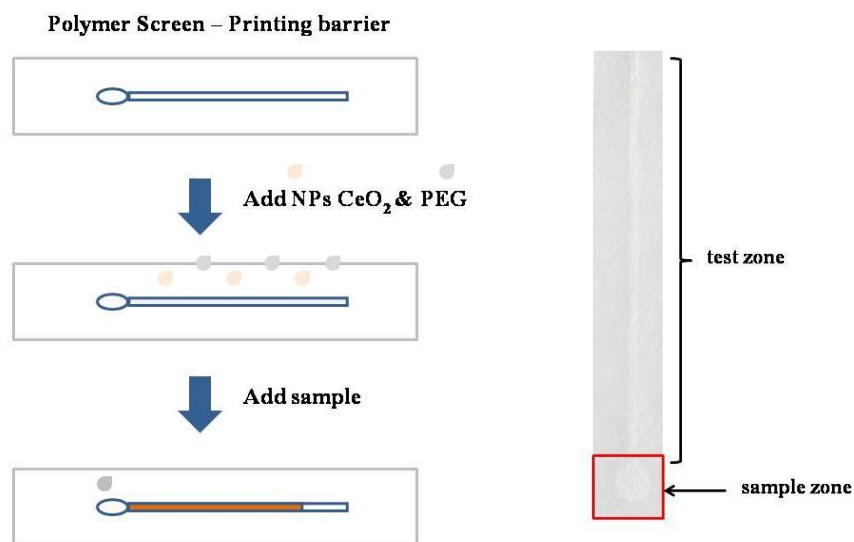
เตรียมโดยการชั่ง polystyrene ละลายด้วย toluene ในอัตราส่วน 12.5 กรัม : 50 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ประมาณ 5 – 10 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเทบนบล็อกลสกรีนที่อยู่บนกระดาษกรอง ปาดสารละลายให้ซึมผ่านสกรีนไปยังกระดาษกรอง แล้วปล่อยให้แห้งประมาณ 5 – 10 นาที ตัดด้านหลังด้วยสก็อตเทป ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารละลายที่นำมาทดสอบ ในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ศึกษาอุปกรณ์แบบกระดาษที่มีรูปร่างแบบระยะทางทำได้โดยสกรีนให้มีลักษณะเป็นช่องดังภาพที่ 3.1 โดยมีความกว้างของช่องเท่ากับ 1.5 มิลลิเมตร ความยาวของช่องเท่ากับ 8 เซนติเมตร กระดาษกรอง 1 แผ่นให้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สามารถตรวจวัดได้ 8 ช่อง



ภาพที่ 3.1 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบวัดระยะทาง

3.5 การวิเคราะห์ด้วยวิธีตรวจวัดแบบระยะทาง

จุ่มบริเวณส่วนตรวจวัดของอุปกรณ์แบบกระดาษลงในสารละลายอนุภาคนาโนซีเรียความเข้มข้น 1% w/v รอจนแห้งหรือใช้ไดร์เป่าให้แห้ง จากนั้นจุ่มลงในสารละลาย polyethylene glycol เข้มข้น 10 mg/mL รอจนแห้งหรือใช้ไดร์เป่า เมื่อต้องการวิเคราะห์ก็ต้่านอนุโมลอิสระให้หยดสารตัวอย่างลงบน sample zone



ภาพที่ 3.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อนุภาคนาโนซีเรีย แบบวัดระยะทาง

3.6 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ที่ได้พัฒนาขึ้น

3.6.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน epigallocatechin gallate

หยดสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.001 - 10 มิลลิโมลาร์ ในบริเวณช่องใส่ตัวอย่างของอุปกรณ์ (sample zone) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหยดน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เพื่อไล่ส่วนที่เหลือให้ไปทำปฏิกิริยากับสารรีเอเจนท์ วัดระยะทางที่เห็นสีและนำไปพล็อตกราฟ

3.6.2 ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

เตรียมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงในบริเวณช่องใส่ตัวอย่างของอุปกรณ์ (sample zone) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหยคน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร 3 ครั้งเพื่อไล่ส่วนที่เหลือให้ไปทำปฏิกิริยากับสารรีเอเจนต์ ทำทั้งหมด 10 ซ้ำแล้วหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

การคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัดโดยใช้สูตร $LOD = 3(S.D.)$ นำค่าที่คำนวณได้จากสูตรไปแทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด

การคำนวณหาขีดจำกัดการหาปริมาณ โดยใช้สูตร $LOQ = 10(S.D.)$ นำค่าที่คำนวณได้จากสูตรไปแทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าขีดจำกัดการหาปริมาณ (Armbruster, Tillman & Hubbs, 1994)

3.6.3 ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของวิธี (reproducibility)

หยดสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.10, 0.60, 1.0, 2.5 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ หยดลงบนบริเวณช่องใส่ตัวอย่างของอุปกรณ์ (sample zone) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและหยคน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร 3 ครั้งเพื่อไล่ส่วนที่เหลือให้ไปทำปฏิกิริยากับสารรีเอเจนต์ โดยทำซ้ำความเข้มข้นละ 10 ครั้ง วัดระยะทางที่เห็นสีและนำไปคำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากสมการ $\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

เมื่อ	$\%RSD$	คือ	เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
	SD	คือ	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	\bar{X}	คือ	ค่าเฉลี่ยผลการทดลอง

3.7 ศึกษาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบอื่น

ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่มีใช้ในปัจจุบัน โดยศึกษาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ epigallocatechin gallate, ascorbic acid และ gallic acid จากนั้นเปรียบเทียบอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดในแต่ละวิธี นำอันดับที่ได้ของแต่ละวิธีมาเปรียบเทียบกัน (interassay comparison) (Sharpe et al., 2013)

3.7.1 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

หยดสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ลงบนบริเวณช่องใส่ตัวอย่างของอุปกรณ์ (sample zone) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและหยดน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร 3 ครั้งเพื่อไล่ส่วนที่เหลือให้ไปทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนซีเรียโดยทำซ้ำ 3 ครั้ง ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนจากสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate เป็นสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid และ gallic acid วัดระยะทางที่เห็นสีและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด

3.7.2 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH

เตรียมสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate, ascorbic acid และ gallic acid แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปิเปตสารมาตรฐานแต่ละชนิดปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ใน ขวด vial จากนั้นเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 1.5 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร ตามด้วยเอทานอลปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ตั้งความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เปรียบเทียบผลที่ได้จากการฟอกจางสี DPPH ของสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 ชนิดและเปรียบเทียบกับอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษแบบวัดระยะทาง

3.7.3 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP

ผสมสารละลาย acetate buffer 10 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลาย FeCl_2 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย TPTZ (2,4,6-tripyridyl-3-triazine) ในสารละลาย 40 มิลลิโมลาร์ ของ HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ปิดฝาสารผสมปริมาตร 1,800 ไมโครลิตร ใส่ในขวด vial จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate, ascorbic acid และ gallic acid ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 140 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้อง 4 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เปรียบเทียบอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ทั้ง 3 ชนิดและเปรียบเทียบกับอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานที่ตรวจวัดด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษแบบวัดระยะทาง

3.7.4 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ CUPRAC

ผสมสารละลาย ammonium acetate buffer 100 มิลลิโมลาร์ pH 7 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร สารละลาย CuCl_2 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลาย neocuproin 7.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในขวด vial จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน epigallocatechin gallate, ascorbic acid และ gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ใส่ในขวด vial ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 453 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เปรียบเทียบอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดและเปรียบเทียบกับอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานที่ตรวจวัดด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษแบบวัดระยะทาง

บทที่ 4

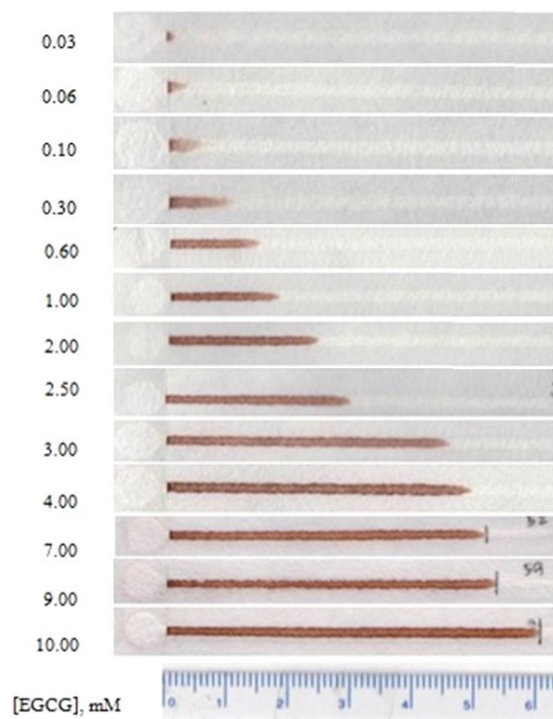
ผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาโดยใช้อุปกรณ์แบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางที่สร้างขึ้นด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์และเคมีพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีเรีย ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะมีการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีส้มน้ำตาล โดยผลการทดลองเป็นดังนี้

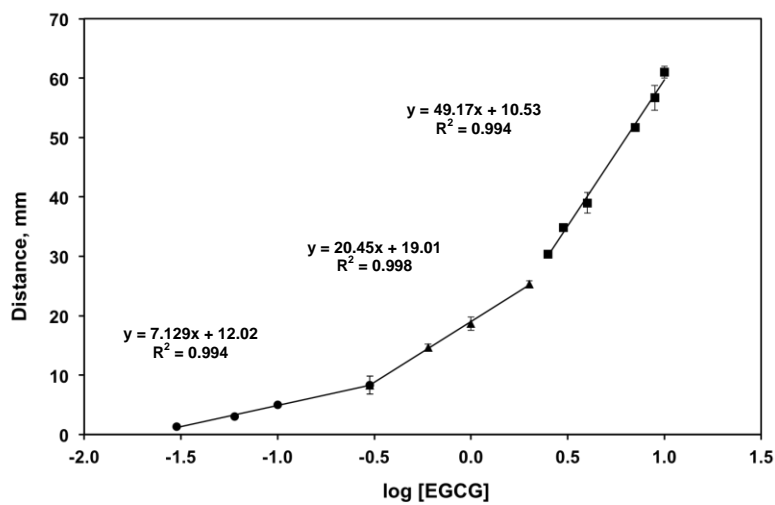
4.1 การศึกษาการวิเคราะห์สารมาตรฐาน EGCG ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

4.1.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG

จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการวิเคราะห์โดยการใส่สารละลายอนุภาคนาโนซีเรียความเข้มข้น 1 % w/v อุณหภูมิ 25 °C เคลือบบนอุปกรณ์แบบกระดาษบริเวณตรวจวัด ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.1 (ตารางที่ ก-1 ภาคผนวก ก) จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้นระยะทางที่ปรากฏสีจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนซีเรียที่เคลือบอยู่บนกระดาษปริมาณมาก เมื่อนำระยะทางที่วัดได้มาพล็อตเทียบกับค่า log ความเข้มข้นของ EGCG จะได้กราฟมาตรฐาน ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.1 การวิเคราะห์หาช่วงความเป็นเส้นตรงโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษวัดระยะทาง ในช่วงความเข้มข้น EGCG 0.03-0.30 , 0.30-2.00 และ 2.50-10.00 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 4.2 กราฟมาตรฐานแสดงการวิเคราะห์สารละลาย EGCG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่มีการตรวจวัดแบบการวัดระยะทาง

จากกราฟมาตรฐานในภาพที่ 4.2 พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 3 ช่วง ช่วงแรก คือ ช่วงความเข้มข้น 0.03 – 0.30 มิลลิโมลาร์ ($y = 7.129x + 12.02$, $R^2 = 0.994$) ช่วงที่สอง คือ ช่วงความเข้มข้น 0.30 – 2.00 มิลลิโมลาร์ ($y = 20.45x + 19.01$, $R^2 = 0.998$) ช่วงที่สาม คือ ช่วงความเข้มข้น 2.50 – 10.00 มิลลิโมลาร์ ($y = 49.17x + 10.53$, $R^2 = 0.994$) ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างสามารถเลือกใช้ช่วงความเป็นเส้นตรงในแต่ละช่วงเพื่อสอดคล้องกับการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในแต่ละตัวอย่างได้อย่างเหมาะสม

4.1.2 ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

การหาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ เนื่องจาก blank ไม่ปรากฏสัญญาณ ดังภาพที่ 4.3 ดังนั้นสามารถหาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณได้โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำที่สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ ในที่นี้คือความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ ลงในบริเวณช่องใส่ตัวอย่างของอุปกรณ์ (sample zone) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหยดน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร 3 ครั้งเพื่อไล่ส่วนที่เหลือให้ไปทำปฏิกิริยากับสารรีเอเจนท์ ทำทั้งหมด 10 ซ้ำแล้ว ดังภาพที่ 4.4 หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) (ตารางที่ ข-1 ภาคผนวก ข) การคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัดโดยใช้สูตร $LOD = 3(S.D.)$ นำค่าที่คำนวณได้จากสูตรไปแทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 7.129x + 12.02$, $R^2 = 0.994$ เพื่อหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด คำนวณหาขีดจำกัดการหาปริมาณคล้ายการคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัดแต่ใช้สูตร $LOQ = 10(S.D.)$ พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยอาศัยการวัดระยะทางมีค่าเท่ากับ 0.0214 มิลลิโมลาร์ และ 0.0269 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (แสดงการคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณอย่างละเอียดในภาคผนวกหัวข้อ การคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ)



ภาพที่ 4.3 สัญญาณเป็นระยะทางที่ได้จาก blank



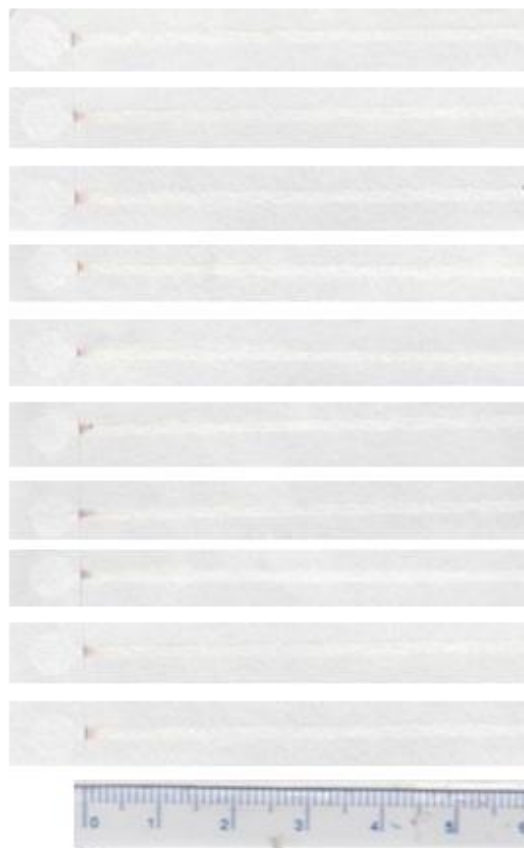
ภาพที่ 4.4 สัญญาณเป็นระยะทางที่ได้จาก EGCG ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์

4.1.3 ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ในการวิเคราะห์ EGCG

ในการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของสารละลายมาตรฐาน EGCG ได้ทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 0.03, 0.10, 0.60, 1.0, 2.5 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ โดยทำซ้ำความเข้มข้นละ 10 ครั้ง ได้ผลดังตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการวิเคราะห์ได้ทีละความเข้มข้นในช่วงความเป็นเส้นตรงทั้งสามช่วง (ภาพที่ ค-1 – ค-5 และตารางที่ ค-1 – ค-5 ในภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.10, 0.60, 1.0, 2.5 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ เพื่อวิเคราะห์หาความสามารถในการทำซ้ำ

[EGCG],mM	ระยะทางเฉลี่ย (mm)	S.D.	%RSD
0.03	2.1	0.16	7.6%
0.10	3.9	0.52	13%
0.60	9.5	0.47	4.9%
1.00	14.4	1.43	9.9%
2.50	29.4	1.54	5.2%
4.00	36.8	1.57	4.3%



ภาพที่ 4.5 ตัวอย่างการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ ECG ที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิโมลาร์ ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษที่มีการตรวจวัดแบบการวัดระยะทาง

ตารางที่ 4.2 ตัวอย่างผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิโมลาร์ เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการทำซ้ำ

[EGCG],mM	ครั้งที่	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
0.03	1	2.0	2.1	0.16
	2	2.5		
	3	2.0		
	4	2.0		
	5	2.0		
	6	2.0		
	7	2.0		
	8	2.0		
	9	2.0		
	10	2.0		

จากค่า %RSD ของการวิเคราะห์สารมาตรฐาน EGCG พบว่าให้ค่าอยู่ในช่วง 4.27 – 13.33% แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบวัดระยะทางให้การวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการทำซ้ำที่ดีในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการตรวจแบบวัดระยะทางได้ค่าทางการวิเคราะห์ (analytical figures of merit) สรุปดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 สรุปค่าทางการวิเคราะห์ของอุปกรณ์แบบกระดาษร่วมกับการตรวจวัดแบบการวัดระยะทาง ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG

ค่าทางการวิเคราะห์	EGCG
ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range)	0.03 – 0.30 มิลลิโมลาร์, 0.30 – 2.00 มิลลิโมลาร์ และ 2.50 – 10.00 มิลลิโมลาร์
ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD)	0.0214 มิลลิโมลาร์
ขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of quantification, LOQ)	0.0269 มิลลิโมลาร์
%RSD	4.3-13%

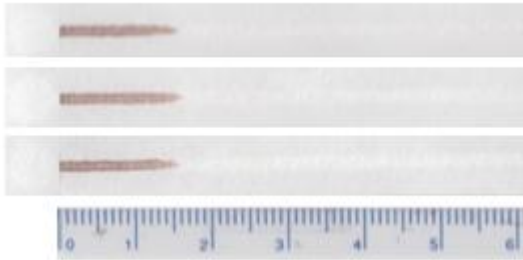
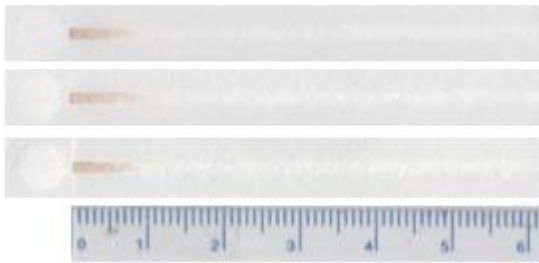
จะเห็นได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีระบบการตรวจวัดแบบวัดระยะทางบนอุปกรณ์แบบกระดาษที่ประยุกต์ใช้สามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารมาตรฐานได้ดี ง่ายต่อการวิเคราะห์ผลเพียงแค่ว่าใช้ไม้บรรทัดในการวัดระยะทาง ไม่ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการวิเคราะห์ ไม่ต้องทำในห้องปฏิบัติการ ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ทันสมัยและมีราคาแพง และสามารถนำอุปกรณ์ไปตรวจวัดภาคสนามได้ ด้วยข้อดีที่กล่าวมาข้างต้น ในขั้นตอนต่อไปของงานวิจัยนี้จะได้ศึกษาความสามารถของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิมและจากนั้นจะได้นำเอาอุปกรณ์ดังกล่าวไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาทั้งที่เป็นชาผงสำหรับชงและชาพร้อมดื่มที่มีวางขายตามท้องตลาดทั่วไป

4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิม

4.2.1 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นทำได้โดยใช้สารละลายมาตรฐานในการเปรียบเทียบ 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ วัดระยะทางที่เห็นสีและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

สารมาตรฐาน	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.	อันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
EGCG		16.3	0.58	1
gallic acid		12.3	0.58	2
ascorbic acid		9.3	0.58	3

ผลจากการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษของสารมาตรฐาน 3 ชนิด พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเรียงจากมากไปน้อย คือ EGCG, gallic acid และ ascorbic acid ตามลำดับ โดยพิจารณาจากระยะทางที่เคลื่อนที่ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด

4.2.2 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธี DPPH

ผลจากการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน DPPH ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 4.5 พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเรียงจากมากไปน้อย คือ EGCG, gallic acid และ ascorbic acid ตามลำดับ ทั้งนี้การวิเคราะห์อันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วง ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน แล้วกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากสีม่วงของ DPPH ก็จะจางลงมากจนเป็นสีเหลืองมาก ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 519 nm ลดลง ดังนั้นจึงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานที่เตรียมที่ความเข้มข้นเท่ากันเรียงจากอันดับที่ 1 - 3 จากค่าการดูดกลืนแสงได้ โดยอันดับที่ 1 จะมีค่าการดูดกลืนแสงน้อยที่สุดและอันดับที่ 3 จะมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน DPPH ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

สารมาตรฐาน	Absorbance (519 nm)				อันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
EGCG	0.536	0.508	0.512	0.519 ± 0.015	1
gallic acid	0.632	0.647	0.630	0.636 ± 0.009	2
ascorbic acid	0.708	0.735	0.741	0.728 ± 0.018	3

4.2.3 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธี FRAP

ผลจากการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน FRAP ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 4.6 พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเรียงจากมากไปน้อย คือ EGCG, gallic acid และ ascorbic acid ตามลำดับ ทั้งนี้สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 nm โดยถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากก็

จะปรีดิควซ์ Ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} - TPTZ) ให้อยู่ในรูป Fe^{2+} ทำให้สารละลายมีสีเข้มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงจึงมากขึ้นตามลำดับ ดังนั้นจึงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเรียงจากมากไปน้อยโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน FRAP ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

สารมาตรฐาน	Absorbance (596 nm)				อันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
EGCG	0.343	0.386	0.378	0.369 ± 0.023	1
gallic acid	0.232	0.264	0.246	0.247 ± 0.016	2
ascorbic acid	0.008	0.011	0.006	0.008 ± 0.003	3

4.2.4 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธี CUPRAC

ผลจากการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน CUPRAC ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 4.7 พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลของสารมาตรฐานเรียงจากมากไปน้อย คือ EGCG, gallic acid และ ascorbic acid ตามลำดับ โดยอาศัยหลักการที่สารต้านอนุมูลอิสระปรีดิควซ์ทองแดงใน copper (II)-neocuproine complex กลายเป็นสีส้ม น้ำตาลที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 453 nm ของสารประกอบ copper (I)-neocuproine complex ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากค่าการดูดกลืนแสงก็จะมีค่าเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเรียงจากมากไปน้อยโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยวิธีมาตรฐาน CUPRAC ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

สารมาตรฐาน	Absorbance (453 nm)				อันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
EGCG	0.830	0.834	0.816	0.827 ± 0.009	1
gallic acid	0.263	0.266	0.259	0.263 ± 0.004	2
ascorbic acid	0.029	0.021	0.028	0.026 ± 0.004	3

จากการทดลองข้างต้นเกี่ยวกับการศึกษาความสามารถและความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ประยุกต์ใช้ ได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบและจัดอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานสามชนิด ได้แก่ EGCG, ascorbic acid และ gallic acid กับวิธีการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิมคือ FRAP, CUPRAC และ DPPH ได้ผลสรุปดังตารางที่ 4.8 จากตารางพบว่าอันดับของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 3 ชนิดที่วิเคราะห์ได้จากวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 4 วิธีมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ EGCG มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดและ ascorbic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยอาศัยการวัดระยะทางที่ได้ประยุกต์ใช้ให้การวิเคราะห์ไปในแนวโน้มเดียวกันกับวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิม มีแนวโน้มสามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างได้อย่างถูกต้องเทียบเท่ากับวิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม

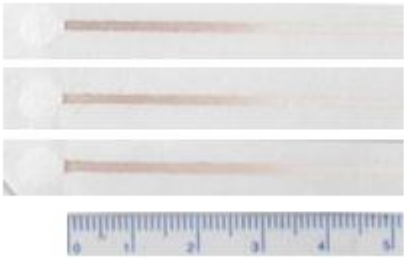
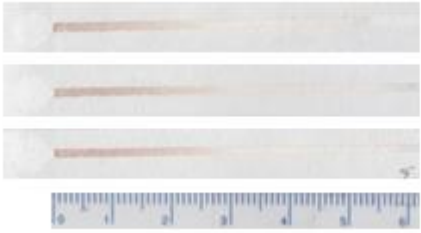
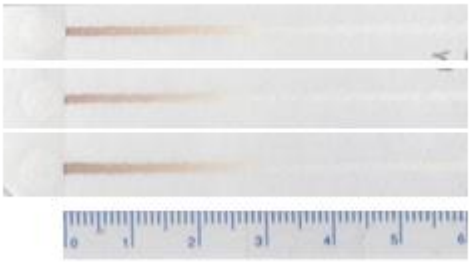
ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์เปรียบเทียบและจัดอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบ
กระดาศที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH, FRAP และ
CUPRAC

	Distance-base assay	FRAP	CUPRAC	DPPH
principle	Nanoceria surface reduction (Ce^{4+}/Ce^{3+})	Fe^{3+} reduction	Cu^{2+} reduction	Radical scavenging
EGCG	1	1	1	1
gallic acid	2	2	2	2
ascorbic acid	3	3	3	3

4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาด้วยอุปกรณ์แบบกระดาศที่มีการ ตรวจวัดแบบวัดระยะทาง

ในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาใช้ความเข้มข้นของสารละลาย
อนุภาคนาโนซีเรียเข้มข้น 1% w/v ที่อุณหภูมิ 25 °C ใช้ตัวอย่างชาสองประเภท คือ ชาชนิดชงและชาน้ำ
พร้อมดื่มโดยใช้ปริมาตรสารตัวอย่างชา 20 ไมโครลิตร แล้วทำการตรวจวัดระยะทาง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้
มาคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน EGCG (EGCG equivalent,
 $\mu\text{molEGCG/mL}$ หรือ $\mu\text{molEGCG/g}$) โดยได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.9 และ 4.10

ตารางที่ 4.9 ผลการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชนิดน้ำพร้อมดื่ม

ยี่ห้อ	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.	EGCGE (μmol EGCG/mL sample)
Sample1		34.7	2.08	3.65
Sample2		28.7	1.53	2.76
Sample3		27.7	1.53	2.63

จากการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชนิดน้ำ 3 ยี่ห้อ พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาชนิดน้ำยี่ห้อ sample1 มีมากที่สุด ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาชนิดน้ำยี่ห้อ sample3 มีน้อยที่สุด

ตัวอย่างการคำนวณหาค่าสมมูล EGCG (EGCG equivalent, EGCGE) ของชาชนิดน้ำพร้อมดื่ม

ชาพร้อมดื่มยี่ห้อ : sample1

ระยะทางการเคลื่อนที่เฉลี่ย เท่ากับ 34.7 mm

แทนค่า y ในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน EGCG

$$\begin{aligned} y &= 49.50x + 6.851 \\ 34.7 &= 49.50x + 6.851 \\ 27.819 &= 49.50x \\ x &= 0.562 = \log[\text{EGCG}] \\ [\text{EGCG}] &= 3.56 \text{ mM} \end{aligned}$$

คำนวณ mmol ของ EGCG (ใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์)

$$\begin{aligned} &= (3.65 \text{ mmol}/1,000 \text{ mL})(1\text{mL}/1,000\mu\text{L})(20 \mu\text{L}) \\ &= 7.3 \times 10^{-5} \text{ mmol} \end{aligned}$$

ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ 20 ไมโครลิตร คิดเป็นหน่วย มิลลิลิตร

$$= (20 \mu\text{L})(1\text{mL}/1,000\mu\text{L}) = 0.02 \text{ mL}$$

หาค่าสมมูล EGCG (EGCGE)

$$\text{EGCGE} = 7.3 \times 10^{-5} \text{ mmol} / 0.02 \text{ mL}$$

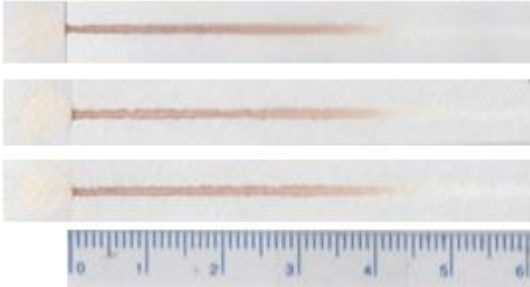

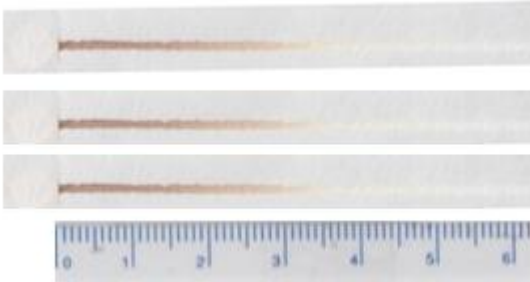
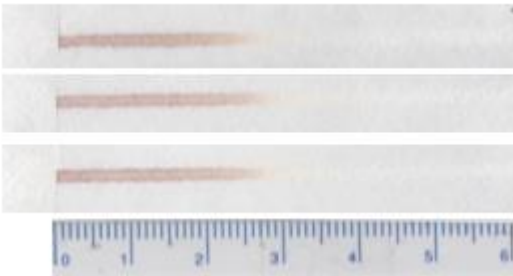
$$\text{EGCGE} = 3.65 \times 10^{-3} \text{ mmol/mL}$$

$$\text{EGCGE} = 0.00365 \text{ mmol/mL}$$

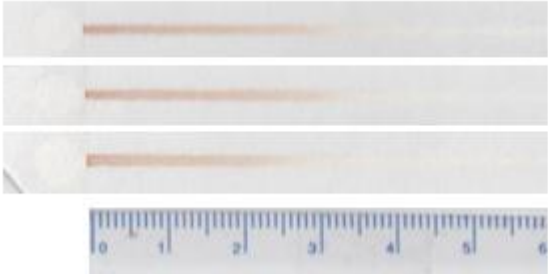
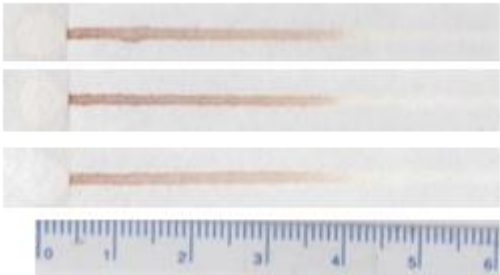
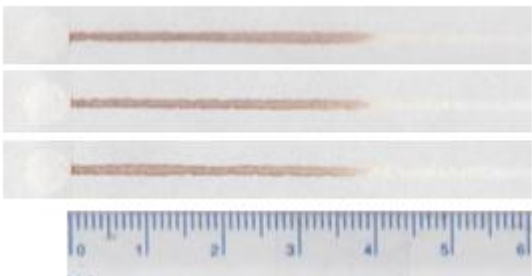
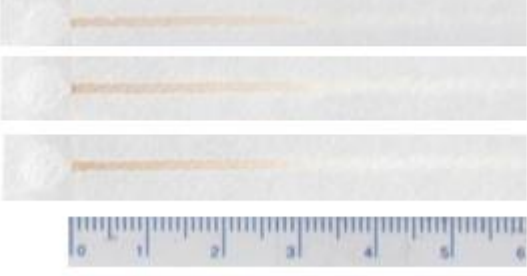
$$\text{EGCGE} = 3.65 \mu\text{mol/mL}$$

ดังนั้นตัวอย่างชาพร้อมดื่มยี่ห้อ sample1 มีค่า EGCGE = 3.65 $\mu\text{mol/mL}$ นั่นคือ ชายี่ห้อ sample1 ปริมาตร 1 mL มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ EGCG 3.65 μmol

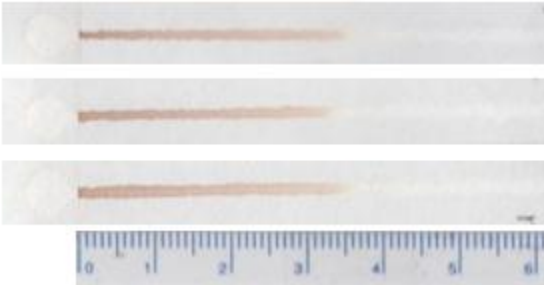
ตารางที่ 4.10 ผลการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชนิดขง

ชื่อยี่ห้อ	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.	EGCGE ($\mu\text{mol EGCG/g sample}$)
sample4		45.7	1.15	610.00
sample5		36.3	0.58	395.00
sample6		36.7	1.53	399.90
sample7		29.3	0.58	288.40

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

ชื่อยี่ห้อ	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.	EGCGE (μmol EGCG/g sample)
sample8		34.7	0.58	338.00
sample9		37.0	1.00	406.40
sample10		40.0	0.00	467.80
sample11		34.3	0.58	358.90

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

ยี่ห้อ	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.	EGCGE (μmol EGCG/g sample)
sample12		35.0	1.00	370.70

จากการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชนิดขง 9 ยี่ห้อ พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาชนิดขง ยี่ห้อ sample4 มีมากที่สุด ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาชนิดขงยี่ห้อ sample7 มีน้อยที่สุด

ตัวอย่างการคำนวณหาค่าสมมูล EGCG (EGCG equivalent, EGCGE) ของชาชนิดขง

ชาชนิดขง ยี่ห้อ : sample4

ระยะทางการเคลื่อนที่เฉลี่ย เท่ากับ 45.7 mm

แทนค่า y ในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน EGCG

$$\begin{aligned} y &= 49.50x + 6.851 \\ 45.7 &= 49.50x + 6.851 \\ 27.819 &= 49.50x \\ x &= 0.784 = \log[\text{EGCG}] \\ [\text{EGCG}] &= 6.081 \text{ mM} \end{aligned}$$

คำนวณ mmol ของ EGCG (ใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์)

$$\begin{aligned} &= (6.081 \text{ mmol}/1,000 \text{ mL})(1\text{mL}/1,000\mu\text{L})(20 \mu\text{L}) \\ &= 1.22 \times 10^{-4} \text{ mmol} \end{aligned}$$

ใช้ตัวอย่างชา 2 กรัม นำไปต้ม 5 นาที ในน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 20 ไมโครลิตร คิดเป็นหน่วย กรัม

$$= (2\text{g}/200\text{mL})(1\text{mL}/1,000\mu\text{L}) (20 \mu\text{L}) = 2 \times 10^{-4} \text{ g}$$

หาค่าสมมูล EGCG (EGCGE)

$$\text{EGCGE} = 1.22 \times 10^{-4} \text{ mmol} / 2 \times 10^{-4} \text{ g}$$

$$\text{EGCGE} = 0.610 \text{ mmol/g}$$

$$\text{EGCGE} = 610 \mu\text{mol/g}$$

ดังนั้นตัวอย่างชาชนิดขงยี่ห้อ sample4 มีค่า EGCGE = 610.00 $\mu\text{mol/g}$ นั่นคือ sample4 จำนวน 1 กรัม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ EGCG 610 μmol

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางที่สร้างด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์ โดยทำงานร่วมกับอนุภาคนาโนซีเรียในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถวัดได้จากการวัดระยะทางที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีส้มน้ำตาล โดยเบื้องต้นได้ทำการศึกษาโดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระคือ EGCG เป็นสารมาตรฐาน ตัวอย่างชาที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ชาชนิดน้ำพร้อมดื่ม 3 ยี่ห้อและชาชนิดชง 9 ยี่ห้อ รวมทั้งหมด 12 ยี่ห้อ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชารายงานเป็นค่า EGCG equivalent (EGCGE)

ผลของการทดลองใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางโดยเพื่อการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรง 3 ช่วง คือ ช่วงแรก คือ ช่วงความเข้มข้น 0.03 – 0.30 มิลลิโมลาร์ ช่วงที่สอง คือ ช่วงความเข้มข้น 0.30– 2.00 มิลลิโมลาร์ ช่วงที่สาม คือ ช่วงความเข้มข้น 2.50–10.00 มิลลิโมลาร์ ซึ่ดจำกัดการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 0.0214 มิลลิโมลาร์ ซึ่ดจำกัดการหาปริมาณ มีค่าเท่ากับ 0.0269 มิลลิโมลาร์ ความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ EGCG ความเข้มข้นในช่วงกราฟมาตรฐานให้ค่า %RSD เท่ากับ 4.3-13% (n=10)

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบและจัดอันดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด เทียบกับวิธีการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิม คือ FRAB, CUPRAC และ DPPH พบว่า อันดับของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นไปในแนวโน้มนเดียวกัน ผลจากการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางมีแนวโน้มนสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่สนใจได้

การทดสอบตัวอย่างชา อุปกรณ์ดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งตัวอย่างชาชนิดชงและชาน้ำพร้อมดื่ม

จากผลการทดลองพบว่า การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดระยะทางที่สร้างด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์ โดยทำงานร่วมกับอนุภาคนาโนซีเรียในการ

ตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชานี้ สามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาได้อย่างรวดเร็ว เหมาะกับการนำไปใช้ในการคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายตัวอย่างพร้อมกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาทดลองคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอื่น ๆ เช่น ในน้ำผลไม้ หรือพืชชนิดต่าง ๆ
2. ควรศึกษาวิธีการตรวจวัดระยะทางในกรณีที่มีความเข้มข้นน้อยมาก ๆ ที่ทำให้ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไม่ถึง 1 mm
3. ควรศึกษาผลของสารรบกวน (interference) ที่มีต่อการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

บรรณานุกรม

- กมลวรรณ (กุหลาบวงษ์) นันทเพ็ชร. (2543). Fighting Free Radicals : Antioxidants to the Rescue. วารสาร Healthy & Natural, 7(3), 34 – 42.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 21(3), 275-286.
- ประสงค์ เทียนบุญ. (2553). บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. วารสารคลินิกอาหารและโภชนาการ (วคอก), 4(2), 69-76.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ. พี.เอส.พริ้นท์. กรุงเทพฯ.
- Angelica S, A., de la Torre, B., Henderson, T., Nigam, P. S., & Owusu-Apenten, R. (2015). A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chemistry*, 174, 119-123.
- Apak, P., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., & Özyurt, D.(2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Armbruster, D. A., Tillman, M. D., & Hubbs, L. M., (1994). Limit of Detection (LOD)/ Limit of Quantitation (LOQ) Comparison of the Empirical and the Statistical Methods Exemplified with GC-MS Assays of Abused Drugs. *Laboratory Management and Utilization*, 40(7), 1233-1238.
- Cate, D, M., Dungchai, W., Cunningham, J. C., Volckens, J., & Henry, C. S. (2013). Simple, distance-based measurement for paper analytical devices. *Lab Chip*, 13(12), 2397-2404.
- Hsu, S., Bollag, W., Lewis, J., Huang, Q., Singh, B., Sharawy, M., Yamamoto, T., & Schuster, G., (2003). Green Tea Polyphenols Induce Differentiation and Proliferation in Epidermal keratinocytes. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(1), 29-34.

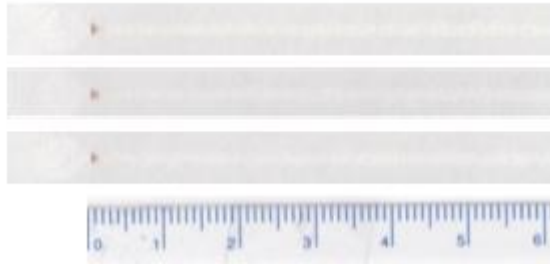


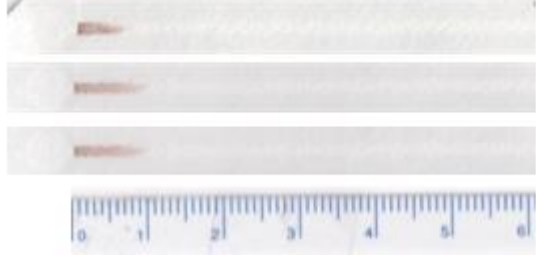
- Lisowski, P., & Zarzycki, P. K. (2013). Microfluidic Paper-based Analytical Devices (μ PADS) and Micro Total Analytical Systems (μ TAS) : Development, Applications and Future Trends. *Chromatographia*, 76, 1201-1214.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., & Carrilho, E. (2009). Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*, 82(1), 3-10.
- Milardovic', S., Ivekovic, D., & Grabaric', B. S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68, 175-180.
- Piletsk, E. V., Piletsky, S. S., Whitcombe, M. J., Chianell, I., & Piletsky, S. A. (2012). Development of a New Micrometiter Plate Format for Clinically Relevant Assays. *Analytical chemistry*, 84(4), 2038-2043.
- Sharpe, E., Frasco, T., Andreescu, D., & Andreescu, S. (2013). Portable ceria Nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidant (nanoCerec). *Analyst*, 138, 249-262.
- Sameenoi, Y., Nongkai, N. N., Nouanthavong, S., Henry, C. S. & Nacapricha, D. (2014). One-step polymer screen-printing for microluidic paper-based analytical (μ PAD) fabrication. *Analyst*, 139, 6580-6588.

ภาคผนวก

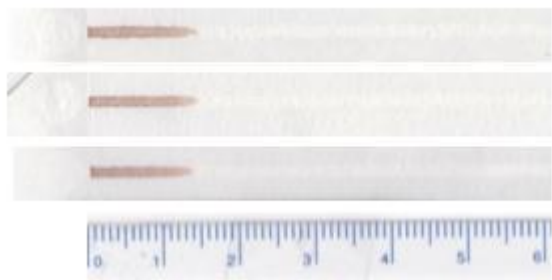
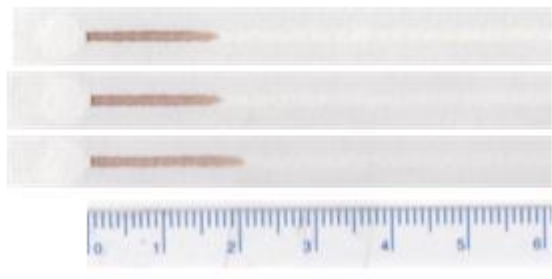
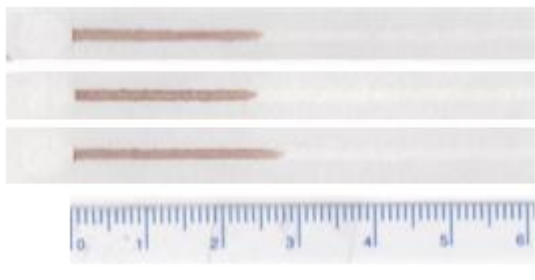
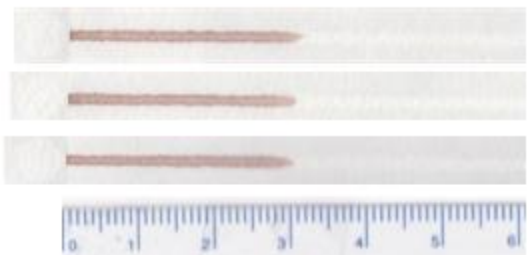
ภาคผนวก ก

ตารางแสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน ECGG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

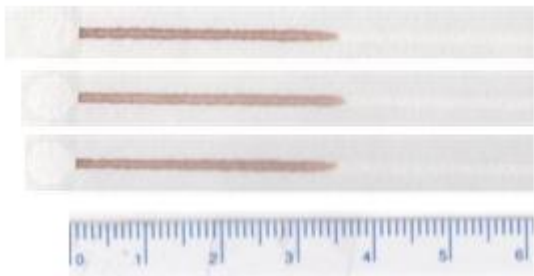
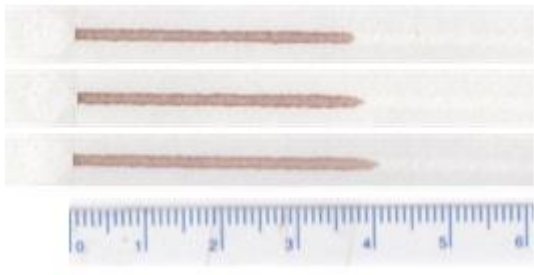
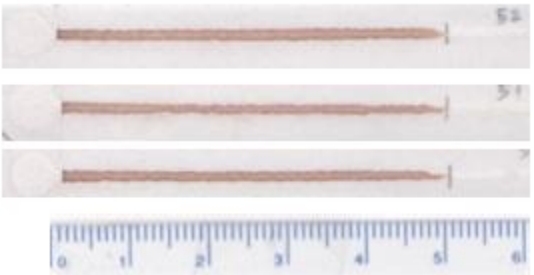
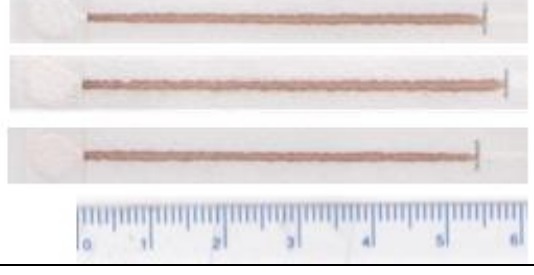
ตารางที่ ก-1 แสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

[EGCG] mM	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
0.03		1.3	0.29
0.06		3.0	0.00
0.10		5.0	0.00
0.30		8.3	1.53

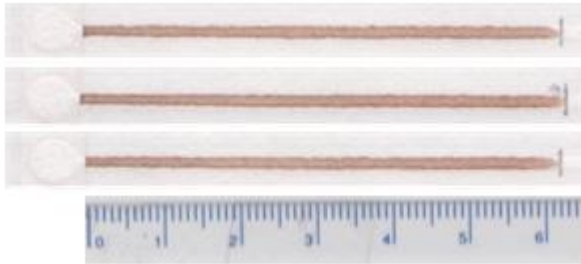
ตารางที่ ก-1 (ต่อ)

[EGCG] mM	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
0.60		14.7	0.58
1.00		18.7	1.15
2.00		25.3	0.58
2.50		30.3	0.58

ตารางที่ ก-1 (ต่อ)

[EGCG] mM	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
3.00		34.8	0.29
4.00		39.0	1.73
7.00		51.7	0.58
9.00		56.7	2.08

ตารางที่ ก-1 (ต่อ)

[EGCG] mM	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
10.00		61.0	1.00

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์
ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อหาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ

ตารางที่ ข-1 แสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อหาขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ

[EGCG],mM	ครั้งที่	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
	1	0.4		
	2	0.5		
	3	0.5		
	4	0.3		
0.01	5	0.5	0.4	0.08
	6	0.3		
	7	0.5		
	8	0.4		
	9	0.5		
	10	0.4		

การคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด

$$\text{จากสูตร } LOD = 3(S.D.)$$

$$LOD = 3(0.08)$$

$$LOD = 0.2512$$

แทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 7.129x + 12.02$

$$0.2512 = 7.129x + 12.02$$

$$7.129x = -11.7688$$

$$x = -1.65 = \log [EGCG]$$

$$[EGCG] = 0.0214 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

ดังนั้น ขีดจำกัดการตรวจวัด ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบวัดระยะทางมีค่าเท่ากับ 0.0214 มิลลิโมลาร์

การคำนวณหาขีดจำกัดการหาปริมาณ

$$\text{จากสูตร } LOQ = 10(S.D.)$$

$$LOQ = 10(0.08)$$

$$LOQ = 0.8$$

แทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 7.129x + 12.02$

$$0.8 = 7.129x + 12.02$$

$$7.129x = -11.22$$

$$x = -1.57 = \log [EGCG]$$

$$[EGCG] = 0.0269 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

ดังนั้น ขีดจำกัดการหาปริมาณ ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบวัดระยะทางมีค่าเท่ากับ 0.0269 มิลลิโมลาร์

ภาคผนวก ค

ภาพการหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ ECGG ที่ความเข้มข้นในช่วงความเป็นเส้นตรง
ด้วยการวัดระยะทางและตารางแสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ ECGG
เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ



ภาพที่ ค-1 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ ECG ที่ความเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์
ด้วยการวัดระยะทาง

ตารางที่ ค-1 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ

[EGCG],mM	ครั้งที่	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
0.10	1	4.0	3.9	0.52
	2	4.0		
	3	4.0		
	4	4.0		
	5	3.0		
	6	3.5		
	7	3.5		
	8	5.0		
	9	4.0		
	10	4.0		



ภาพที่ ค-2 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.60 มิลลิโมลาร์
ด้วยการวัดระยะทาง

ตารางที่ ค-2 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.60 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ

[EGCG],mM	ครั้งที่	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
0.60	1	9.0	9.5	0.47
	2	9.0		
	3	9.0		
	4	10.0		
	5	10.0		
	6	9.0		
	7	10.0		
	8	10.0		
	9	9.5		
	10	9.5		



ภาพที่ ค-3 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ ECG ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิ
โมลาร์ ด้วยการวัดระยะทาง

ตารางที่ ค-3 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ

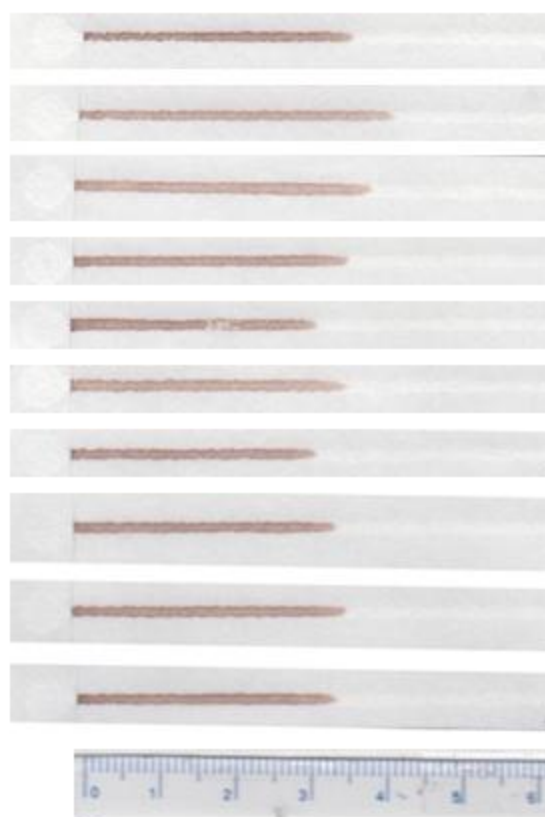
[EGCG],mM	ครั้งที่	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
1.00	1	15.0	14.4	1.43
	2	13.0		
	3	16.0		
	4	14.0		
	5	13.0		
	6	13.0		
	7	17.0		
	8	13.0		
	9	15.0		
	10	15.0		



ภาพที่ ค-4 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 2.50 มิลลิโมลาร์
ด้วยการวัดระยะทาง

ตารางที่ ก-4 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 2.50 มิลลิโมลาร์
เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ

[EGCG],mM	ครั้งที่	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
2.50	1	29.0	29.4	1.54
	2	28.0		
	3	28.0		
	4	30.0		
	5	32.0		
	6	27.0		
	7	29.0		
	8	30.0		
	9	30.5		
	10	31.0		



ภาพที่ ค-5 การหาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 4.00 มิลลิโมลาร์
ด้วยการวัดระยะทาง

ตารางที่ ค-5 แสดงผลการวัดระยะทางของการวิเคราะห์ EGCG ที่ความเข้มข้น 4.00 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความสามารถในการทำซ้ำ

[EGCG],mM	ครั้งที่	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
4.00	1	37.0	36.8	1.57
	2	35.0		
	3	36.5		
	4	36.0		
	5	35.0		
	6	39.5		
	7	38.0		
	8	36.0		
	9	39.0		
	10	36.0		

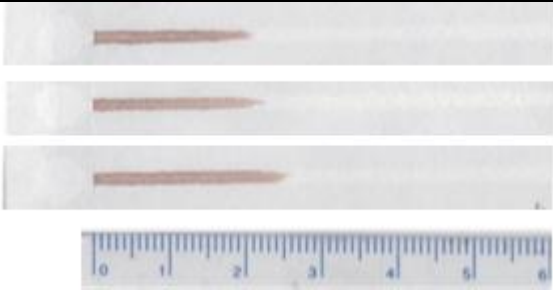
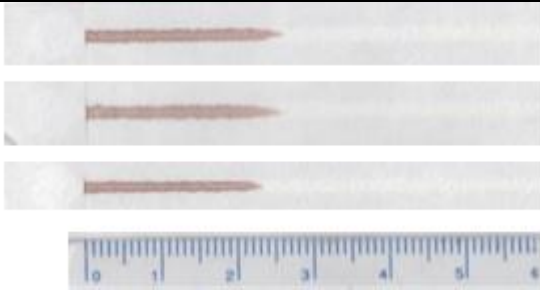
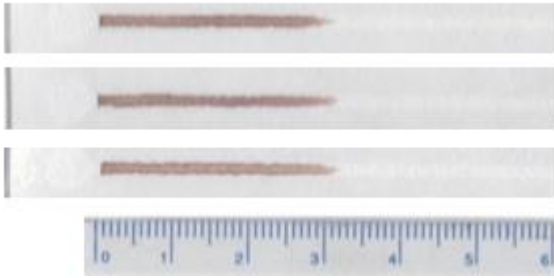
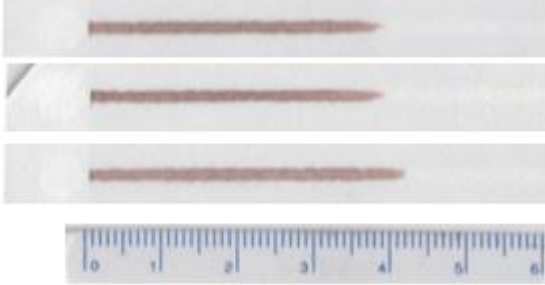
จากระยะทางที่เห็นสี สามารถหาความสามารถในการทำซ้ำในการวิเคราะห์ EGCG โดยการหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percentage of relative standard deviation, %RSD) ได้ดังนี้

จากตารางได้ค่า %RSD	ที่ 0.03 มิลลิโมลาร์	$= \frac{0.16}{2.1} \times 100$	= 7.6%
	ที่ 0.10 มิลลิโมลาร์	$= \frac{0.52}{3.9} \times 100$	= 13%
	ที่ 0.60 มิลลิโมลาร์	$= \frac{0.47}{9.5} \times 100$	= 4.9%
	ที่ 1.00 มิลลิโมลาร์	$= \frac{1.43}{14.4} \times 100$	= 9.9%
	ที่ 2.50 มิลลิโมลาร์	$= \frac{1.54}{29.4} \times 100$	= 5.2%
	ที่ 4.00 มิลลิโมลาร์	$= \frac{1.57}{36.8} \times 100$	= 4.3%

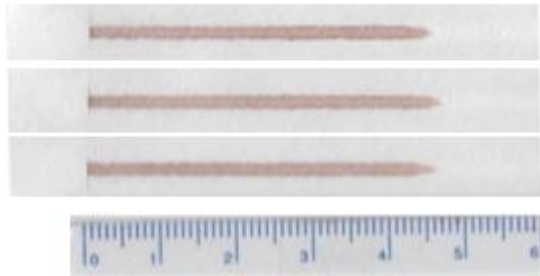
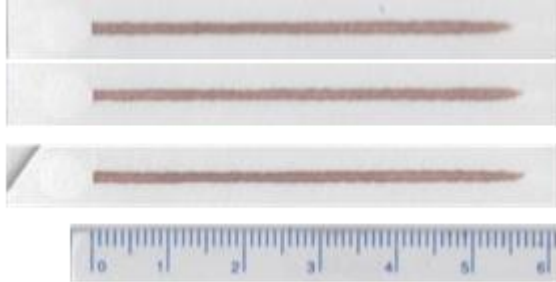
ภาคผนวก ง

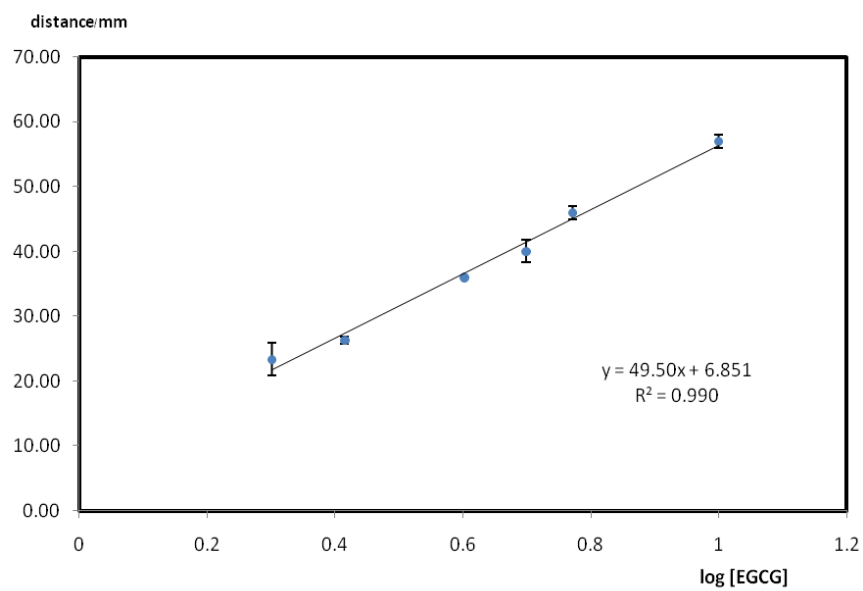
ตารางแสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ช่วง 2.50-10.00 มิลลิโมลาร์
ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานในการคำนวณ
หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา

ตารางที่ ง-1 แสดงการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ช่วง 2.50-10.00 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธีการตรวจวัดแบบระยะทางเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา

[EGCG] mM	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
2.00		23.3	2.52
2.60		26.3	0.58
4.00		36.0	0.00
5.00		40.0	1.73

ตารางที่ ง-1 (ต่อ)

[EGCG] mM	Distance (mm)	Mean (mm)	S.D.
6.00		46.0	1.00
10.00		57.0	1.00



ภาพที่ ง-1 กราฟมาตรฐานในการคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา

ภาคผนวก จ

รายชื่อตัวอย่างชาทั้งชาน้ำพร้อมดื่มและชาชนิดชง

ตารางที่ จ-1 แสดงรายชื่อตัวอย่างชาทั้งชาแห้งพร้อมดื่มและชาชง

ยี่ห้อ	ชื่อที่วางขายตามท้องตลาดทั่วไป
sample1	Ichitan green tea รสจมูกข้าวญี่ปุ่น
sample2	Oichi green tea รสข้าวญี่ปุ่น
sample3	Tea + plus ปราศจากน้ำตาล
sample4	ชาอูหลง ตราระมิงค์
sample5	ชาลิปตัน
sample6	ชาปรงสำเร็จ
sample7	กรีนที (ใบชาเขียว)
sample8	ชาเขียวมะลิ ตราน้ำไร่ 5 ดาว
sample9	ชาเขียวจีน ตรา tops
sample10	ชาเขียวญี่ปุ่นตรา tops
sample11	ชาเขียว ฟุจิเกนมัชชะ
sample12	ชาเขียวคามลเลีย