

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในตัวอย่างชา

ภาคพล จุ่มใหญ่

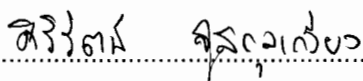
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของภคพล จุ่มใหญ่ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

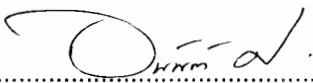
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

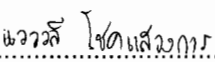

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร.ยุภาพร สมีน้อย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

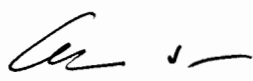

..... ประธาน
(ดร.ศิริรัตน์ ชุลกุลเกรียง)


..... กรรมการ
(ดร.ยุภาพร สมีน้อย)


..... กรรมการ
(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)


..... กรรมการ
(ดร.แหววลี ไชคแสงการ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิฐ ศรีสุข)

วันที่ 26 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2560

การวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษาจาก
โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)
สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ระดับปริญญาโท ปีการศึกษา 2556

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.ยุภาพร สมีน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมาส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.อนันต์ อธิพรชัย, ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง และดร.แวววลี โชคแสวง การ ที่ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะที่ดี ในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์ และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่ให้ทุนการศึกษาในการศึกษาต่อในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อทองคำ, คุณแม่เทียม จุ่มใหญ่ พี่ ๆ และเพื่อนนิสิตระดับปริญญาโท สาขาเคมีศึกษาทุกคนที่ให้กำลังใจและสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูแก่เวทิตาแด่ บุปการีบูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบนานเท่าทุกวันนี้

นายภคพล จุ่มใหญ่

56920135: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)

คำสำคัญ: อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ/ค่าความเข้มสี/วิธี FRAP

บทคัดย่อ: การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP) ในตัวอย่างชา (DEVELOPMENT OF PAPER-BASED FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP) ASSAY FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS IN TEA SAMPLES)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ยูภาพร สมิน้อย, Ph.D. 70 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} ($[Fe(TPTZ)]^{3+}$) ที่มีสีน้ำตาลอ่อนถูกรีดิวซ์ไปเป็น สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} ($[Fe(TPTZ)]^{2+}$) ซึ่งมีสีน้ำเงิน อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนี้สร้างขึ้นให้มีรูปร่างเป็นแบบหลุม (well) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ด้วยวิธีพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) ลงบนกระดาษของ whatman เบอร์ 4 เพื่อสร้างบริเวณส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ไว้สำหรับในการวิเคราะห์สาร ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ได้แก่ ความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารละลาย FRAP รีเอเจนต์ และเวลาในการเกิดปฏิกิริยาบนอุปกรณ์ตรวจวัด โดยใช้สารมาตรฐานคือ กรดแกลลิก จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่เหมาะสมเท่ากับ 60 มิลลิโมลาร์ และเวลาที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอยู่เท่ากับ 5 นาที จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกและโพลีฟีนอล ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0.1-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5-2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ค่าการทำซ้ำดีโดยมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 4.45-14.75 และ 8.26-17.05 จากการวิเคราะห์กรดแกลลิก และโพลีฟีนอลที่มีความเข้มข้นในช่วงกราฟมาตรฐานซ้ำ 8 ครั้ง มีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์กรดแกลลิกและโพลีฟีนอล ตามลำดับ และผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based device) เทียบกับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างชาจำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่าผลการวิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

56920135: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)

KEYWORDS: PAPER-BASES ANALYTICAL DEVICE/INTENSITY/FRAP ASSAY

PAKAPOL JUMYAI: DEVELOPMENT OF PAPER-BASED FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP) ASSAY FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS IN TEA SAMPLES. ADVISORY COMMITTEE: YUPAPORN SAMEENOI, Ph.D. 70 P. 2017.

A paper-based analytical device (PAD) with ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for determination of antioxidant activity has been developed. The analysis is based on the measurement of the reducing power of the antioxidant in the sample to reduce the ferric-tripyridyltriazine complex to generate blue color product of ferrous-tripyridyltriazine complex. The PAD device was fabricated using wax-printing method with a 5 mm in diameter circular test zone. Optimization of the FRAP assay on a paper device was studied including concentration of Fe^{3+} as well as reaction time using gallic acid as a standard antioxidant. The results showed that optimal concentration of Fe^{3+} were 60 mM and optimal reaction time was 5 min. The developed PAD was applied for analysis of common standard antioxidants including gallic acid and trolox. The linear range were 0.10-2.0 $\mu\text{g/ml}$ and 0.5-2.5 $\mu\text{g/ml}$ for gallic and trolox, respectively. Good reproducibilities with relative standard deviations of 4.45-14.75 % and 8.26-17.05 % were obtained from the analysis of gallic acid and trolox at the concentrations in the linear range ($n = 8$). The limit of detections from gallic acid and trolox were 0.07 $\mu\text{g/ml}$ and 0.30 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Finally, the performance of the developed device was validated against the traditional spectrophotometric FRAP assay by measuring antioxidant activity of 14 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	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	4
Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay	7
อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	8
ข้อมูลเกี่ยวกับใบชาแห้ง	9
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี	16
แผนการดำเนินการวิจัย	18
วิธีการทดลอง	19
การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	20
ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP	20
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	21
การศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น	22

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
การวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ	24
4 ผลการวิจัย	28
ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น	28
ผลการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์	31
ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์	35
5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	39
อภิปรายผล	39
สรุปผลการวิจัย	40
ข้อเสนอแนะ.....	40
บรรณานุกรม	41
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก	46
ภาคผนวก ข	50
ภาคผนวก ค	53
ภาคผนวก ง.....	58
ประวัติย่อของผู้วิจัย	70

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 องค์ประกอบทางเคมีของยอดใบชาแห้ง	10
2 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้จากการวิเคราะห์ gallic acid	29
3 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	31
4 ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ gallic acid	33
5 ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ trolox	35
6 ข้อมูลการหาค่า Intensity ของสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้น 20-200 ug/ml เมื่อใช้ FeCl ₃ ความเข้มข้นต่างกันในการเตรียมสารละลาย FRAP reagent	47
7 ข้อมูลการหาค่า Intensity ของสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 50 ug/ml ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ก่อนที่จะเป่าให้แห้ง.....	48
8 ผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรง, LOD และ %RSD ของ gallic acid	51
9 ผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรง, LOD และ %RSD ของ trolox	52
10 ผลการวิเคราะห์ gallic acid ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น	59
11 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น	62
12 ผลการวิเคราะห์ gallic acid ด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม	63
13 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม	65
14 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชา ด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม กับวิธี FRAP แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น	66
15 ผลการทดสอบ t-test: paired two sample for means (two-tail test)	67
16 ผลการทดสอบความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่เก็บไว้ในตู้เย็น	68
17 ผลการทดสอบความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่เก็บไว้ในตู้เย็น	69

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพแสดงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$	7
2 ภาพแสดงอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	9
3 ภาพแสดงลักษณะยอดใบชา และใบชาแห้ง	9
4 ภาพแสดงโครงสร้างของคาเทชินที่พบในใบชา	12
5 ภาพแสดงกราฟมาตรฐาน gallic acid และ epigallocatechin gallate	13
6 ภาพแสดงอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ H_2O_2	14
7 ภาพแสดงอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH	14
8 ภาพแสดงแผนผังขั้นตอนการทำวิจัย	18
9 ภาพแสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	20
10 ภาพแสดงการเปิดโปรแกรม ImageJ	24
11 ภาพแสดงการเปิดรูปภาพมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ	24
12 ภาพแสดงการ set scale ของบริเวณตรวจวัดในโปรแกรม ImageJ	25
13 ภาพแสดงการปรับสีในโปรแกรม ImageJ	25
14 ภาพแสดงการปรับสีเป็น gray ในโปรแกรม ImageJ	26
15 ภาพแสดงการปรับเป็น gray intensity ในโปรแกรม ImageJ	26
16 ภาพแสดงการ set measurements ในโปรแกรม ImageJ	27
17 ภาพแสดงการ analyze measurement ในโปรแกรม ImageJ	27
18 กราฟพลอตระหว่างความเข้มข้นกับความเข้มของ gallic acid	29
19 แสดงผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง FRAP reagent กับ gallic acid 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	30
20 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid	32
21 แสดงกราฟมาตรฐานของ gallic acid	32
22 โครงสร้างทางเคมีของ trolox	34
23 แสดงกราฟมาตรฐานของ trolox	34
24 แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA}/\text{g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา	36
25 ผลการทดสอบความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง	37

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26 ผลการทดสอบความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่เก็บในตู้เย็น.....	38
27 กราฟพลอตระหว่างความเข้มข้นกับความเข้มข้นของ gallic acid	47
28 กราฟที่พลอตระหว่างความเข้มข้นกับระยะเวลาที่ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาก่อนเป่าแห้ง.....	49
29 แสดงกราฟมาตรฐานของ gallic acid	51
30 แสดงกราฟมาตรฐานของ trolox	52
31 แสดงกราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น	60
32 แสดงกราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ดั้งเดิม	63
33 ผลการทดสอบความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง	68
34 ผลการทดสอบความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่เก็บในตู้เย็น.....	69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนวงนอกแบบโดดเดี่ยว เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยเมื่อถูกสร้างขึ้นในร่างกาย สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างอย่างต่อเนื่องกันไปเป็นปฏิกิริยา ลูกโซ่ในทันที ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนแปลงสภาพโปรตีน และไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ และการเข้าไปสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติไป (Ames et al., 1993) โดยอนุมูลอิสระนั้นเป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคความจำเสื่อม เป็นต้น และเมื่ออยู่ในอาหารอนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันที่อยู่ในอาหารทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ง่าย อนุมูลอิสระ เกิดจากผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ รวมทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ มลพิษ การติดเชื้อโรค รังสียูวี (UV-ray) โอโซน (ozone) ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ (Denisov, 2005; Scott et al., 2004) อนุมูลอิสระสามารถถูกกำจัด หรือทำให้ความรุนแรงลดลงได้ด้วยสารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารพวกเอนไซม์หรือสารอื่นที่สามารถชะลอหรือทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไป โดยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถจับกับอนุมูลอิสระ แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความเสถียรกว่า ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ได้ (Denisov, 2005) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) (Velioglu et al., 1998) ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากพืชผัก ผลไม้ เครื่องเทศ และสมุนไพร ได้รับความสนใจ และศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ วิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมได้แก่ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Que et al., 2006), Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Ramamoorthy & Bono, 2007), Trolox equivalents

antioxidant capacity (TEAC), Lipid peroxidation reducing power และ Metal chelating ability ส่วนเครื่องมือที่นิยมใช้ในการตรวจหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับความนิยม คือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Vichitphan et al., 2007) ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะต่อสารแตกต่างกัน โดยปกติแล้วการตรวจสอบมักจะสรุปผลจากหลายวิธีร่วมกัน เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องยิ่งขึ้น ซึ่งจากวิธีการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะต้องวิเคราะห์โดยนักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญ เนื่องจากต้องใช้ทั้งเทคนิค สารเคมี เครื่องมือวิเคราะห์ และต้องใช้ระยะเวลาที่นานเพราะต้องวิเคราะห์หลายวิธีจึงจะให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการตรวจวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สามารถทดสอบตัวอย่างได้ที่ละหลาย ๆ ตัวอย่างต่อการทดลอง ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนท์ในการวิเคราะห์ในปริมาณน้อย ใช้เวลาการวิเคราะห์น้อย ใช้เครื่องมือการตรวจวัดสัญญาณที่มีราคาไม่แพง และให้ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่มีความถูกต้อง และแม่นยำ ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสารศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นไปอย่างรวดเร็วมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในตัวอย่างชา

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. พัฒนาการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยสภาวะที่ศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลาย FRAP ที่เหมาะสม เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย FRAP กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid โดยจะต้องสามารถตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้รวดเร็วและมีความไวในการวิเคราะห์สูง

3. ทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นโดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid โดยหาค่าการวิเคราะห์ (analytical features) ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) ค่าการทำซ้ำ (reproducibility, %RSD) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และความแม่นยำของวิธี (accuracy) โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระระหว่างวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น กับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยใช้ตัวอย่างชาชนิดต่าง ๆ

4. ศึกษาความเสถียรของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อพัฒนาเป็นอุปกรณ์พร้อมใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สามารถตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สำหรับใช้ตรวจวัดอนุมูลอิสระในตัวอย่งชาชง หรือผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ เช่น พืชผักอาหาร ตลอดจนสมุนไพรต่าง ๆ สำหรับนักวิจัย หรือบุคคลทั่วไปที่สนใจ

2. เป็นแนวทางให้ผู้สนใจศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีอื่น ๆ ต่อไป

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (a microfluidic paper-based analytical device, μ PAD) หมายถึง ตัวตรวจวัดของไหลจุลภาคที่ทำมาจากกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 โดยสร้างบริเวณส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ด้วยการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) โดยเว้นหลุม (well) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm ไว้สำหรับในการวิเคราะห์สาร

2. Intensity หมายถึง ค่าความเข้มของสีที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ

3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay (Benzie & Szeto, 1999) เป็นวิธีการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} ($[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{3+}$) จะถูกรีดิวซ์ไปเป็น สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} ($[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{2+}$) ซึ่งจะให้มีสีน้ำเงินที่เข้มขึ้นสามารถตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงความสามารถในการรีดิวซ์ที่มากขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาประกอบการดำเนินการตามลำดับดังนี้

- 2.1 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ
- 2.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay
- 2.3 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (Paper based device)
- 2.4 ข้อมูลเกี่ยวกับไบซาแห้ง
- 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

2.1.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (radicals, free radicals) หมายถึง อะตอม โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) มีสมบัติทางเคมี คือ เป็นสารที่ไม่เสถียร มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่นสูงมาก อนุมูลอิสระสามารถพบได้ทั้งที่อยู่ในสถานะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอยู่ในสถานะที่เป็นไอออน โดยมีทั้งไอออนที่มีประจุไฟฟ้าเป็นประจุบวกและประจุไฟฟ้าเป็นประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระนั้นเขียนแสดงด้วยสัญลักษณ์ทางเคมีของธาตุ โมเลกุล หรือไอออน นั้น ๆ และเขียนแสดงอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของ (R^\bullet) ตัวอย่างเช่น

อนุมูลอิสระที่เป็นกลาง (R^\bullet) เช่น อนุมูล peroxy (ROO^\bullet) หรืออนุมูล thiyl (RS^\bullet)

อนุมูลอิสระที่เป็นประจุบวก ($R^{\bullet+}$) เช่น อนุมูล pyridinyl ($NAD^{\bullet+}$)

อนุมูลอิสระที่เป็นประจุลบ ($R^{\bullet-}$) เช่น อนุมูล superoxide ($O_2^{\bullet-}$)

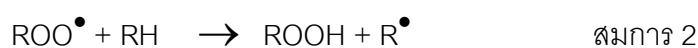
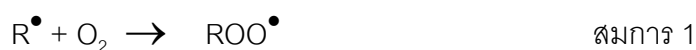
ซึ่งจากคำจำกัดความข้างต้นนั้นทำให้อะตอมของธาตุ บางชนิดได้ถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น คลอรีนอะตอม (Cl^\bullet) และซิลเวอร์อะตอม (Ag^\bullet) เป็นต้น (Roberfroid & Calderon, 1995)

การเกิดปฏิกิริยาเคมีของอนุมูลอิสระนั้น อะตอม โมเลกุล หรือไอออนของอนุมูลอิสระเข้าไปแย่ง จับ หรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากอะตอมหรือโมเลกุลของสารที่อยู่ข้างเคียง เพื่อให้ตัวของอนุมูลอิสระมีความเสถียรหรือสมดุล ซึ่งเมื่อโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียอิเล็กตรอนก็จะ

กลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ และเข้าทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อย ๆ (Halliwell, 1991)

บุหรัน พันธุ์สุวรรณ (2556) ได้กล่าวถึงอนุมูลอิสระ ไว้ดังนี้

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ ตลอดเวลาดังสมการ 1 และ 2



อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ อนุมูลอิสระออกซิเจน (oxygen radical) และอนุพันธ์ของอนุมูลอิสระออกซิเจน เช่น reactive oxygen species (ROS), superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), peroxy radical (ROO^\bullet), hydrogenperoxide, transition metal (โลหะทรานซิชัน), carbonate radical ($CO_3^{\bullet-}$), nitrate radical ($NO_3^{\bullet-}$), methyl radical (CH_3^\bullet) เป็นต้น (Halliwell, 1991)

นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภททั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอ (DNA) ในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหน็บชา โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคกล้ามเนื้อหัวใจ เป็นต้น อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อไวรัส หรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ เป็นต้น จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนโตรสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบ

อาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้อีก การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียมไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง และจากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol) เป็นต้น

2.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ (Chattopadhyay et al., 2010) สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies, 1991)

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด (Pokorny et al., 2001) ได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาค้นคว้ากันอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากแนวคิดเรื่องการกลับคืนสู่ธรรมชาติ ประกอบกับความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืชซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามินอย่างเช่น วิตามินซี วิตามินอี บีตาแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบ phenolic โดยเฉพาะ polyphenols เช่น แชนโธน และฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบด้วยหมู่ aromatic hydroxyl ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่าง ๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล H^{\bullet} แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น (Van Acker et al., 2000) นอกจากนี้สารประกอบ polyphenols ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH^{\bullet} ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำ โดยการเข้าจับ กับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ได้อีกด้วย (Sanchez-Moreno et al., 2000)

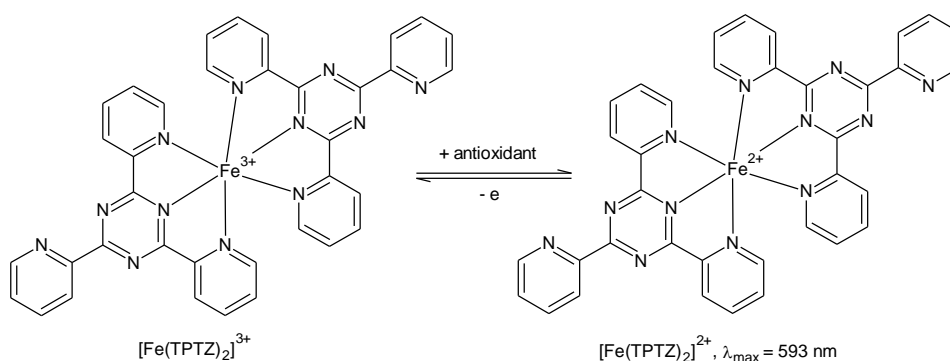
2. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เป็นสารประกอบ phenolic 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydrxylanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น

สี และรสชาติที่เปลี่ยนแปลง สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติทั่วไปแต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorny et al., 2001)

ปกติร่างกายคนเรานั้นจะมีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหลากหลายชนิดทั้งที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น urate, bilirubin และ transferrin เป็นต้น เนื่องจากสารเหล่านี้มีจำนวนจำกัด ดังนั้นเมื่อใดก็ตามที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเกินกว่าจะกำจัดได้หมด อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ นอกจากนี้พวกวิตามินบางชนิด เช่น บีตาแคโรทีน (β -carotene) วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) รวมทั้งสารประกอบกลุ่ม polyphenols ต่าง ๆ ซึ่งมีรายงานพบมากในพืช ผัก ผลไม้ ทั่วไปยังจัดเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติที่ดีอีกกลุ่มหนึ่ง (Sies, 1991)

2.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay (Benzie, & Szeto, 1999)

เป็นวิธีวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการเกิดรีดักชันของสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ (Ferric-tripyridyltriazine complex) ที่ไม่มีสี เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ จะถูกรีดิวซ์กลายเป็นสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Ferrous-tripyridyltriazine complex) ซึ่งมีสีน้ำเงินม่วง โดยความเข้มของสีน้ำเงินม่วงจะแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง สมการการเกิดปฏิกิริยาสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 2-1



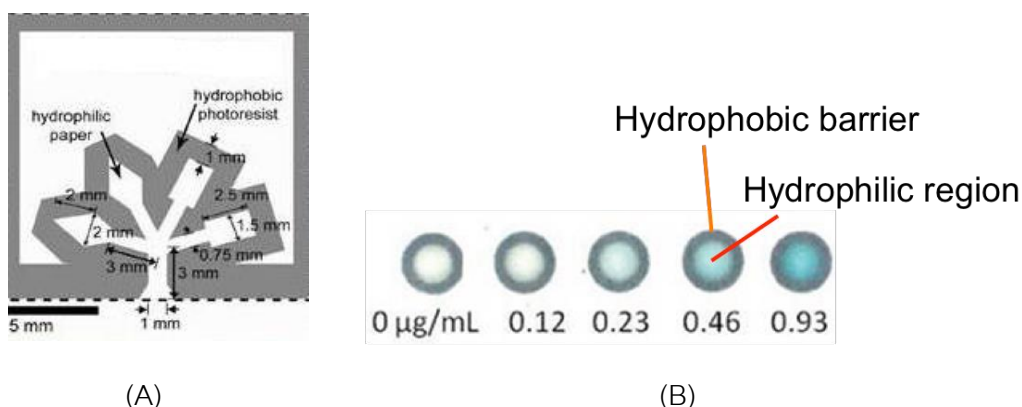
ภาพที่ 2-1 แสดงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ ที่ไม่มีสี ถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ กลายเป็นสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ ซึ่งมีสีน้ำเงินม่วง (Huang et al., 2005)

2.3 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (Paper-based device)

อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษ หรืออุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (microfluidic paper-based analytical device, μ PADs) เป็นเทคโนโลยีทางเลือกหนึ่งของการสร้างอุปกรณ์ตรวจวินิจฉัยโรคทางคลินิก ต้นทุนต่ำ พกพาและที่ใช้งานง่าย สามารถใช้แล้วทิ้งเลย ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในประเทศกำลังพัฒนา เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือ หรือเทคโนโลยีขั้นสูงสำหรับวิเคราะห์ผล

Martinez et al. (2007) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษแบบหลุม (well) ตามรูปแบบที่ต้องการที่มีขนาดเล็กเป็นมิลลิเมตรลงบนกระดาษ โดยได้ทำการสร้างส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ด้วยวิธีการฉายแสง (photolithography) ผ่านเข้าไปในพอลิเมอร์ที่มีความไวแสง (photoresist polymer) และกระดาษโครมาโทกราฟี (chromatography paper) ทำให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดที่มีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ สามารถพกพาได้สะดวก วิเคราะห์ตัวอย่างทางชีวภาพได้หลากหลาย และใช้ตัวอย่างตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ในปริมาณที่น้อย

ในปัจจุบันอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำให้เป็นลวดลายได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น การใช้มีดตัด (cutting knives) (Fenton et al., 2009) การพิมพ์ด้วยไข (wax printing) (Carrilho et al., 2009) การฉาบเคลือบด้วยไข (wax screen-printing) (Dungchai et al., 2011) และการวาดด้วยปากกาคันน้ำ (permanent marker plotting) (Nie et al., 2012) เป็นต้น รูปแบบลวดลายของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีอยู่สองแบบ ได้แก่ แบบช่องการไหลด้านข้าง (lateral flow) ดังภาพที่ 2-2 (A) ซึ่งสารตัวอย่างสามารถไหลไปบนแผ่นกระดาษในท่อการไหลด้วยแรงคาпилลารี (capillary action) เรียงตามเยื่อกระดาษไปยังบริเวณตรวจวัด (test zone) แล้วเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับรีเอเจนต์ และแบบหลุม (well) (Lisowski & Zarzycki, 2012) ดังภาพที่ 2-2 (B) วิเคราะห์ได้โดยการนำสารตัวอย่างผสมกับรีเอเจนต์หยดลงไปในพื้นที่ชอบน้ำของกระดาษ การวิเคราะห์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารตัวอย่างกับรีเอเจนต์ สามารถทำได้โดยการถ่ายภาพ จากนั้นนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ แล้ววัดค่าความเข้มสี ซึ่งค่าความเข้มสีจะแปรผันตรงกับปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง



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

2.4 ข้อมูลเกี่ยวกับใบชาแห้ง

พัชรีย์ พริบดิเวช (2552) ได้กล่าวถึงลักษณะทั่วไป องค์ประกอบทางเคมี และสรรพคุณของชาไว้ดังนี้

ชาที่มีชื่อสามัญ คือ Tea ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Camellia sinensis* ชาแบ่งออกได้เป็น 6 ประเภท ได้แก่ ชาขาว ชาเหลือง ชาเขียว ชาอูหลง ชาดำ และชาผูเออร์ แต่ที่สามารถพบเห็นได้ทั่วไป ได้แก่ ชาขาว ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ ซึ่งชาทุกชนิดสามารถผลิตได้จากต้นชาต้นเดียวกัน แต่มีกรรมวิธีในการผลิตที่แตกต่างกันออกไป ยอดใบชาสดจะประกอบด้วยความชื้นประมาณ 75-80 % ขณะที่ส่วนที่เหลือเป็นของแข็งทั้งหมด ลักษณะของยอดใบชาสด และใบชาแห้งแสดงในภาพที่ 2-3



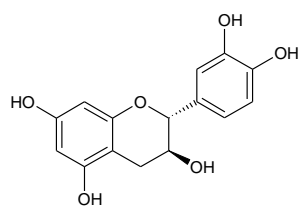
ภาพที่ 2-3 แสดงลักษณะยอดใบชาและ ใบชาแห้ง (<http://www.foodnetworksolution.com/>; <http://healthfood.muslimthai.com/>)

องค์ประกอบทางเคมีของใบชาในส่วนที่เป็นของแข็งทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 2-1

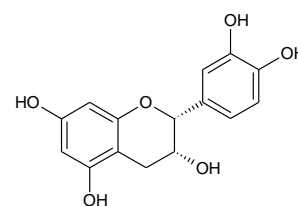
ตารางที่ 2-1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของยอดใบแห้งชา

Components	Dry weight (%)
Flavanols	18-32
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	9-14
(-)-Epigallocatechin (EGC)	4-7
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	2-4
(-)-Epicatechin (EC)	1-3
(+)-Gallocatechin (GC)	1-2
(+)-Catechin (C)	0.5-1
Flavonol glucosides	3-4
Proanthocyanidins	2-3
Organic acids	0.5-2
Saponins	0.04-0.07
Lignin	4-6
Caffeine	3-4
Amino acids	2-4
Carbohydrates	3-5
Pigments	0.5-0.8
Vitamins	0.6-1.0
Soluble minerals	2-4
Cellulose	6-8
Polysaccharides	4-10
Lipids	2-4
Insoluble pigments	0.5
Insoluble minerals	1.5-3.0
Volatiles	0.01-0.02

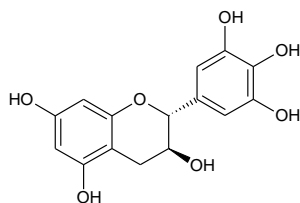
ในยอดใบชาจะมีปริมาณพอลิฟีนอล (polyphenols) ทั้งหมดประมาณ 10-35% (dry weight) โดยสารประกอบพอลิฟีนอลนี้ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ฟลาโวนอยด์เป็น secondary metabolite ที่แบ่งได้ 6 กลุ่มคือ Flavones, flavanones, isoflavones, flavonols, flavanols และ anthocyanins กลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่พบมากที่สุดในชา คือ Flavanols ซึ่งเรียกว่า Catechins (คาเทชิน) แสดงดังภาพที่ 2-4



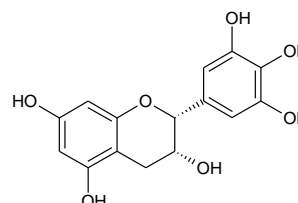
(+)-Catechin (C)



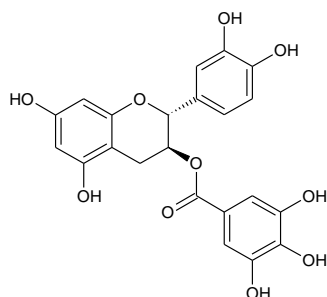
(-)-Epicatechin (EC)



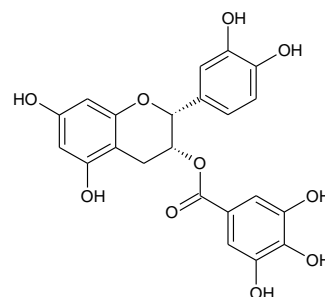
(+)-Gallocatechin (GC)



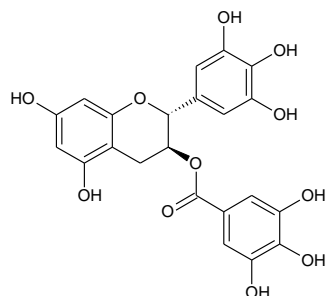
(-)-Epigallocatechin (EGC)



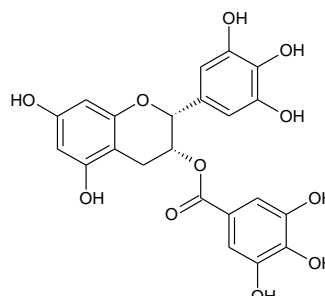
(-)-Catechin gallate (CG)



(-)-Epicatechin gallate (ECG)



(-)-Gallocatechin gallate (GCG)



(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)

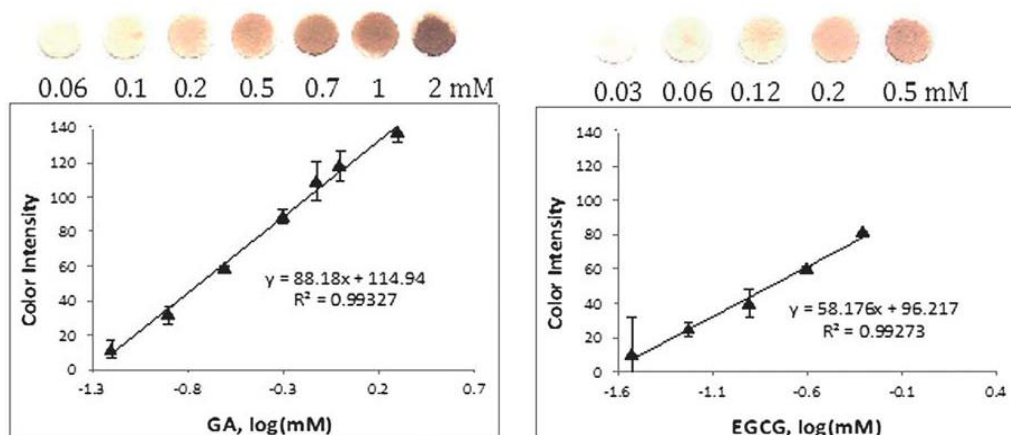
ภาพที่ 2-4 แสดงโครงสร้างของคาเทชินที่พบในใบชา (<http://teainstitutemfu.com/main/blog/องค์ประกอบทางเคมี>)

คาเทชิน (Catechins) เป็นสารประกอบ Flavanols ชนิดหนึ่งในชา ซึ่งมีอยู่ประมาณ 60-70% ของพอลิฟีนอลทั้งหมด กลุ่มของ Catechins ที่พบมากในชา คือ (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-Epicatechin (EC) โดย Catechins เหล่านี้มีอยู่ประมาณ 90% ของคาเทชินทั้งหมด ขณะที่กลุ่ม 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 เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคพาร์กินสัน (Parkinson) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer) ไชข้ออักเสบ และต้อกระจก เป็นต้น (Ames et al., 1993)

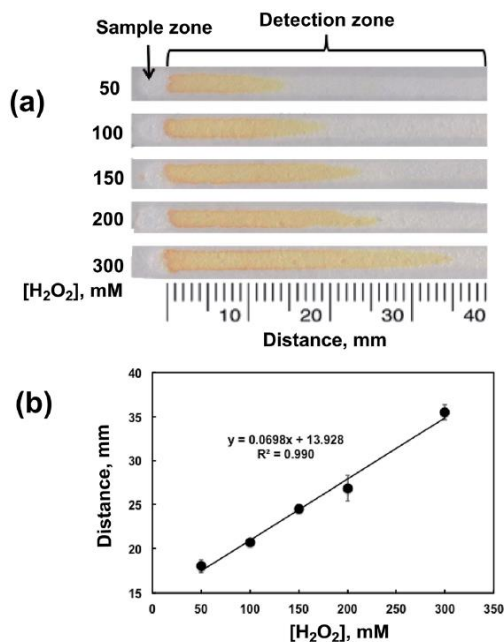
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sharpe et al. (2012) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจสอบแบบพกพาสำหรับวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอาหารโดยการตรึงอนุภาคนาโนซีเรียม (Ce) ไว้ที่กระดาษ ซึ่งทำให้อุปกรณ์ตรวจวัดที่มีลักษณะเป็นเหมือนกับเซ็นเซอร์ขนาดเล็ก อุปกรณ์นี้จะวัดการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุภาคนาโนซีเรียม ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล อุปกรณ์แบบพกพาดังกล่าวสามารถใช้วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ascorbic acid, gallic acid, vanillic acid, quercetin, caffeic acid, epigallocatechin gallate และ วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา และเห็ด ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม และข้อดีของอุปกรณ์นี้ คือ ไม่ต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาแพงใช้แค่โปรแกรมประมวลผลภาพ ทำให้สามารถนำอุปกรณ์นี้ไปทำการกรวิเคราะห์นอกห้องปฏิบัติการได้

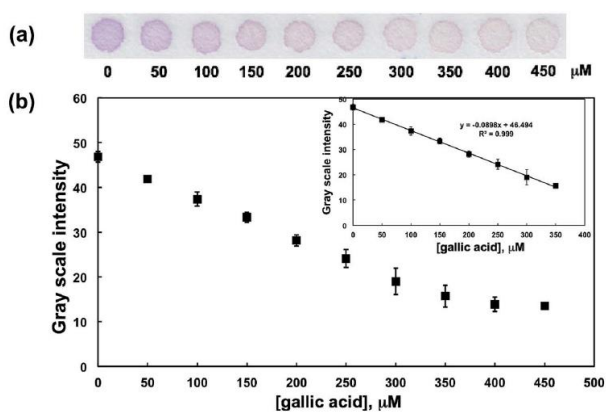


ภาพที่ 2-5 แสดงกราฟมาตรฐานของ gallic acid (GA) และ epigallocatechin gallate (EGCG)

Sameenoi et al. (2014) ได้พัฒนาวิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สามารถทำได้ง่าย และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ มีขั้นตอนการผลิตเพียงขั้นตอนเดียว โดยใช้สารละลายพอลิเมอร์ พอลิสไตรีน โดยทำการเทสารละลายให้ซึมผ่านแผ่นบล็อกที่มีลวดลายต่าง ๆ ไปยังกระดาษกรอง whatman เพื่อสร้างส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำ จะทำให้ได้บริเวณตรวจวัดที่ยอมให้น้ำผ่านได้ขึ้น โดยได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิเมอร์พอลิสไตรีน ชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมคือ Whatman#4 โดยสามารถสร้างช่องสำหรับบริเวณตรวจวัดที่ยอมให้น้ำผ่านได้ที่เล็กที่สุด คือ 670 ± 50 ไมโครเมตร และส่วนกันน้ำที่เล็กที่สุด คือ 380 ± 40 ไมโครเมตร ตามลำดับ สำหรับการทำให้บริเวณตรวจวัดแบบหลุมกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 7 มิลลิเมตร พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำซ้ำที่ดีโดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) 1.12-2.54% ($n = 64$) ทำการทดสอบการใช้สออุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สร้างขึ้น ด้วยการใช้อิคราะห์ H_2O_2 โดยทำปฏิกิริยากับ CeO_2 แล้ววัดระยะทางของสีที่เกิดขึ้น พบว่าให้ผลลัพธ์ที่เหมือนกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และอุปกรณ์ตรวจวัดแบบหลุมกลมทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ก็ให้ผลการทดสอบที่ดี จึงสรุปได้ว่าการผลิตอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยวิธีการสกรีนพอลิเมอร์สามารถใช้เป็นทางเลือกสำหรับการผลิตอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษได้



ภาพที่ 2-6 แสดงการใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ H₂O₂ (a) ระยะทางการเกิดสีของ H₂O₂ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยอาศัยการเกิดสีกับอนุภาคนาโน CeO₂ (b) กราฟมาตรฐานที่ได้จากการพลอตระยะทางการเกิดสีเทียบกับตัวความเข้มข้นของ H₂O₂



ภาพที่ 2-7 แสดงการใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DDPH (a) ความเข้มของสีของสารละลาย DDPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (b) กราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่างความเข้มสีที่ลดลงเทียบกับความเข้มข้น Gallic acid

Benzie & Szeto (1999) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในชา 25 ชนิด ผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่างชาดำมีความเข้มข้นในช่วง 132-654 $\mu\text{mol/g}$, ชาอู่หลงมีความเข้มข้นในช่วง 233-532 $\mu\text{mol/g}$ และชาเขียวมีความเข้มข้นในช่วง 272-1144 $\mu\text{mol/g}$ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

Pulido et al. (2000) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบในกลุ่มพอลิฟีนอล โดยใช้วิธีที่ปรับปรุงจากวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ผลการศึกษาพบว่า สารพอลิฟีนอล ได้แก่ flavonoids เช่น quercetin, rutin และ catechin, resveratrol, tannic acid, phenolic acid (gallic, caffeic และ ferulic) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า ascorbic acid, trolox และ BHA

ปริญนันท์ บัวสด (2549) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มชาโดยใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี เปรียบเทียบกับวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay, วิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) cation radical scavenging assay และวิธี ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) และทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยวิธี Folin-Denis ในเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic Voltammetry) ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาผงบดห่อต่าง ๆ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรีมีลำดับตรงกับวิธี DPPH ABTS และ FRAP ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างเครื่องดื่มชาบรรจุขวดยี่ห้อต่าง ๆ พบว่ามีผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันเล็กน้อย และพบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณสอดคล้องกันกับวิธี Folin-Denis จึงสรุปได้ว่าเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีเป็นเทคนิคที่สามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งในเชิงคุณภาพ และในเชิงปริมาณ

พัชรีย์ พริบตีเวช (2552) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชา พบว่าสารสกัดชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงจะพบว่าจะมีปริมาณสารฟีนอลสูงตามด้วย จากผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาพบว่า ชาเขียวฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีสูงที่สุด รองลงมา คือ ชาสีฤดู ชาอู่หลงก้านอ่อน (No.17) ชาพันธุ์ชาเขียวอู่หลง และชาอู่หลงเบอร์ 12 ตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 (Whatman, China, Cat No. 1004110)
2. ไมโครปิเปต ขนาด 0.5-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร (Labnet Biopette™ A Autoclavable, BP10, BP20, BP200, BP1000)
3. เครื่อง Spectronics (Thermo SCIENTIFIC GENESYS 20)
4. ตู้ดูดความชื้น (AMPORE HOUSE DRY-CABINET GH-120)
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO AG 204)
6. เครื่องวัด pH (METTLER TOLEDO FEP20-FiveEasy Plus™ pH)
7. เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน FALC F series
8. เครื่องพิมพ์ Fuji Xerox ColorQube 8870
9. เครื่องสแกนเนอร์ Canon LiDE110
10. ไดรฟ์แปาผม MAMARU MR-7502

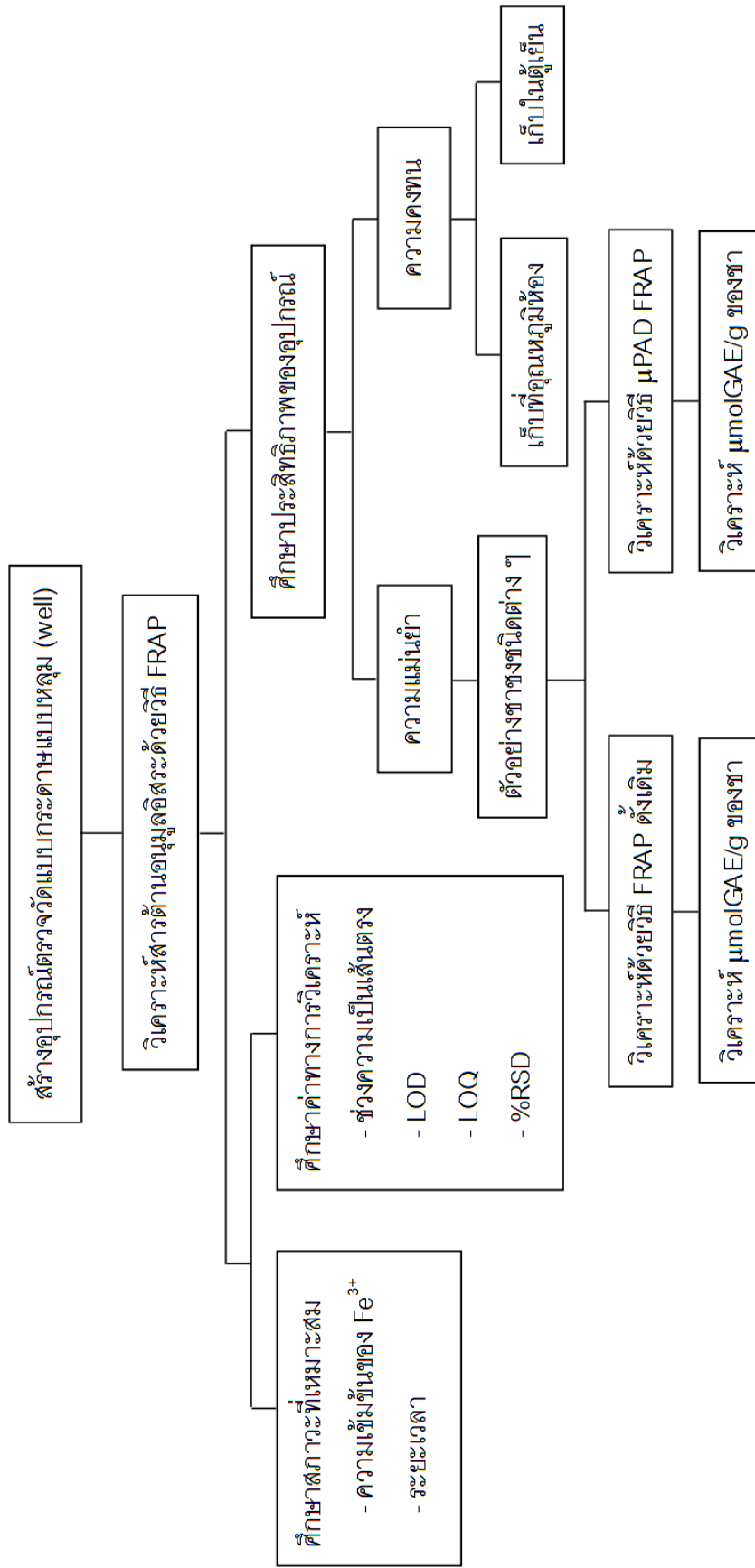
3.1.2 สารเคมี

1. gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) (M.W. 170.12 g/mol, Sigma Aldrich, CAS : 149-91-7)
2. 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ($C_{18}H_{12}N_6$), M.W. 312.33 g/mol, Sigma Aldrich, CAS : 3682-35-7
3. hydrochloric acid (HCl), M.W. 36.46 g/mol, RCI Labscan, CAS: 7647-01-0
4. iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) M.W. 270.30 g/mol, Sigma Aldrich, CAS : 10025-77-1
5. acetic acid (CH_3COOH), M.W. 60.05 g/mol, RCI Labscan, CAS: 64-19-7
6. ethanol (C_2H_5OH), M.W. 46.07 g/mol, RCI Labscan, CAS: 64-17-5
7. sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) M.W. 136.08 g/mol, Sigma Aldrich, CAS : 6131-90-4

3.1.3 ตัวอย่างในการทดลอง

1. ชาระมิงค์ ชาอู่หลง
2. เรนอง ที่ ชั้นดีฟ ออริจินอล
3. ชาลิปตัน yellow label
4. ชาระมิงค์ ชาจีนอบดอกมะลิ
5. ทอปส์ ชาเขียวญี่ปุ่น
6. ชาระมิงค์ ชาเขียวญี่ปุ่น
7. ฟุจิ ชาเขียวกลั่นข้าวคั่ว
8. บ้านไร่ 5 ดาว ชาเขียวมะลิรสต้นตำรับ
9. เซน ชาเขียวญี่ปุ่น
10. ชาระมิงค์ ชาเขียวญี่ปุ่นกลั่นมะลิ
11. ทอปส์ ชาใบหม่อนผสมชาเขียวญี่ปุ่นกลั่นมะลิ
12. ชาตรา 3 ม้า ใบชาเบอร์ 3
13. ชาตรา 3 ม้า ใบชาเบอร์ 100
14. ชาตรา 3 ม้า ใบชาเบอร์ 300

3.2 แผนการดำเนินงานวิจัย



ภาพที่ 3-1 แสดงแผนผังขั้นตอนการวิจัย

3.3 วิธีทำการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารละลาย FRAP

3.3.1.1 การเตรียมสารละลาย 20 mM iron (III) chloride

ชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ มา 0.270 g ละลายใน 1 M HCl ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.3.1.2 การเตรียมสารละลาย 10 mM TPTZ

ชั่ง TPTZ มา 0.156 g ละลายใน 96 % ethanol และปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ด้วย 96 % ethanol

3.3.1.3 การเตรียมสารละลาย 300 mM sodium acetate buffer pH 3.6

ชั่ง $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ มา 3.1 g ละลายใน CH_3COOH (glacial acetic acid) ปริมาตร 16 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 1 l ด้วยน้ำกลั่น

3.3.1.4 การเตรียมสารละลาย FRAP

ผสมสารละลาย 300 mM sodium acetate buffer pH 3.6 รวมกับสารละลาย 20 mM iron (III) chloride และ 10 mM TPTZ ในอัตราส่วน 10:1:1 โดยจะต้องทำการเตรียมสารละลายใหม่ในทุก ๆ วัน

3.3.2 การเตรียมสารละลาย gallic acid

เตรียม stock ของ gallic acid ความเข้มข้น 10000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 5 ml โดยชั่ง gallic acid 0.050 g ละลายใน 96 % ethanol 5 ml แล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 และ 160 $\mu\text{g/ml}$

3.3.3 การเตรียมสารละลาย trolox

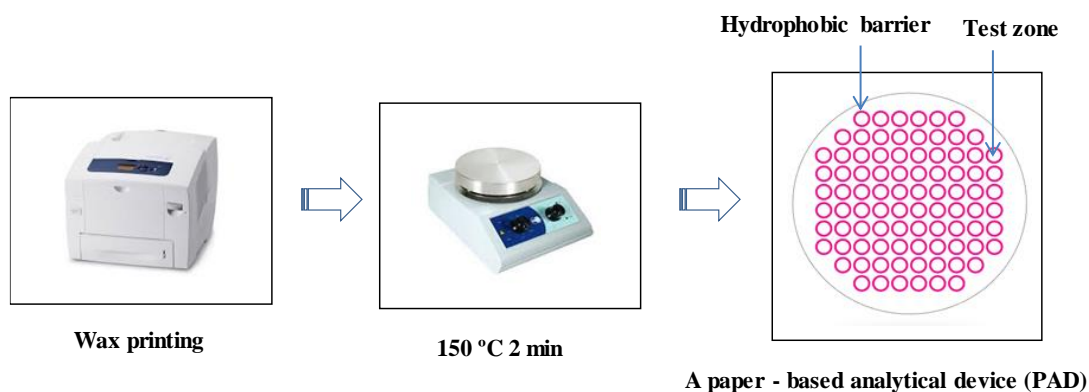
เตรียม stock ของ trolox ความเข้มข้น 10000 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 5 ml โดยชั่ง trolox 0.050 g ละลายใน 96 % ethanol 5 ml แล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 และ 160 $\mu\text{g/ml}$

3.3.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างขามา 2 g ละลายในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ปริมาตร 200 ml ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองตะกอนชาออก นำน้ำชาที่ได้ไปวิเคราะห์หรือเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

3.4 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยสร้างบริเวณส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ด้วยการพิมพ์หลุม (well) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm บนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ด้วยเครื่องพิมพ์ Fuji Xerox รุ่น ColorQube 8870 ใช้สำหรับเป็นบริเวณวิเคราะห์สาร (test zone) ดังภาพที่ 1 จากนั้นให้ความร้อนด้วย Hotplate ยี่ห้อ FALC รุ่น F series อุณหภูมิ 150 °C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้หมึกซึมผ่านกระดาษกรองจากด้านบนจนถึงด้านล่าง และติดเทปใสด้านใดด้านหนึ่งของกระดาษกรองเพื่อป้องกันการรั่วซึมระหว่างการวิเคราะห์



ภาพที่ 3-2 แสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.5.1 ศึกษาความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่เหมาะสมในสารละลาย FRAP รีเอเจนต์เตรียมสารละลาย iron (III) chloride ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 60 mM โดยเตรียมคล้ายกับสารละลาย ในข้อ 3.3.1.1 จากนั้นนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับ

สารละลาย 300 mM sodium acetate buffer pH 3.6 และ 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ในอัตราส่วน 1:10:1 เป็นสารละลาย FRAP รีเอเจนต์ นำสารไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 10, 50, 100, 150 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ และพล็อตกราฟเปรียบเทียบระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของสารละลาย iron (III) chloride ที่แต่ละความเข้มข้นของ gallic acid

3.5.2 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย FRAP และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย FRAP รีเอเจนต์ โดยผสมสารละลาย 300 mM sodium acetate buffer pH 3.6 รวมกับสารละลาย 40 mM iron (III) chloride และสารละลาย 10 mM TPTZ ในอัตราส่วน 10:1:1 นำไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กันก่อนทำการเป่าให้แห้งด้วยไดร์เป่าผม สแกนภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์ canon LiDE 110 ตรวจสอบค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ พล็อตกราฟเปรียบเทียบระหว่างความเข้มสีกับระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.6.1 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถทำได้โดยโดย ปิเปตสารละลาย FRAP ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่มีบริเวณตรวจวัดเป็นแบบหลุม หลุมละ 5 μl จากนั้นปิเปตสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหลุมละ 5 μl ปล่อยให้สารทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที ใช้ไดร์เป่าผมเป่าให้แห้ง แล้วนำไปสแกนภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์ canon LiDE 110 ตรวจสอบค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ

3.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

- ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน gallic acid

ทำการทดลองคล้ายข้อ 3.6.1 วิเคราะห์สารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 8$) พล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น gallic acid และค่าความเข้มสีเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงของ gallic acid

- ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ทำการทดลองคล้ายข้อ 3.6.1 โดยวิเคราะห์ gallic acid ที่ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage of relative standard deviation, %RSD) ดังสมการ

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ซ้ำ 8 ครั้ง

\bar{X} คือ ค่าเฉลี่ยที่วัดได้จากการการวิเคราะห์ซ้ำ 8 ครั้ง

- ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

คำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ได้จากสูตร

$$LOD = 3SD_B / m$$

เมื่อ LOD คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้

SD_B คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Blank

m คือ ความชันของกราฟ

3.6.3 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์สารมาตรฐาน trolox ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยมีวิธีการศึกษาคล้ายกับสารมาตรฐาน gallic acid ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

3.7 ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

3.7.1 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี FRAP มาตรฐาน

3.7.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชงด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

โดยหยดสารละลาย FRAP ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหุ้มละ 5 μ l (n = 5) หลังจากนั้นหยดสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 μ g/ml (n = 8) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 5 นาที เป่าให้แห้ง แล้วนำไปสแกนภาพ ทำการพล็อตกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น gallic acid และค่าความเข้มสีเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์

การวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชงที่เตรียมได้ในหัวข้อ 3.3.6 โดยนำสารละลายตัวอย่างชามาตรวจวัดบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ทำการตรวจวัดค่าความเข้มข้นจากนั้นนำไปหาค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid และรายงานในของค่าสมมูล gallic acid ต่อกรัมชา (gallic acid equivalent, $\mu\text{mol GAE/g tea}$)

3.7.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชงด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม

สร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ gallic acid โดยปิเปตสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 ml ใส่ในขวด vial จากนั้นปิเปตสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 mM ปริมาตร 0.1 ml ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 0.3 ml เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้สารทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm นำค่าการดูดกลืนแสงไปทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้น gallic acid และค่าการดูดกลืนแสงเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงของ gallic acid

จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชงโดยนำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์คล้ายกับสารมาตรฐาน gallic acid ทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงและนำไปหาค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้กราฟมาตรฐาน gallic acid จากนั้นคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า $\mu\text{mol GAE/g tea}$

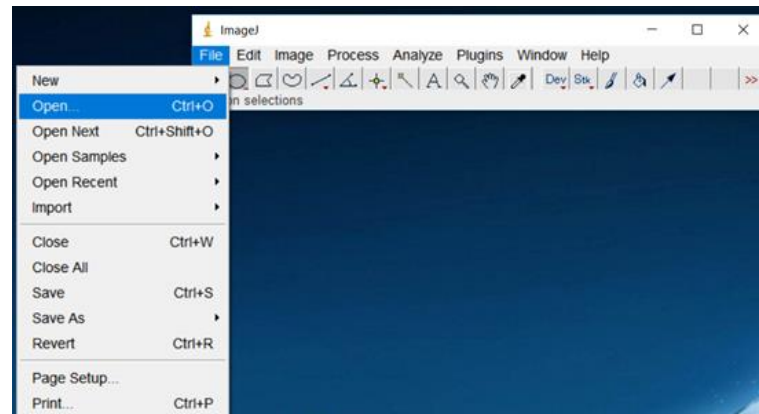
นำค่า $\mu\text{mol GAE/g}$ ของตัวอย่างชาที่วิเคราะห์ได้จากอุปกรณ์ที่พัฒนามาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีดั้งเดิมเพื่อศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

3.7.2 ศึกษาความเสถียรของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาแนวโน้มการเป็นอุปกรณ์พร้อมใช้

นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมาทำการหยดสารละลาย FRAP ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษห่มละ 5 μl ปล่อยให้แห้ง แบ่งอุปกรณ์ตรวจวัดออกเป็น 2 กลุ่ม โดยนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสงแดด และกลุ่มที่ 2 นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดทั้ง 2 กลุ่มมาทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน 50 $\mu\text{g/ml Gallic acid}$ ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้น เป็นระยะเวลาต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการพล็อตค่าความเข้มข้นของแต่ละวันเปรียบเทียบกัน

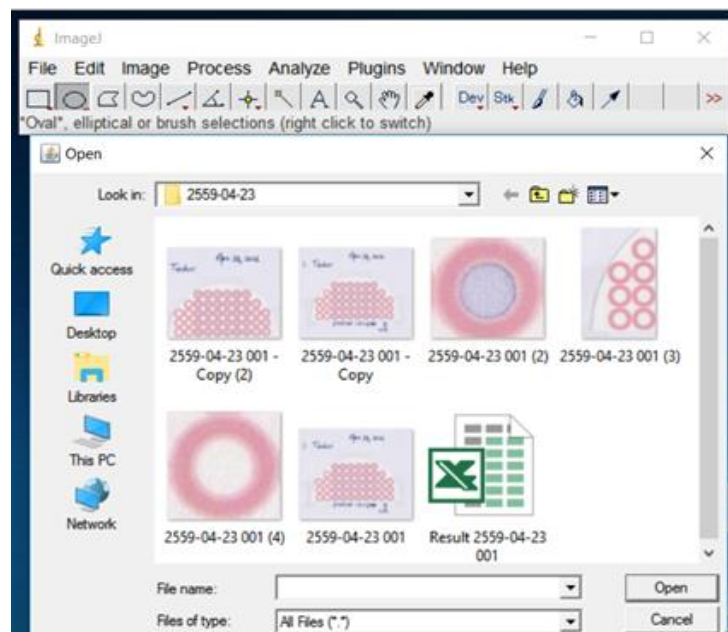
3.8 การวิเคราะห์ความเข้มข้นด้วยโปรแกรม ImageJ

1. เปิดโปรแกรม ImageJ



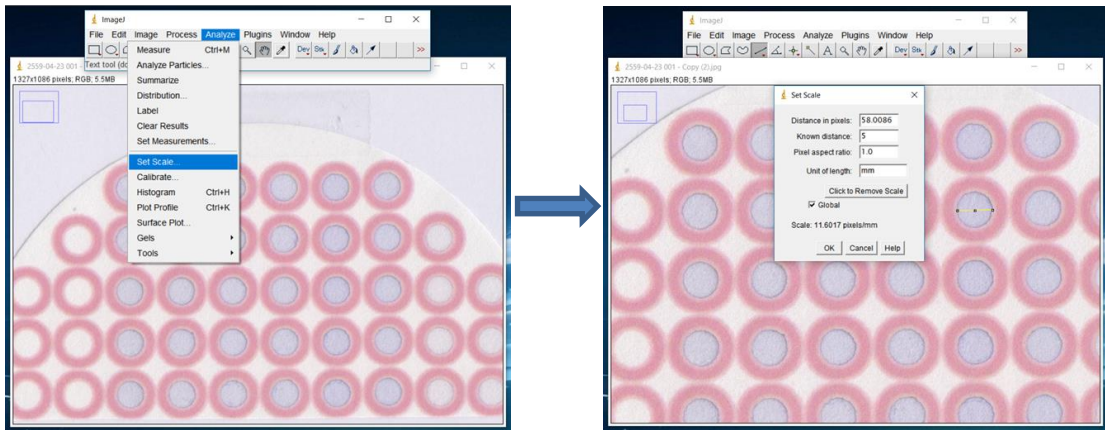
ภาพที่ 3-3 แสดงการเปิดโปรแกรม ImageJ

2. เลือก open แล้วเลือกรูปที่ต้องการประมวลผล



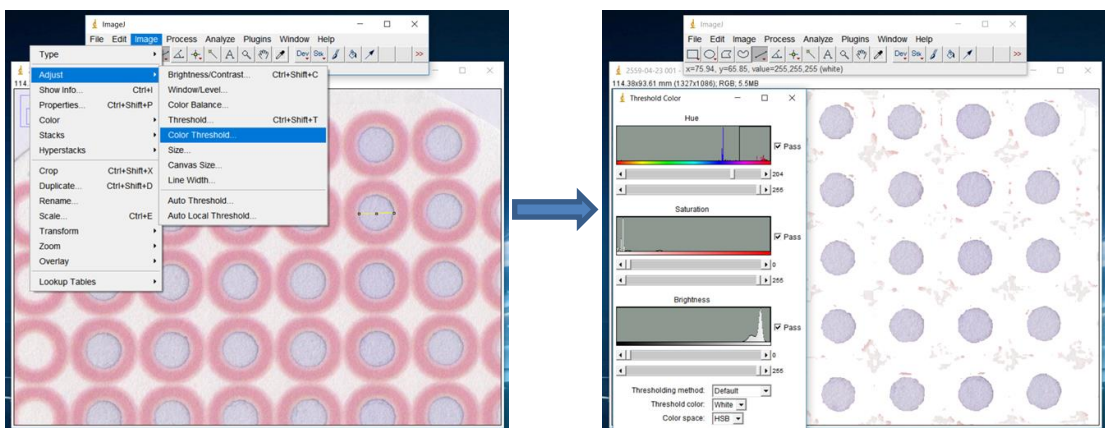
ภาพที่ 3-4 แสดงการเปิดไฟล์รูปภาพมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ

3. Set scale ของบริเวณที่ตรวจวัด



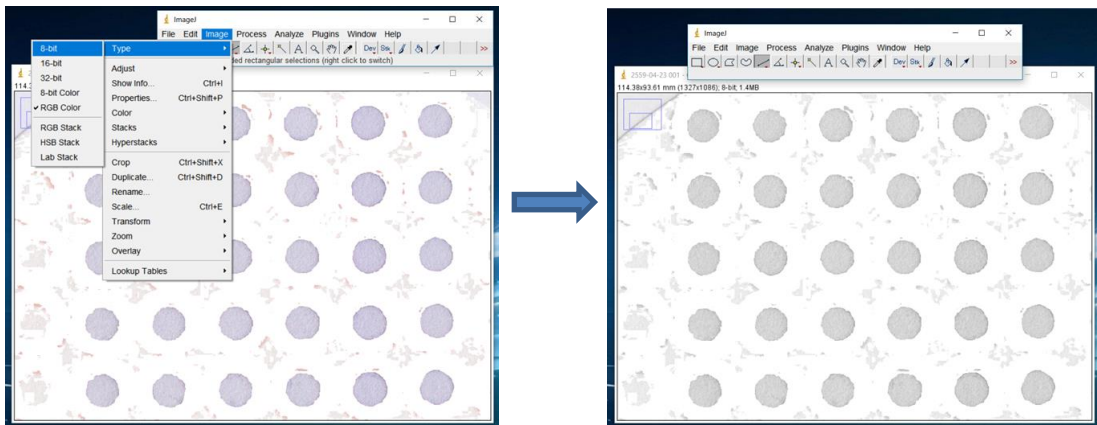
ภาพที่ 3-5 แสดงการ Set scale ของบริเวณที่ตรวจวัดในโปรแกรม ImageJ

4. ปรับรูปให้เหลือเฉพาะสีที่ต้องการโดยไปที่ Image --> adjust --> color threshold จะปรากฏ box ขึ้นมาดังรูป เลือก pass ทั้งหมด เลือก Threshold color : White, Color space : HSB ปรับสีโดยเลื่อน scale บริเวณ Hue = 204 ส่วน scale อื่นให้ปรับตามภาพที่ 3-6



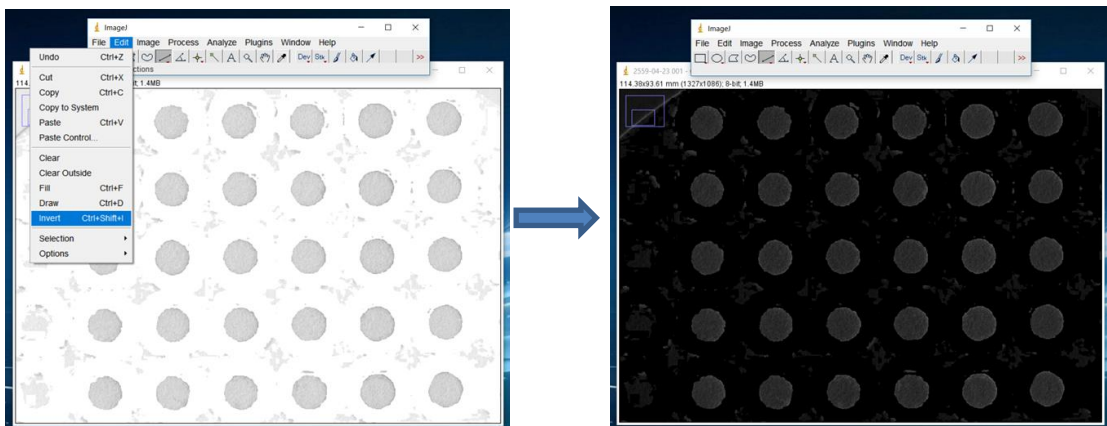
ภาพที่ 3-6 แสดงการปรับสีในโปรแกรม ImageJ

5. ปรับเป็นสี gray โดยไปที่ Image --> Type --> 8-bit



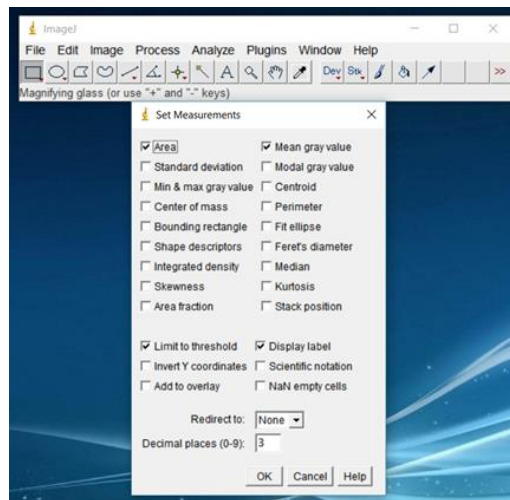
ภาพที่ 3-7 แสดงการปรับเป็นสี gray ในโปรแกรม ImageJ

6. ปรับให้เป็น gray intensity โดยเลือก Edit --> invert



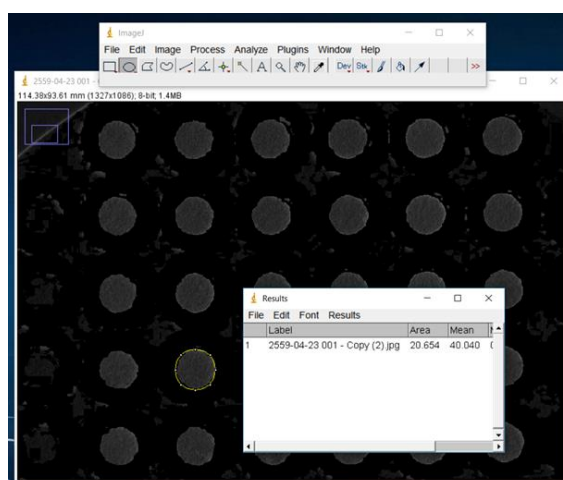
ภาพที่ 3-8 แสดงการปรับเป็น gray intensity ในโปรแกรม ImageJ

7. ตั้งค่าวัดความเข้มสีโดยไปที่ analyze --> set measurements จะปรากฏ box ดังรูป ให้เลือก Area, Mean gray value, limit to threshold และ display label (ทำเฉพาะครั้งแรกที่ใช้โปรแกรม) แล้วคลิก OK



ภาพที่ 3-9 แสดงการ set measurements ในโปรแกรม ImageJ

8. เลือกบริเวณที่ต้องการวัด intensity โดยเลือก shortcut ตามแบบรูปที่ต้องการ จากนั้นลากกรอบบริเวณที่ต้องการวัด เมื่อได้บริเวณแล้วให้ไปที่ Analyze Measurement หรือใช้ Ctrl+M ได้เลย ค่า Mean ที่ปรากฏคือค่า mean gray scale intensity ที่ได้จากการประมวลผลภาพ



ภาพที่ 3-10 แสดงการ Analyze Measurement ในโปรแกรม ImageJ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปราย


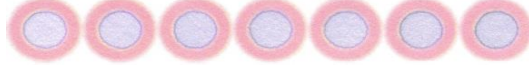



4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

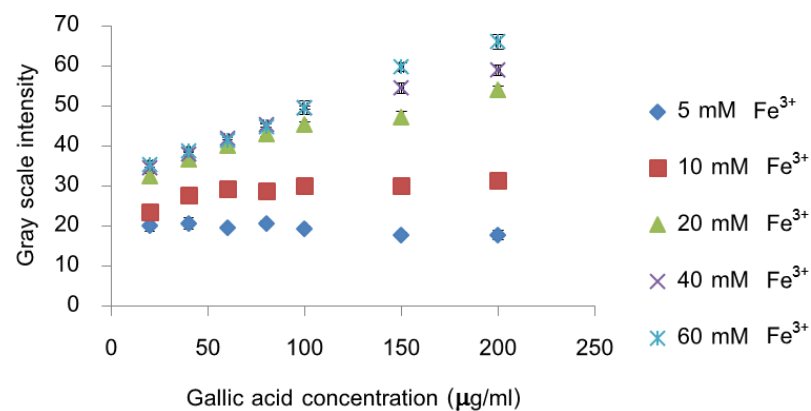
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP ได้แก่

4.1.1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย Iron (III) chloride

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP นั้นอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสีของ FRAP reagent ของสารประกอบเชิงซ้อนของ $[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{3+}$ ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ Fe^{3+} จะถูกรีดิวซ์กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ $[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{2+}$ ซึ่งมีสีน้ำเงิน ความเข้มสีที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง เริ่มต้นทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย FeCl_3 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย FeCl_3 จะต้องให้สัญญาณที่สูงสามารถตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ที่ความเข้มข้นที่ต่ำ ๆ ศึกษาสารละลาย FeCl_3 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5-60 mM เริ่มจากการเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 mM sodium acetate buffer pH 3.6 รวมกับสารละลาย FeCl_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ 10 mM TPTZ ในอัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นนำ FRAP reagent ที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 150 และ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ทำ blank เปรียบเทียบในทุกความเข้มข้นของ FeCl_3 ที่ศึกษา ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 5 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4-1 ซึ่งแสดงความเข้มสีในการวิเคราะห์ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ Fe^{3+} ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า สำหรับทุกๆความเข้มข้นของ Fe^{3+} เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ gallic acid จะทำให้ความเข้มสีเพิ่มขึ้น นำค่าความเข้มสีมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid สำหรับทุกๆความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่ศึกษาดังแสดงในภาพที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 คู่มือตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้จากการวิเคราะห์ gallic acid ที่ความเข้มข้น 20-200 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อใช้ FeCl_3 ความเข้มข้นต่างกันในการเตรียมสารละลาย FRAP reagent

ความเข้มข้นของ Fe^{3+} (mM)	การเปลี่ยนแปลงความเข้มของสี
5	 20 40 60 80 100 150 200 $\mu\text{g/ml}$
10	 20 40 60 80 100 150 200 $\mu\text{g/ml}$
20	 20 40 60 80 100 150 200 $\mu\text{g/ml}$
40	 20 40 60 80 100 150 200 $\mu\text{g/ml}$
60	 20 40 60 80 100 150 200 $\mu\text{g/ml}$

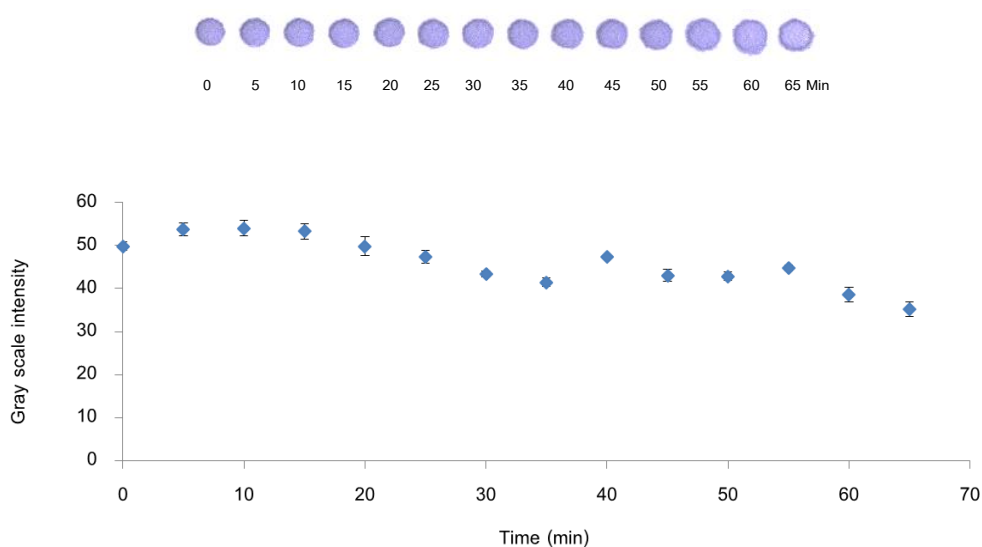


ภาพที่ 4 -1 กราฟพล็อตระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid เมื่อใช้ FeCl_3 ความเข้มข้นต่างกัน (n = 4)

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและ gallic acid เมื่อใช้ Fe^{3+} เข้มข้นต่างกัน พบว่าสำหรับทุกความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่ใช้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ gallic acid ความเข้มข้นก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีชัดเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้นของ gallic acid แตกต่างกัน หรือให้ความไวในการวิเคราะห์มากที่สุด (ความชันกราฟของการวิเคราะห์มากที่สุด) คือ Fe^{3+} เข้มข้น 60 mM ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ Fe^{3+} ที่มีความเข้มข้น 60 mM เตรียม FRAP รีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อให้ได้การวิเคราะห์ที่มีสภาพไวสูง

4.1.2 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย FRAP และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง FRAP reagent และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ โดยการหยดสารละลาย FRAP รีเอเจนต์ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษแล้วจึงหยดสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ลงไป ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ก่อนที่จะเป่าให้แห้งด้วยไดร์เป่าผมแล้วถ่ายภาพทำการพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาได้ผลการทดลองดังแสดงดังภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 แสดงผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง FRAP reagent กับ gallic acid 50 $\mu\text{g/ml}$ (n = 4)

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง FRAP รีเอเจนต์ กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ที่มีความเข้มข้น 50 µg/ml พบว่า ที่เวลา 5 นาที ความเข้มข้นจะมีค่ามากที่สุดและจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเมื่อเวลาผ่านไประยะเวลาหนึ่ง FRAP reagent ที่หยดลงไปบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนั้นเกิดการระเหยแห้งไป ทำให้โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} ($[Fe(TPTZ)]^{3+}$) เปลี่ยนแปลงไป ทำให้การเกิดปฏิกิริยากับ gallic acid ได้น้อยลง ส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์ intensity ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าระยะเวลา 5 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้น

ดังนั้น การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ดังตาราง 4-2

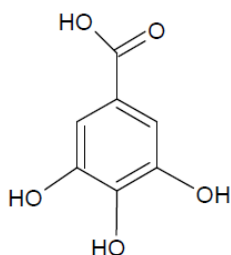
ตาราง 4-2 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สภาวะที่ทำการศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
1. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย Iron (III) chloride	60 mM
2. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย FRAP และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน	5 นาที

4.2 ผลการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

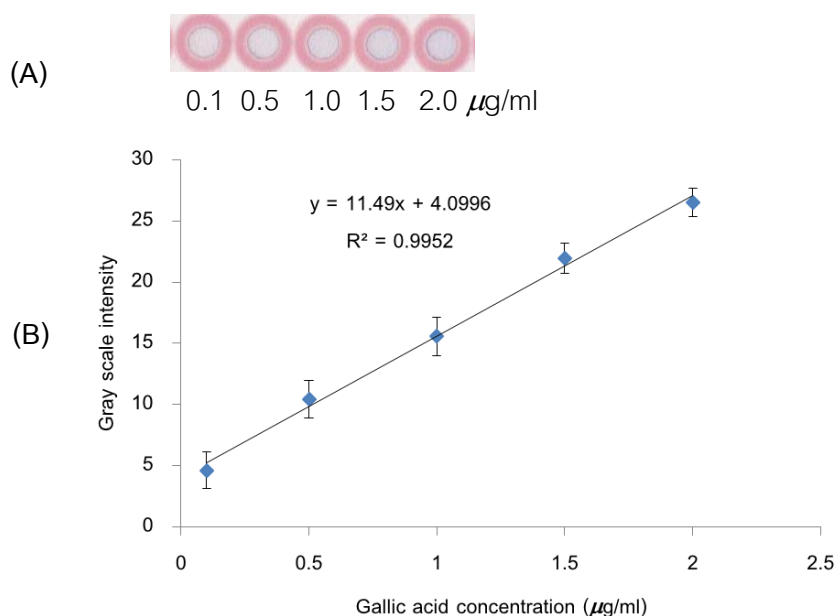
4.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

gallic acid หรือชื่อในระบบ IUPAC คือ 3,4,5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนินพบมากในองุ่น ใบชา เปลือกต้นโอ๊ก และพืชอื่น ๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยาง gallic acid สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Reynolds and Wilson, 1991) นอกจากนี้ gallic acid ยังช่วยป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียดเมื่ออายุมากขึ้นซึ่งช่วยลดอัตราการป่วยโรคหัวใจ และโรคมะเร็งในผู้สูงอายุ (Phakthong, Liawruangrath, & Liawruangrath, 2014)



ภาพที่ 4-3 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ gallic acid ด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-4 (A) ซึ่งจะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ gallic acid เพิ่มขึ้น ความเข้มสีจะมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} ($[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$) ที่มีสีน้ำตาลอ่อน จะทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid แล้วถูกรีดิวซ์ไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} ($[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$) ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงินที่เข้มขึ้น เมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid จะได้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9952$ ดังแสดงในภาพที่ 4-4 (B)



ภาพที่ 4-4 (A) แสดงการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อสารละลาย gallic acid ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent (B) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid ($n = 8$)

ตารางที่ 4-3 ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ gallic acid

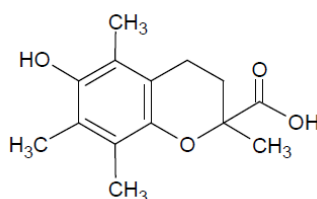
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Gray scale intensity (Mean, n=8)	SD	%RSD
0.5	10.45	1.54	14.75
1.0	15.56	1.59	10.22
1.5	21.95	1.26	5.76
2.0	26.51	1.18	4.45

ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ gallic acid ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 8 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 4.45-14.75 (n = 8) แสดงให้เห็นว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน gallic acid

การวิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น พบว่าความเข้มข้นของ gallic acid ที่ต่ำที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.07 $\mu\text{g/ml}$

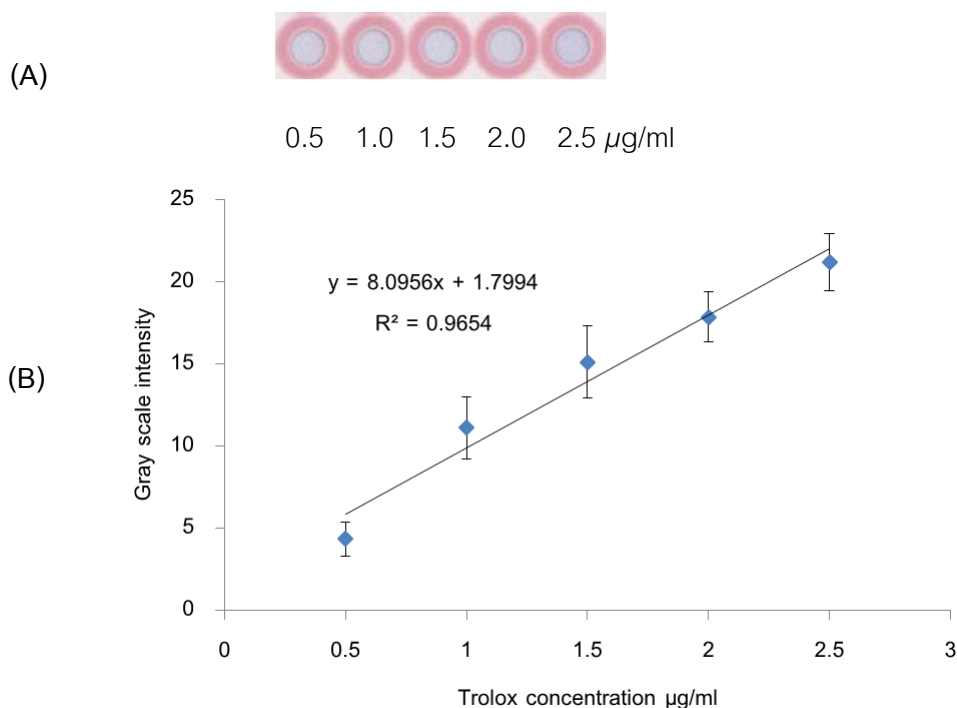
4.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

trolox หรือชื่อในระบบ IUPAC คือ 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายแอลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิกก็ทำให้สามารถละลายได้ดีในน้ำ จึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลาอันยาวนานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันที นักวิจัยนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (โสภา และคณะ, 2549)



ภาพที่ 4-5 โครงสร้างทางเคมีของ trolox

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-6 (A) ซึ่งจะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ Trolox เพิ่มขึ้น ความเข้มสีจะมีค่าเพิ่มขึ้นคล้ายกับผลที่ปรากฏเมื่อวิเคราะห์ gallic acid เมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ trolox จะได้กราฟมาตรฐานที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ trolox เท่ากับ 0.5-2.5 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9654$ ดังแสดงในภาพที่ 4-6 (B)



ภาพที่ 4-6 (A) แสดงการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อสารละลาย Trolox ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent (B) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย trolox (n = 8)

ตารางที่ 4-4 ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ trolox

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Gray scale intensity (Mean, n = 8)	SD	%RSD
1.0	11.13	1.90	17.05
1.5	15.14	2.19	14.48
2.0	17.88	1.50	8.41
2.5	21.22	1.75	8.26

ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ trolox ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 8 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 8.26-17.05 (n = 8) แสดงให้เห็นว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน trolox

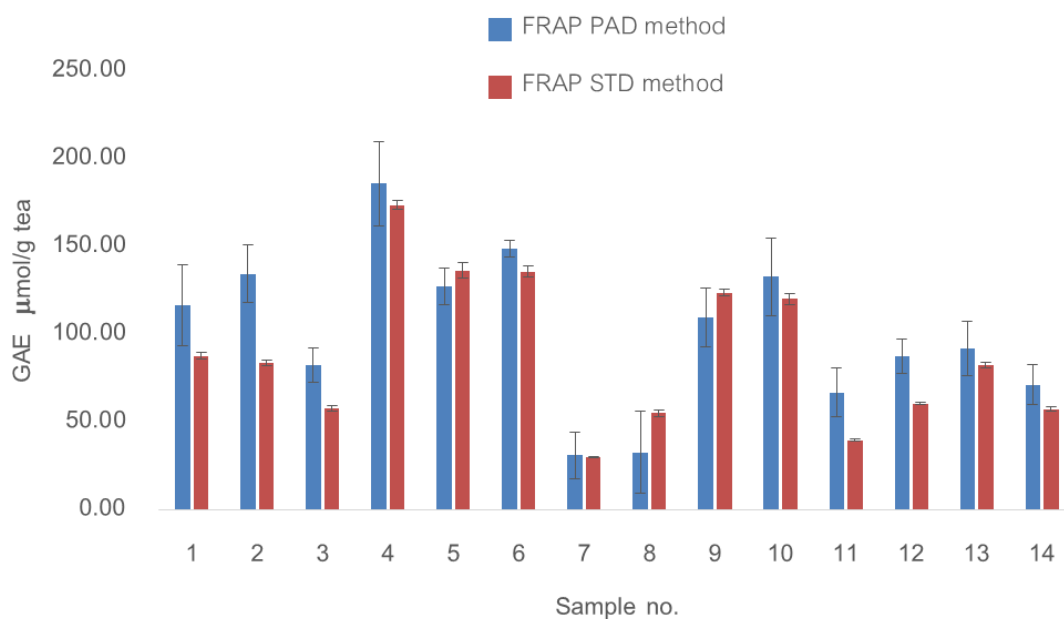
การวิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น พบว่าความเข้มข้นของ gallic acid ที่ต่ำที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.30 $\mu\text{g/ml}$

4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์

4.3.1 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid พบว่าสามารถทำได้โดยใช้ FRAP reagent ปริมาตรรวม 5 μl และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ปริมาตร 5 μl ซึ่งในการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกันและใช้สารในการวิเคราะห์เพียง 10 μl ให้ค่าการวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงสูง แสดงให้เห็นว่าวิธี FRAP บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์ได้จริง เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในใบชาแห้ง 14 ตัวอย่าง ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) เปรียบเทียบกับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วย $\mu\text{mol gallic acid equivalent/g tea}$ ซึ่งหมายถึงความสามารถ

ในการต้านอนุมูลอิสระเทียบ $\mu\text{mol gallic acid}$ ต่อหนึ่งกรัมของชา ซึ่งมีการทำ sample blank ควบคู่กับทุกตัวอย่างชา จากการวิเคราะห์ที่ได้ผลการทดลองดังแสดงภาพที่ 4-7



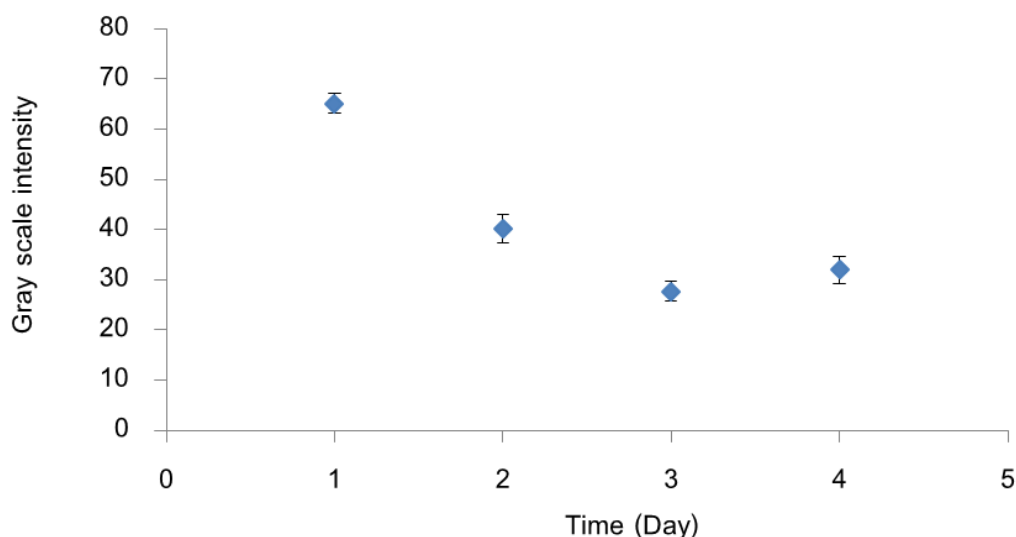
ภาพที่ 4-7 แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา ตัวอย่างที่ 1-14 ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) ($n = 3$)

จากการทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีดั้งเดิมด้วย t-test: paired two sample for means (two-tail test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ค่า t_{stat} มีค่าเท่ากับ 2.09 และค่า t Critical two-tail มีค่าเท่ากับ 2.18 ซึ่งค่า t_{critical} two-tail มีค่ามากกว่า t_{stat} แสดงให้เห็นว่าค่า GAE ที่วิเคราะห์ได้ระหว่างวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธีแบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เป็นการยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แม่นยำเทียบเท่ากับวิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม โดยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) เป็นวิธีที่ใช้ปริมาตรสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในปริมาณน้อย สามารถช่วยลดของเสียที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ได้มาก สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้พร้อมกันหลายตัวอย่าง (>50

ตัวอย่าง/ครั้ง) ซึ่งอุปกรณ์แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมานี้มีราคาถูก ซึ่งในการวิเคราะห์จะต้องใช้แค่เครื่องสแกนเนอร์ร่วมกับโปรแกรมประมวลผลภาพเป็นระบบตรวจวัดสัญญาณ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขนาดใหญ่ซึ่งมีราคาที่สูงกว่าในการตรวจวัด ทำให้วิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้สำหรับตรวจภาคสนามได้

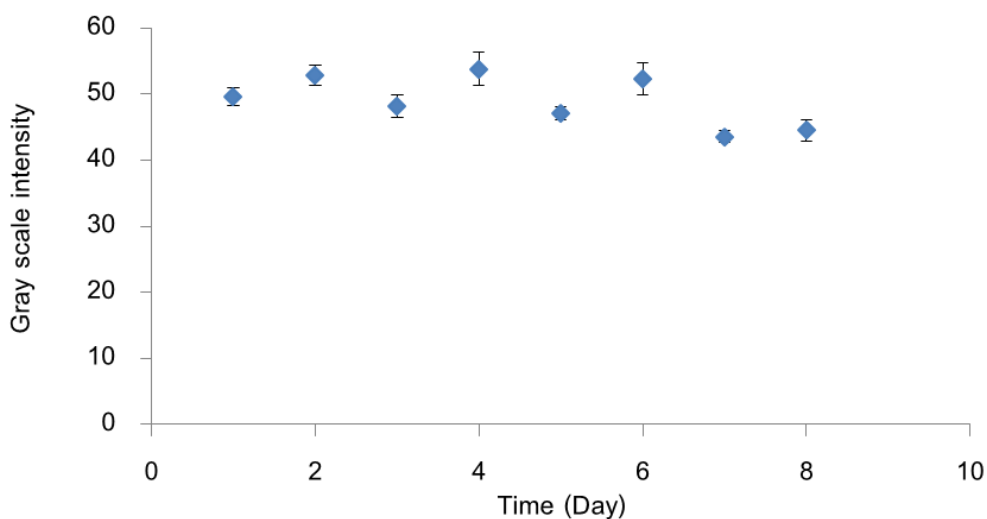
4.3.2 ผลการศึกษาความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

เมื่อนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 ที่เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสงแดด และกลุ่มที่ 2 ที่นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น มาทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน 50 µg/ml gallic acid ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้น เป็นระยะเวลาต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการพล็อตค่าความเข้มข้นของแต่ละวันเปรียบเทียบกันได้ พบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 มีผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นที่ลดต่ำลงในแต่ละวัน แสดงว่าอุปกรณ์กระดาษที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่เสถียรเมื่อเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากเมื่ออุปกรณ์ตรวจวัดที่หยดรีเอเจนต์ลงไปได้รับความร้อนแล้วเกิดการสลายตัวไป ทำให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ทำให้ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงในภาพที่ 4-8



ภาพที่ 4-8 แสดงผลการวิเคราะห์ความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 ที่ถูกเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสง (n = 3)

สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาศกลุ่มที่ 2 ที่ถูกเก็บไว้ในตู้เย็นจะมีผลการวิเคราะห์ความเข้มสีที่ค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาศที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเสถียรเมื่อทำการเก็บรักษาไว้โดยการแช่เย็น ซึ่งสาเหตุที่อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาศนี้สามารถที่จะให้ผลการวิเคราะห์ความเข้มสีที่คงที่ น่าจะมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิที่เย็น และความชื้นจะช่วยให้อิเล็กตรอนมีความเสถียรทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี แม้จะเก็บไว้เป็นเวลานานมากกว่าหนึ่งสัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 4-9



ภาพที่ 4-9 แสดงผลการวิเคราะห์ความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาศกลุ่มที่ 2 ที่เก็บในตู้เย็น (n = 3)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based device) โดยสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษขึ้นด้วยวิธีการพิมพ์ด้วยเครื่องพิมพ์แบบไข (wax printer) ให้มีลักษณะของบริเวณตรวจวัด (testing zone) เป็นแบบหลุมวงกลม (well) ลงบนกระดาษกรอง Whatman ที่สามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP ซึ่งอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ (Ferric-tripyridyltriazine complex) กับสารต้านอนุมูลอิสระแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากน้ำตาล เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินม่วง ของสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Ferrous-tripyridyltriazine complex) โดยความเข้มของสีน้ำเงินม่วงจะแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง โดยในการวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย iron(III)chloride ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารละลาย FRAP reagent ที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีน้ำเงินที่ชัดเจนที่สุด คือความเข้มข้น 60 mM และได้ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการปล่อยให้สารละลาย FRAP reagent ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง ก่อนที่จะทำการเป่าแห้ง พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 5 นาที ผลการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ได้แก่ช่วงความเป็นเส้นตรง พบว่าสำหรับสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในความเข้มข้นที่ต่ำคือ 0.1-2.0 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน trolox อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.5-2.5 $\mu\text{g/ml}$ ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัด gallic acid มีค่าเท่ากับ 0.07 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน trolox มีค่าเท่ากับ 0.30 $\mu\text{g/ml}$ ค่าความสามารถในการทำซ้ำ (%RSD) พบว่า การวิเคราะห์ซ้ำของ gallic acid มีค่าอยู่ระหว่าง 4.45 – 14.75 (n = 8) ส่วน trolox มีค่าอยู่ระหว่าง 8.26 – 17.05 (n = 8) และศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based device) เทียบกับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยได้วิเคราะห์ตัวอย่างชาชนิดชงจำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองข้างต้นจึงทำให้สามารถสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ได้อย่างถูกต้องและ

แม่นยำ สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่าง (มากกว่า 50 ตัวอย่าง) สามารถใช้เป็นวิธีในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ หรือเทคโนโลยีราคาแพงในการวิเคราะห์ มีความสะดวกเหมาะสมสำหรับใช้งานในภาคสนาม เนื่องจากมีน้ำหนักเบา ใช้งานได้ง่าย มีราคาถูก และใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในปริมาณน้อย

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาการนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง อื่น ๆ เช่น ในผัก ผลไม้ อาหารเสริม และสมุนไพร ต่าง ๆ ต่อไป

บรรณานุกรม

- บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 275-286.
- ปรีชนันท์ บัวสด. (2549). การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนซ์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไฮคลิกโวลแทมเมตรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พัชรีย์ พริบัติเวช. (2552). การสกัดและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากใบชาสายพันธุ์ *Camellia sinensis*. เข้าถึงได้จาก http://teainstitutemfu.com/main/wp-content/uploads/2013/09/rs_020.pdf.
- โสภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ (พิมพ์ครั้งที่ 2 แก้ไขและเพิ่มเติม). กรุงเทพฯ: นิเวศมิตรการพิมพ์.
- Alia, M., Horcajo, C., Bravo, L., & Goya, L. (2003). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutrition Research*, 23, 1251-1267.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., & Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.
- Benzie, I.F.F., & Szeto, Y.T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 633-636.
- Carrilho, E., Martinez, A.W., & Whitesides, G.M. (2009). Wax printing : a simple micropatterning process for paper based microfluidics. *Anal Chem*, 81(16), 7091-7095.
- Chattopadhyay, N., Ghosh, T., Sinha, S., Chattopadhyay, K., Karmakar, P., & Ray, B. (2010). Polysaccharides from *Turbinaria conoides* : structural features and antioxidant capacity. *Food Chem*, 118, 823-829.
- Denisov, E.T., & Afanas'ev, I.B. (2005). *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

- Dungchai, W., Chailapakul, O., & Henry, C.S. (2011). A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst*, 136, 77-82.
- Fenton, E.M., Mascarenas, M.R., Lopez, G.P., & Sibbett, S.S. (2009). Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. *ACS Applied Material and Interfaces*, 1(1), 124-129.
- Halliwell, B. (1991). Drug antioxidant effects: a basis for drug selection. *J. Drugs.*, 42(4), 569-605.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(5), 531-542.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Jokerst, J.C., Adkins, J.A., Bisha, B., Mentele, M.M., Goodridge, L.D., & Henry, C.S. (2012). Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens. *Analytical Chemistry*, 84(6), 2900-2907.
- Lisowski, P., & Zarzycki, P.K. (2013). Microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) and micro total analysis systems (μ TAS): development, applications and future trends. *Chromatographia*, 76, 1201-1214.
- Martinez, A.W., Phillips, S.T., Wiley, B.J., Gupta, M., & Whitesides, G.M. (2008). Flash: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab Chip*, 8, 2146-2150.
- Nie, J., Zhang, Y., Lin, L., Zhou, C., Li, S., Zhang, L., & Li, J. (2012). Low-cost fabrication of paper-based microfluidic devices by one step. *Analytical Chemistry*, 84, 6331-6335.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402.
- Que, F., Mao, L.C., & Zheng, X.J. (2007). In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 196-203.
- Ramamoorthy, P.K., & Bono, A. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of Morinda Citrifolia fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2, 70-80.
- Roberfroid, M.B., & Calderon, P.B. (1995). *Free radicals and oxidation phenomena in biological systems*. New York: Marcel Dekker.
- Sameenoi, Y., Na Nongkai, P., Nouanthavong, S., Henryb, C.S., & Nacaprichac, D. (2014). One-step polymer screen-printing for microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) fabrication. *Analyst*, 139, 6580-6588.
- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escoria, A., & Saura-Calixto, F. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*, 20(7), 941-953.
- Scott, D.A., Poston, R.N., Wilson, R.F., Coward, P.Y., & Palmer, R.M. (2005). The influence of vitamin C on systemic markers of endothelial and inflammatory cell activation in smokers and non-smokers. *Inflammation Research*, 54(3), 138-144.
- Sharpe, E., Frasco, T., Andreescu, D., & Andreescu, S. (2013). Portable ceria nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (NanoCerac). *Analyst*, 138(1), 249-262.
- Sies, H., Stahl, W., & Sundquist, A. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences*, 669, 7-20.

- Van Acker, B. A., Hulsewe, K.W., Wagenmakers, A.J., Von Meyenfeldt, M.F., & Soeters, P.B. (2000). Response of glutamine metabolism to glutamine-supplemented parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 790-795.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- Vichitphan, S., Vichitphan, K., & Sirikhansaeng, P. (2007). Flavonoid content and antioxidant activity of Krachai-dun (*Kaempferia parviflora*) wine. *KMITL Science and Technology Journal*, 7, 97-105.

ภาคผนวก

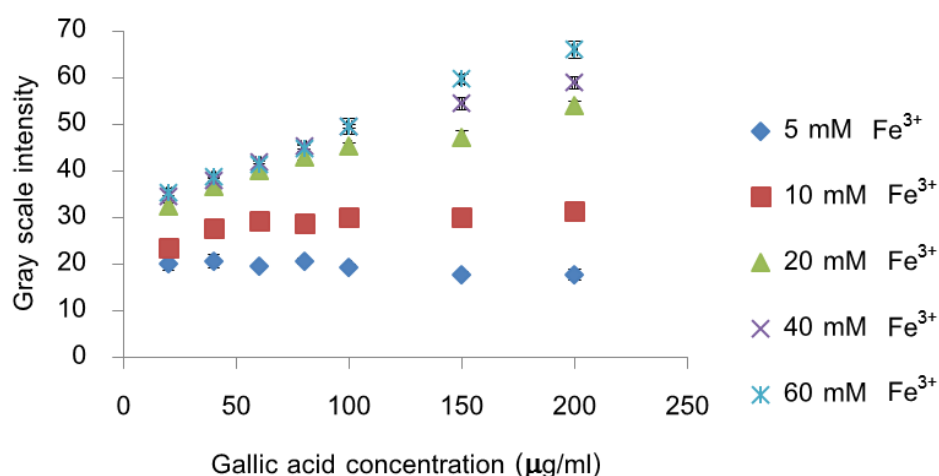
ภาคผนวก ก

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 แสดงข้อมูลการหาค่า Intensity ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 20-200 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อใช้ FeCl_3 ความเข้มข้นต่างกันในการเตรียมสารละลาย FRAP reagent

[gallic acid] ($\mu\text{g/ml}$)	Intensity				
	[Fe^{3+}]	[Fe^{3+}]	[Fe^{3+}]	[Fe^{3+}]	[Fe^{3+}]
	5 mM	10 mM	20 mM	40 mM	60 mM
20	20.07	23.47	32.52	34.57	35.42
40	20.64	27.60	36.73	38.00	38.79
60	19.62	29.25	40.03	41.87	41.29
80	20.57	28.78	42.99	45.20	44.81
100	19.41	30.05	45.23	49.45	49.61
150	17.79	30.18	47.15	54.45	59.67
200	17.66	31.49	53.93	58.88	65.99

เมื่อนำค่าความเข้มสีมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid สำหรับทุก ๆ ความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่ศึกษาแสดงในภาพภาคผนวก ก-1

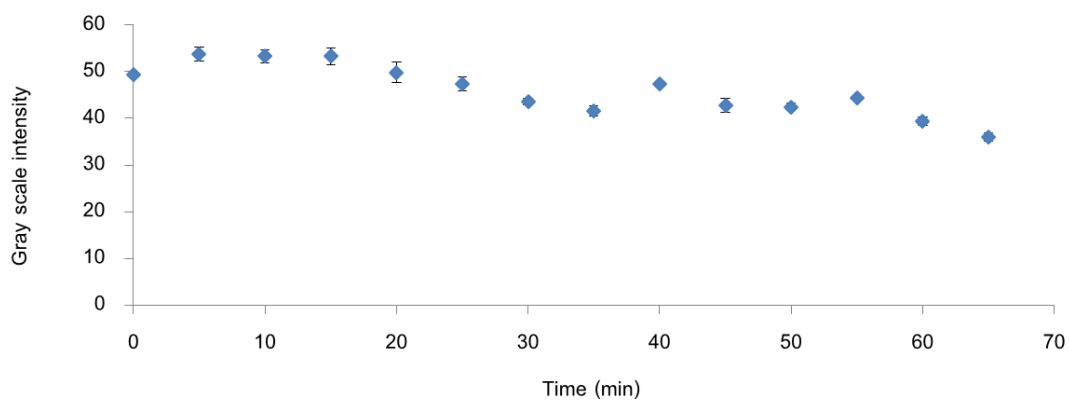


ภาพภาคผนวก ก-1 แสดงกราฟที่พล็อตระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid เมื่อใช้ FeCl_3 ความเข้มข้นต่างกัน ($n = 4$)

ตารางภาคผนวกที่ ก-2 แสดงข้อมูลการหาค่า Intensity ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ก่อนที่จะเป่าให้แห้งด้วยไดร์เป่าผม

Time (min)	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -blank
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
b	9.61	7.15	8.36	8.37	1.23	0.00
0	58.33	57.80	57.23	57.79	0.55	49.41
5	63.78	61.32	61.32	62.14	1.42	53.77
10	63.09	61.62	60.37	61.70	1.36	53.32
15	63.57	61.53	59.99	61.70	1.80	53.32
20	59.82	59.04	55.79	58.22	2.14	49.84
25	57.37	55.29	54.62	55.76	1.43	47.39
30	52.12	52.68	51.19	52.00	0.76	43.62
35	51.25	49.50	49.33	50.03	1.07	41.65
40	55.65	55.99	55.36	55.66	0.32	47.29
45	52.68	51.26	49.54	51.16	1.57	42.79
50	51.16	51.32	49.90	50.79	0.78	42.42
55	53.33	52.40	52.79	52.84	0.47	44.47
60	46.74	48.27	48.31	47.77	0.90	39.40
65	44.19	45.25	43.53	44.32	0.87	35.95

นำค่าความเข้มสีของสารละลาย gallic acid เข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ มาพล็อตเทียบกับ
ระยะเวลาที่ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังแสดงใน
ภาพภาคผนวก ก-2



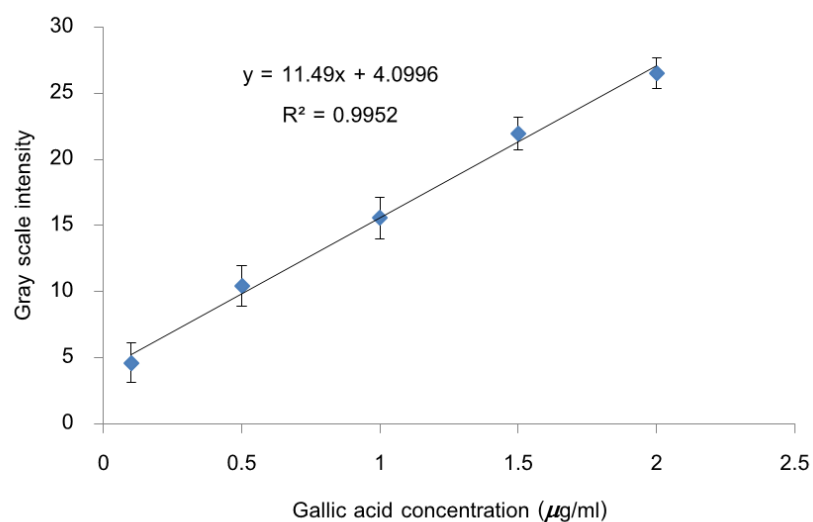
ภาพภาคผนวก ก-2 แสดงกราฟที่พล็อตระหว่างความเข้มสีกับระยะเวลาที่ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา
ก่อนทำการเป่าให้แห้ง ($n = 3$)

ภาคผนวก ข

ผลการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัด
แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก ข-1 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรง, LOD และ %RSD ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

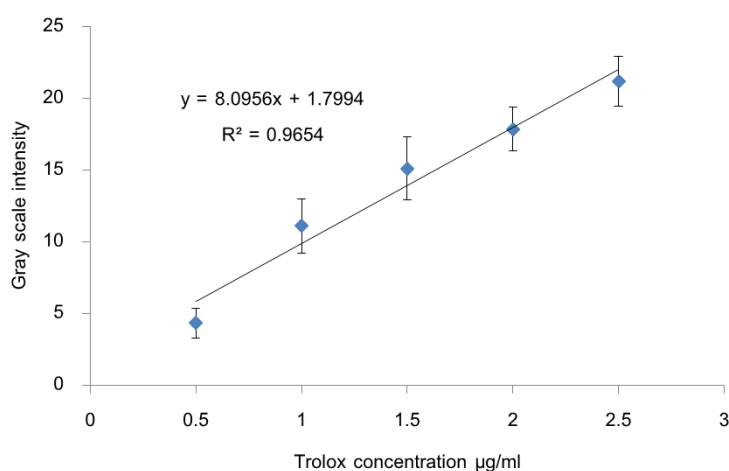
ครั้งที่	Intensity					
	blank	[gallic acid] 0.1 µg/ml	[gallic acid] 0.5 µg/ml	[gallic acid] 1.0 µg/ml	[gallic acid] 1.5 µg/ml	[gallic acid] 2.0 µg/ml
	1	5.66	10.55	13.95	19.46	28.10
2	5.83	11.39	16.26	21.53	26.99	32.07
3	5.44	11.98	18.21	20.65	27.57	31.25
4	5.66	11.89	13.90	20.61	25.79	33.49
5	5.25	9.92	16.20	23.84	29.44	33.83
6	5.72	8.39	16.46	19.55	28.89	32.93
7	5.22	8.80	17.65	20.38	27.36	31.17
8	5.86	8.70	15.65	23.09	26.11	30.74
\bar{X}	5.58	10.20	16.03	21.14	27.53	32.09
SD	0.25	1.47	1.54	1.59	1.26	1.18
\bar{X} -N	0.00	4.62	10.45	15.56	21.95	26.51
LOD	0.06	-	-	-	-	-
%RSD	-	-	14.75	10.22	5.76	4.45



ภาพภาคผนวก ข-1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid (n = 8)

ตารางภาคผนวก ข-2 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรง, LOD และ %RSD ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

ครั้งที่	Intensity					
	blank	[trolox]	[trolox]	[trolox]	[trolox]	[trolox]
		0.5 µg/ml	1.0 µg/ml	1.5 µg/ml	2.0 µg/ml	2.5 µg/ml
1	4.37	11.03	19.15	18.64	23.21	26.39
2	5.89	10.88	17.48	16.90	22.93	24.66
3	6.39	10.70	17.36	20.24	25.25	27.48
4	5.91	8.00	16.57	22.98	26.80	28.32
5	5.22	10.19	14.91	22.22	23.13	29.33
6	5.64	9.46	19.22	22.63	22.34	28.34
7	6.98	10.30	17.38	22.25	23.09	27.49
8	6.39	11.02	13.74	22.00	23.05	24.50
\bar{X}	5.85	10.20	16.98	20.98	23.72	27.06
SD	0.80	1.03	1.90	2.19	1.50	1.75
\bar{X} -N	0.00	4.35	11.13	15.14	17.88	21.22
LOD	0.30	-	-	-	-	-
%RSD	-	-	17.05	14.48	8.41	8.26



ภาพภาคผนวก ข-2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย trolox (n = 8)

ภาคผนวก ค

การคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD)

และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percentage relative standard deviation, %RSD)

1. การคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

1.1 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ gallic acid เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

คำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ได้จากสูตร

$$\text{LOD} = 3\text{SD}_B / m$$

เมื่อ LOD คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้

SD_B คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Blank

m คือ ความชันของกราฟ

แทนค่า $\text{SD}_B = 0.25$ และ $m = 11.49$ ในสมการ

$$\text{จะได้ } \text{LOD} = (3 \times 0.25) / 11.49$$

$$\text{LOD} = 0.065$$

∴ ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (LOD) ที่สามารถวิเคราะห์ได้ของ gallic acid ที่วิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.065 $\mu\text{g/ml}$

1.2 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

คำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ได้จากสูตร

$$\text{LOD} = 3\text{SD}_B / m$$

เมื่อ LOD คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้

SD_B คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Blank

m คือ ความชันของกราฟ

แทนค่า $\text{SD}_B = 0.80$ และ $m = 8.0956$ ในสมการ

$$\text{จะได้ } \text{LOD} = (3 \times 0.80) / 8.0956$$

$$\text{LOD} = 0.30$$

∴ ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (LOD) ที่สามารถวิเคราะห์ได้ของ trolox ที่วิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.30 $\mu\text{g/ml}$

2. การคำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD)

2.1 สารละลาย gallic acid

เลือกสารละลาย gallic acid มา 4 ความเข้มข้น (เลือกความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง) มาทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 8 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาความสามารถในการทำซ้ำของวิธี (reproducibility) โดยรายงานเป็นค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ซ้ำ 8 ครั้ง

\bar{X} คือ ค่าเฉลี่ยที่วัดได้จากการการวิเคราะห์ซ้ำ 8 ครั้ง

- สารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$

แทนค่า SD = 1.54 และ \bar{X} = 10.45 ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{1.54 \times 100}{10.45} \\ &= 14.75\end{aligned}$$

%RSD ของสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าเท่ากับ 14.75

- สารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/ml}$

แทนค่า SD = 1.59 และ \bar{X} = 15.56 ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{1.59 \times 100}{15.56} \\ &= 10.22\end{aligned}$$

\therefore %RSD ของสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าเท่ากับ 10.22

- สารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 1.5 $\mu\text{g/ml}$

แทนค่า SD = 1.26 และ \bar{X} = 21.95 ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{1.26 \times 100}{21.95}\end{aligned}$$

$$= 5.76$$

∴ % RSD ของสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 1.5 µg/ml มีค่าเท่ากับ 5.76

- สารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 2.0 µg/ml

แทนค่า SD = 1.13 และ \bar{X} = 26.51 ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned} \%RSD &= \frac{1.13 \times 100}{26.51} \\ &= 4.26 \end{aligned}$$

∴ % RSD ของสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 2.0 µg/ml มีค่าเท่ากับ 4.26

2.2 สารละลายมาตรฐาน trolox

เลือกสารละลาย trolox มา 4 ความเข้มข้น (เลือกความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง) มาทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 8 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาความสามารถในการทำซ้ำของวิธี (reproducibility) โดยรายงานเป็นค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ซ้ำ 8 ครั้ง

\bar{X} คือ ค่าเฉลี่ยที่วัดได้จากการการวิเคราะห์ซ้ำ 8 ครั้ง

- สารละลาย trolox ความเข้มข้น 1.0 µg/ml

แทนค่า SD = 1.90 และ \bar{X} = 11.13 ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned} \%RSD &= \frac{1.90 \times 100}{11.13} \\ &= 17.05 \end{aligned}$$

∴ % RSD ของสารละลาย trolox ความเข้มข้น 1.0 µg/ml มีค่าเท่ากับ 17.05

- สารละลาย trolox ความเข้มข้น 1.5 µg/ml

แทนค่า SD = 2.19 และ \bar{X} = 15.14 ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{2.19 \times 100}{15.14} \\ &= 14.48\end{aligned}$$

∴ % RSD ของสารละลาย trolox ความเข้มข้น 1.5 µg/ml มีค่าเท่ากับ 14.48

- สารละลาย trolox ความเข้มข้น 2.0 µg/ml

แทนค่า SD = 1.50 และ $\bar{X} = 17.88$ ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{1.50 \times 100}{17.88} \\ &= 8.41\end{aligned}$$

∴ % RSD ของสารละลาย trolox ความเข้มข้น 2.0 µg/ml มีค่าเท่ากับ 8.41

- สารละลาย trolox ความเข้มข้น 2.5 µg/ml

แทนค่า SD = 1.75 และ $\bar{X} = 21.22$ ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{1.75 \times 100}{21.22} \\ &= 8.26\end{aligned}$$

∴ % RSD ของสารละลาย trolox ความเข้มข้น 2.5 µg/ml มีค่าเท่ากับ 8.26

ภาคผนวก ง

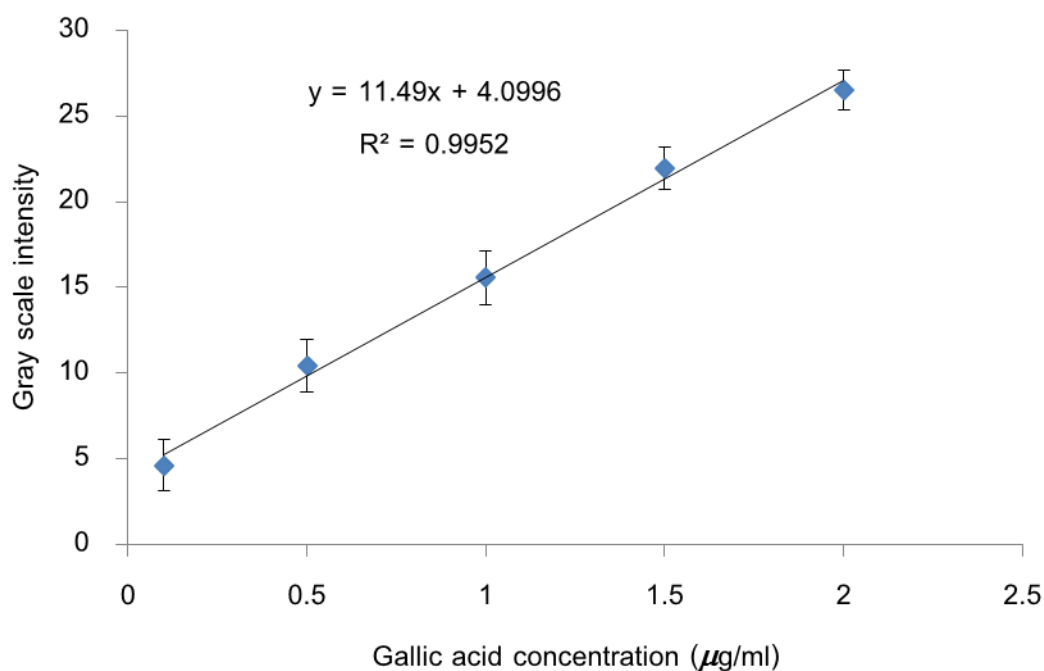
การศึกษาคงทนของการวิเคราะห์ที่ต้านอนุมูลอิสระของวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) เทียบกับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน gallic acid ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธี FRAP

ตารางภาคผนวก ง-1 แสดงผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay)

ครั้งที่	Intensity					
	blank	[gallic acid] 0.1 µg/ml	[gallic acid] 0.5 µg/ml	[gallic acid] 1.0 µg/ml	[gallic acid] 1.5 µg/ml	[gallic acid] 2.0 µg/ml
	1	5.66	10.55	13.95	19.46	28.10
2	5.83	11.39	16.26	21.53	26.99	32.07
3	5.44	11.98	18.21	20.65	27.57	31.25
4	5.66	11.89	13.90	20.61	25.79	33.49
5	5.25	9.92	16.20	23.84	29.44	33.83
6	5.72	8.39	16.46	19.55	28.89	32.93
7	5.22	8.80	17.65	20.38	27.36	31.17
8	5.86	8.70	15.65	23.09	26.11	30.74
\bar{X}	5.58	10.20	16.03	21.14	27.53	32.09
SD	0.25	1.47	1.54	1.59	1.26	1.18
\bar{X} -N	0.00	4.62	10.45	15.56	21.95	26.51

นำข้อมูลผลการวิเคราะห์หามาสร้างกราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based FRAP assay) ได้ดังนี้



ภาพภาคผนวก ง-1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based FRAP assay)

1.1 การคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในหน่วย µmol gallic acid equivalent/g tea

- ตัวอย่างชา sample no. 1

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน gallic acid คือ

$$y = 11.49x + 4.0996$$

เมื่อ y คือ $[Intensity_{\text{sample}} - Intensity_{\text{blank}}]$

X คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างชา

แทนค่า $y = 15.47$ ในสมการ

$$\text{จะได้ } 15.47 = 11.49x + 4.0996$$

$$X = (15.47 - 4.0996) / 11.49$$

$$X = 0.99 \mu\text{g/ml}$$

หา GAE ของตัวอย่างชา

$$\begin{aligned} \text{GA} &= 0.99 \mu\text{g/ml} \\ &= \frac{0.99 \mu\text{g/ml} \times 1 \text{ mole}}{1 \text{ ml} \quad 170.12 \text{ g}} \\ &= 5.81 \times 10^{-3} \mu\text{mole/ml} \end{aligned}$$

ในชา 10 μl เจือจางเป็น 2000 μl (เจือจาง 200 เท่า)

$$= \frac{5.93 \times 10^{-3} \mu\text{mole} \times 10 \mu\text{l} \times 200 \times 1 \text{ ml}}{1 \text{ ml} \quad 1000 \mu\text{l}}$$

$$= 5.93 \times 10^{-3} \mu\text{mole} \times 2$$

$$\begin{aligned} \text{ชา 200 ml} &= \frac{5.93 \times 10^{-3} \mu\text{mole} \times 2 \times 200 \text{ ml} \times 1000 \mu\text{l}}{10 \mu\text{l} \quad 1 \text{ ml}} \\ &= 232.62 \mu\text{mole} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ชา 2 g GA} &= \frac{232.62 \mu\text{mole}}{2 \text{ g}} \\ &= 116.31 \mu\text{mol/g tea} \end{aligned}$$

\therefore ตัวอย่างชา มี gallic acid equivalent = 116.31 $\mu\text{mol/g tea}$

นำผลการวิเคราะห์ของตัวอย่างชาอีก 13 ตัวอย่างมาคำนวณเหมือนตัวอย่างที่ 1 โดยแสดงในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ และได้ข้อมูลดังตารางภาคผนวกที่ ง-2

ตารางภาคผนวกที่ ง-2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based FRAP assay)

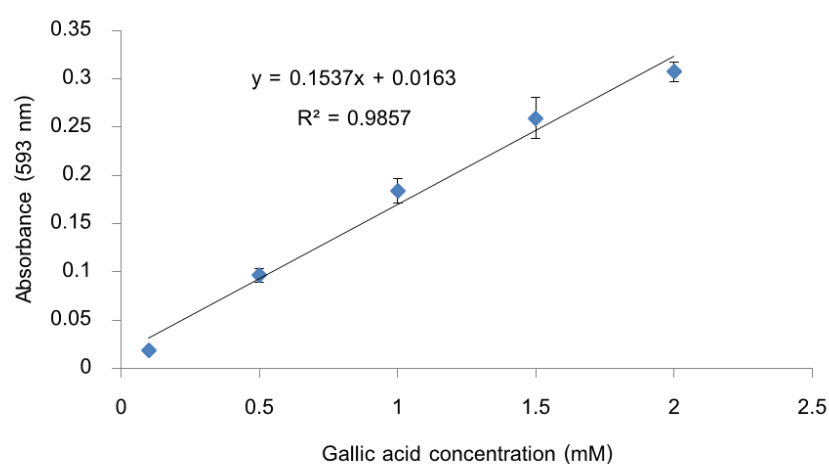
Sample no.	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -blank	$\mu\text{mol GAE/g tea}$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3				
blank	5.42	5.64	6.56	5.87	0.60	0.00	-
1	23.13	18.79	22.12	21.35	2.27	15.47	116.31
2	21.41	23.91	24.44	23.25	1.62	17.38	134.20
3	17.87	19.14	17.22	18.07	0.98	12.20	82.38
4	28.11	25.81	30.51	28.14	2.35	22.27	185.77
5	22.91	23.16	21.30	22.46	1.01	16.58	127.10
6	23.96	24.83	24.75	24.51	0.48	18.64	148.65
7	14.43	12.60	11.96	13.00	1.28	7.12	30.85
8	10.72	15.38	13.56	13.22	2.35	7.34	32.65
9	20.59	19.20	22.48	20.75	1.65	14.88	109.37
10	24.69	23.66	20.55	22.97	2.16	17.09	132.60
11	16.33	15.23	17.95	16.50	1.37	10.63	66.70
12	18.99	17.47	19.27	18.58	0.97	12.71	87.41
13	18.37	20.81	17.97	19.05	1.53	13.18	91.97
14	18.32	16.41	16.33	17.02	1.13	11.15	71.15

2. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

ตารางภาคผนวก ง-3 แสดงผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

[gallic acid] mM	Absorbance			\bar{X}	SD	\bar{X} -blank
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
blank	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000	0.000
0.1	0.022	0.026	0.026	0.025	0.002	0.019
0.5	0.094	0.105	0.108	0.102	0.007	0.096
1	0.175	0.195	0.199	0.190	0.013	0.184
1.5	0.242	0.269	0.285	0.265	0.022	0.259
2	0.309	0.306	0.325	0.313	0.010	0.307

นำข้อมูลผลการวิเคราะห์ค่า Absorbance มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) ได้ดังนี้



ภาพภาคผนวก ง-2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

2.1 การคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในหน่วย $\mu\text{mol gallic acid equivalent/g tea}$

- ตัวอย่างชา sample no. 1

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน gallic acid คือ

$$y = 0.1537x + 0.0163$$

เมื่อ y คือ $[\text{Absorbance}_{\text{sample}} - \text{Absorbance}_{\text{blank}}]$

X คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างชา

แทนค่า $y = 0.151$ ในสมการ

$$\text{จะได้ } 0.151 = 0.1537x + 0.0163$$

$$X = (0.151 - 0.0163) / 0.1537$$

$$X = 0.8764 \text{ mM}$$

หา GAE ของตัวอย่างชา

$$\text{GA } 1.0325 \text{ mM} = \frac{0.8764 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}}$$

$$\begin{aligned} \text{ในชา } 100 \text{ } \mu\text{l} &= \frac{0.8764 \text{ mmol} \times 100 \text{ } \mu\text{l} \times 1 \text{ ml}}{1000 \text{ ml} \times 1000 \text{ } \mu\text{l}} \\ &= 0.8764 \times 10^{-4} \text{ mmole} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ในชา } 200 \text{ ml} &= \frac{0.8764 \times 10^{-4} \text{ mmole} \times 200 \text{ ml} \times 1000 \text{ } \mu\text{l}}{1000 \text{ } \mu\text{l} \times 1 \text{ ml}} \\ &= 0.8764 \times 10^{-1} \text{ mmole} \times 2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ชา } 2 \text{ g GA} &= \frac{0.8764 \times 10^{-1} \text{ mmole} \times 2}{2} \\ &= 0.8764 \times 10^{-1} \text{ mmole/g tea} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{mole}}{1 \text{ mmole}} \\ &= 87.64 \text{ } \mu\text{mol/g tea} \end{aligned}$$

\therefore ตัวอย่างชา มี gallic acid equivalent = 87.64 $\mu\text{mol/g tea}$

นำผลการวิเคราะห์ของตัวอย่างชาอีก 13 ตัวอย่างมาคำนวณเหมือนตัวอย่างที่ 1 โดยแสดงในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ และได้ข้อมูลดังตารางภาคผนวกที่ ง-4

ตารางภาคผนวกที่ ง-4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g}$ tea ด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

Sample no.	Absorbance			\bar{X}	SD	\bar{X} -blank	GAE $\mu\text{mol/g}$ tea
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3				
blank	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000	0.000	-
1	0.154	0.159	0.158	0.157	0.003	0.151	87.64
2	0.148	0.152	0.152	0.151	0.002	0.145	83.52
3	0.108	0.112	0.112	0.111	0.002	0.105	57.49
4	0.286	0.288	0.293	0.289	0.004	0.283	173.52
5	0.224	0.236	0.235	0.232	0.007	0.226	136.22
6	0.225	0.232	0.235	0.231	0.005	0.225	135.57
7	0.068	0.068	0.069	0.068	0.001	0.062	29.95
8	0.104	0.106	0.110	0.107	0.003	0.101	54.89
9	0.212	0.209	0.215	0.212	0.003	0.206	123.42
10	0.202	0.207	0.211	0.207	0.005	0.201	119.95
11	0.082	0.083	0.084	0.083	0.001	0.077	39.49
12	0.114	0.115	0.116	0.115	0.001	0.109	60.31
13	0.146	0.149	0.151	0.149	0.003	0.143	82.22
14	0.108	0.112	0.111	0.110	0.002	0.104	57.28

ตารางภาคผนวกที่ ค-5 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชา
 ในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g}$ tea ด้วยวิธี FRAP
 แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) กับวิธี FRAP แบบกระดาษที่
 พัฒนาขึ้น

Sample no.	FRAP PAD method	FRAP STD method
	$\mu\text{mol GAE/g tea}$	$\mu\text{molGAE /g tea}$
1	118.48	87.64
2	134.20	83.52
3	83.40	57.49
4	190.30	173.52
5	129.64	136.22
6	151.92	135.57
7	30.12	29.95
8	32.00	54.89
9	111.32	123.42
10	135.32	119.95
11	67.19	39.49
12	88.61	60.31
13	93.33	82.22
14	71.81	57.28

นำผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ ในตารางภาคผนวกที่ ค-5 มาทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ t-test: paired two sample for means (two-tail test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม microsoft excel เพื่อวิเคราะห์ความแม่นยำของผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม ได้ผลดังตารางภาคผนวกที่ ง-6

ตารางภาคผนวกที่ ง-6 ผลการทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีดั้งเดิมด้วย t-test: paired two sample for means (two-tail test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม microsoft excel

	116.3138861	87.63825634
Mean	100.060571	88.75598485
Variance	2047.348784	1973.606172
Observations	13	13
Pearson Correlation	0.905945643	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	12	
t Stat	2.09421271	
P(T<=t) one-tail	0.029069576	
t Critical one-tail	1.782287556	
P(T<=t) two-tail	0.058139151	
t Critical two-tail	2.17881283	

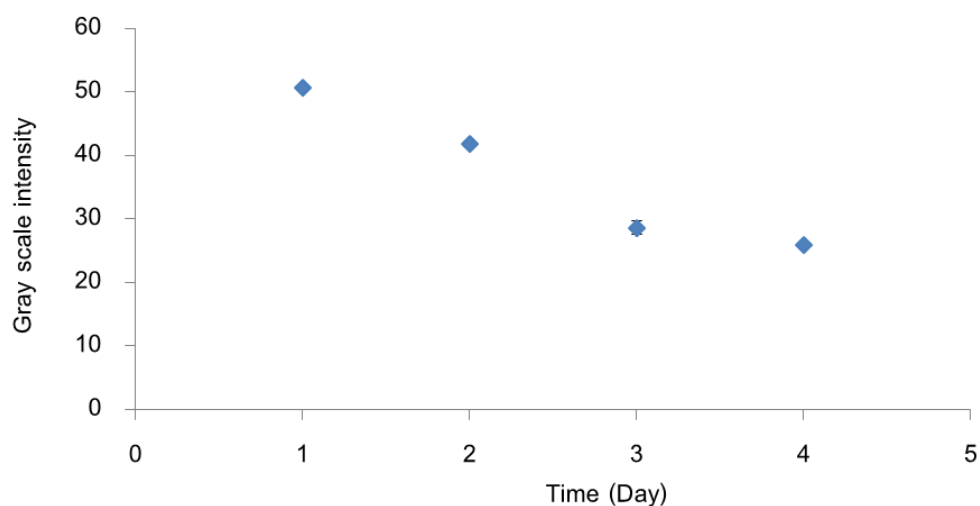
3. ศึกษาความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัด

3.1 กลุ่มที่ 1 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสงแดด

นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่หยดสารละลาย FRAP reagent ลงไป แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้องมาทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน 50 µg/ml gallic acid แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าความเข้มสีต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 4 วัน ได้ผลดังตารางภาคผนวกที่ ง-7

ตารางภาคผนวกที่ ง-7 ผลการทดสอบความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสง

Time (Day)	Intensity			\bar{X}	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1	50.71	50.85	50.53	50.70	0.16
2	41.54	41.69	42.23	41.82	0.37
3	27.43	28.81	29.68	28.64	1.13
4	25.96	26.11	25.48	25.85	0.33



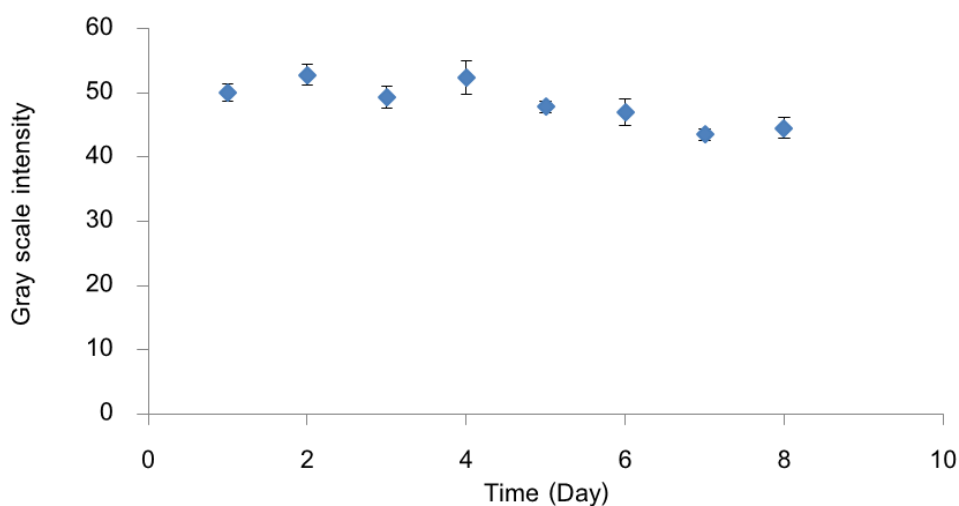
ภาพภาคผนวก ง-4 ผลการวิเคราะห์ความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสง (n = 3)

3.2 กลุ่มที่ 2 ที่นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่หยดสารละลาย FRAP reagent ลงไป แล้วเก็บที่ในตู้เย็นมาทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน 50 µg/ml gallic acid แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าความเข้มสีต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 8 วัน ได้ผลดังตารางภาคผนวกที่ ง-8

ตารางภาคผนวกที่ ง-8 ผลการทดสอบความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดที่เก็บไว้ในตู้เย็น

Time (Day)	Intensity			\bar{X}	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1	49.07	49.53	51.60	50.07	1.35
2	53.04	54.28	51.17	52.83	1.57
3	48.72	48.14	51.32	49.39	1.70
4	51.19	55.38	50.53	52.37	2.63
5	48.32	48.44	46.74	47.83	0.95
6	44.63	48.31	48.03	46.99	2.04
7	42.84	44.57	43.29	43.57	0.90



ภาพภาคผนวก ง-5 ผลการวิเคราะห์ความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 2 ที่ถูกเก็บไว้ในตู้เย็น (n = 3)