

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC

โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ปวีณา พันทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2559

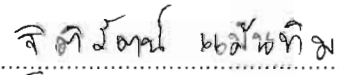
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของปวีณา พันทอง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

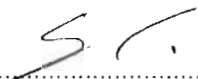

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร.ยูภาพร สมิน้อย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธาน
(ดร.จิตติรัตน์ แมนทิม)


..... กรรมการ
(ดร.ยูภาพร สมิน้อย)


..... กรรมการ
(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)


..... กรรมการ
(ดร.สามารถ สายอุต)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 11 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2559

การวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษาจาก
โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)
จากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ระดับปริญญาโท ปีการศึกษา 2556

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอขอบพระคุณ ดร.อนันต์ อธิพรชัย, ดร.ฐิติรัตน์ แม้นทิม และ ดร.สามารถ สายอุตุ ที่ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะที่ดี ในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์ และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่ให้ทุนการศึกษาในการศึกษาต่อในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อทองเลื่อน คุณแม่ดาหวัน บุญทองโท และเพื่อนนิสิตระดับปริญญาโท สควค. สาขาเคมีศึกษาทุกคนที่ให้กำลังใจและสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูแก่เวทิตาแต่ บุพการีบูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบนานเท่านานนี้

นางปวีณา พันทอง

56920133: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)

คำสำคัญ: อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ/ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ วิธี CUPRAC

ปวีณา พันทอง: การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC

โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS USING CUPRAC ASSAY BY A PAPER-BASED DEVICE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ยุภาพร สมีน้อย, Ph.D. 83 หน้า. ปี พ.ศ. 2559.

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายที่สร้างด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์สำหรับใช้ในการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี CUPRAC ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเชิงซ้อนที่ไม่มีสีของสารเชิงซ้อนคอปเปอร์ (II)-นีโอคิวปรีนกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่รีดิวซ์คอปเปอร์ (II) กลายเป็นสารเชิงซ้อนคอปเปอร์ (I)-นีโอคิวปรีน ที่มีสีเหลืองส้ม ความเข้มสีที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างในตัวอย่าง เริ่มต้นได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ได้แก่ ความเข้มข้นของคอปเปอร์ (II) คลอไรด์ ความเข้มข้นของ แอมโมเนียมอะซิเตต และเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอุปกรณ์ตรวจวัด จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของคอปเปอร์ (II) คลอไรด์ ที่เหมาะสมเท่ากับ 4 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของ แอมโมเนียมอะซิเตต ที่เหมาะสมเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์และเวลาที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CUPRAC รีเอเจนต์ และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเท่ากับ 20 นาที จากนั้นศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง ความสามารถในการทำซ้ำ ชีดจำกัดการตรวจวัดของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้สารมาตรฐาน 5 ชนิดคือ กรดแอสคอร์บิก, กรดแกลลิก, อีพิกัลโลคาเทชิน แกลเลท, เคอร์เซทินและโพลีฟีนอล สูดทำทำการทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชา 5 ชนิด เทียบกับวิธีแบบดั้งเดิมพบว่าค่าสมมูลแกลลิกที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

56920133: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)

KEYWORDS: PAPER-BASES DEVICE/ ANTIOXIDANT ACTIVITY/CUPRAC ASSAY

PAWEENA PUNTHONG: DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS USING CUPRAC ASSAY BY A PAPER-BASED DEVICE. ADVISORY COMMITTEE: YUPAPORN SAMEENOI, Ph.D. 83 P. 2016.

This research focused on the development of a paper-based device fabricated using polymer screen-printing method for detection of antioxidant activity using cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay. The analysis is based on the reduction of Cu(II)-neocuproine complex by antioxidant to form yellow-orange color of Cu(I)-neocuproine complex on the paper. Firstly, the optimization of the assay was performed including concentration of CuCl_2 , ammonium acetate and reaction time. The results showed that optimal CuCl_2 and ammonium acetate concentration was 4 mM and 10 mM, respectively. Optimal reaction time was 20 min. The analytical figures of merit were then evaluated including linear range, reproducibility, limit of detection from the analysis of 5 standard antioxidants including ascorbic acid, gallic acid, epigallocatechin gallate, quercetin and trolox. Finally, the performance of the developed device was validated against the traditional spectrophotometric CUPRAC assay by measuring antioxidant activity of 5 tea samples and the results showed no significant difference for gallic acid equivalent obtained from the two methods at 95% confidence level.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
ขอบเขตของการศึกษา.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
อนุมูลอิสระ.....	4
สารต้านอนุมูลอิสระ.....	5
แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	6
ตัวอย่างอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง.....	11
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	13
อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	19
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี.....	26
การเตรียมสารละลาย.....	27
แผนการดำเนินการวิจัย.....	29
การเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	30
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หับนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น.....	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น.....	32
การศึกษาคความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธีที่พัฒนาขึ้น เทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม.....	33
การวิเคราะห์ความเข้มข้นด้วยโปรแกรม Image J.....	34
4 ผลการวิจัยและอภิปราย.....	40
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น.....	40
ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัด แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน.....	44
ผลการศึกษาคความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธี ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม.....	51
5 สรุปผล.....	54
สรุปผลการวิจัย.....	54
ข้อเสนอแนะ.....	55
บรรณานุกรม.....	56
ภาคผนวก.....	60
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	83

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธี CUPRAC.....	50
ก-1 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid.....	62
ก-2 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid.....	62
ก-3 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG.....	63
ก-4 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercatin.....	63
ก-5 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox.....	64
ก-6 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD.....	65
ก-7 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD.....	66
ก-8 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD.....	67
ก-9 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercatin เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD.....	68
ก-10 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD.....	69
ค-1 แสดงผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay).....	74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค-2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based CUPRAC assay).....	76
ค-3 แสดงผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay).....	77
ค-4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ ด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay).....	79
ง-1 แสดงข้อมูลการหาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด	81

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 โครงสร้างทางเคมีของ trolox.....	6
2-2 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid.....	7
2-3 โครงสร้างของ EDTA.....	7
2-4 โครงสร้างวิตามินเอ (retinol).....	8
2-5 โครงสร้างวิตามินซี.....	8
2-6 โครงสร้างวิตามินอี.....	9
2-7 โครงสร้างทั่วไปของ flavonoids.....	10
2-8 ตัวอย่างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	11
2-9 แสดงปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระดีพีพีเอสทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ.....	16
2-10 แสดงปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระเอทีบีเอสทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ.....	17
2-11 แสดงปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ทำปฏิกิริยากับ สารต้านอนุมูลอิสระ.....	18
2-12 แสดงโครงสร้าง CUPRAC reagent ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ.....	19
2-13 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยการเทียบสีและกราฟมาตรฐาน แสดงการวิเคราะห์แอลกอฮอล์.....	21
2-14 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยวิธีการทางเคมีไฟฟ้า.....	22
2-15 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยวัดค่าการนำไฟฟ้า.....	22
2-16 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยวิธีการทางไฟฟ้าเคมีเรืองแสง.....	23
3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย.....	29
3-2 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบหลุม (well format).....	30
3-3 แสดงการเปิดโปรแกรม ImageJ.....	34
3-4 แสดง Set scale ของบริเวณที่ตรวจวัดในโปรแกรม ImageJ.....	34
3-5 แสดงการปรับสีในโปรแกรม ImageJ.....	35
3-6 แสดงการปรับเป็นสี gray ในโปรแกรม ImageJ.....	36
3-7 แสดงการปรับเป็น gray intensity ในโปรแกรม ImageJ.....	37
3-8 แสดงการ set measurements ในโปรแกรม ImageJ.....	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3-9 แสดงการ Analyze Measurement ในโปรแกรม ImageJ.....	39
4-1 การศึกษาความเข้มข้นของ CuCl_2 ที่เหมาะสมใน CUPRAC reagent สำหรับการวิเคราะห์ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM (A) แสดงสี CUPRAC reagent บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ CuCl_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid กับ CuCl_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3).....	41
4-2 การศึกษาความเข้มข้นของ ammonium acetate ที่เหมาะสมใน CUPRAC reagent สำหรับการวิเคราะห์ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM (A) แสดงสี CUPRAC reagent บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ ammonium acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid กับ ammonium acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3).....	42
4-3 (A) แสดงสีของสารละลาย CUPRAC reagent ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (n=3).....	43
4-4 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ ascorbic acid (n=3).....	45
4-5 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ gallic acid (n=3).....	46
4-6 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ EGCG ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ EGCG (n=3).....	47
4-7 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ quercetin (n=3).....	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-8 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ trolox (n=3).....	50
4-9 แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา sample 1-5 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay).....	51
4-10 กราฟ linear regression แสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา 5 ชนิด ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay).....	52
ค-1 แสดง Calibration cuver ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based CUPRAC assay).....	74
ค-2 แสดง Calibration cuver ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay).....	77
ง-1 แสดงกราฟการหาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด	82

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุล ที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบ ๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) อนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย รวมถึงการได้รับจากสิ่งแวดล้อม เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสื่อมของร่างกาย ความเจ็บป่วยและโรคภัยต่างๆ ขึ้น เมื่อมีอนุมูลอิสระจำนวนมากในร่างกาย ส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ โดยมีผลต่อสารชีวโมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน ปกติภายในร่างกายของเรามีกลไกป้องกันไม่ให้โมเลกุลในร่างกายทำปฏิกิริยาจากอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทส (superoxide dismutase) คตะเลส (catalase) กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นต้น แต่ถ้าจำนวนอนุมูลอิสระมีมากเกินไปหรือการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ ร่างกายจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก สารต้านอนุมูลอิสระที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ ซีลีเนียม เบต้า-แคโรทีน และพฤษเคมีต่างๆ เช่น สารในกลุ่มโพลีฟีนอล ไอโซฟลาโวน เป็นต้น

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถวัดได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom transfer (HAT)-based reaction) และการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว (single electron transfer (SET)-based reaction) ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่จำเป็นต้องพึ่งพาเครื่องมือที่มีขนาดใหญ่และราคาแพง ตัวอย่างเช่น UV-visible Spectroscopy ซึ่งต้องทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ผู้ทำการทดลองต้องเป็นผู้ชำนาญการในการวิเคราะห์โดยวิธีนั้น ๆ ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ปริมาณมากในการวิเคราะห์ บางวิธีใช้เวลานานในการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่าง จึงไม่เหมาะกับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในหลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน ส่งผลให้เกิดความล่าช้าในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากปัญหาดังกล่าวจะเห็นว่ามีมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมี

เครื่องมือหรือวิธีการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีราคาถูก สามารถพกพาไปใช้ได้ง่าย ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ใช้สารตั้งต้นและสารตัวอย่างปริมาณน้อย สามารถใช้ได้ง่ายและไม่จำเป็นต้องใช้ผู้ชำนาญในการทดสอบ

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เป็นอุปกรณ์การตรวจวัดรูปแบบใหม่ที่กำลังได้รับความนิยม สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางการแพทย์ การควบคุมคุณภาพอาหาร การตรวจวัดทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ประยุกต์ใช้กับการตรวจวัด DNA (Lu, Ge, Ge, Yan & Yu, 2012) ใช้ในการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด (Noiphung et al., 2013) ใช้ในการตรวจวัดระดับแอลกอฮอล์ (กนกวรรณ พิสูจน์เกียรติ และยุภาพร สมิน้อย, 2557) และใช้ตรวจวัดสารอื่นๆ อีกมากมาย เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ ตรวจวัดที่มีขนาดเล็ก ราคาถูก ใช้งานง่าย ใช้รีเอเจนต์และสารตัวอย่างปริมาณน้อย พกพาได้สะดวก

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนา วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี CUPRAC ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based device) ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเชิงซ้อนที่ไม่มีสีของ Cu(II)-neocuproine complex กับสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่รีดิวซ์ Cu(II) กลายเป็นสารเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproine complex ที่มีสีเหลืองส้ม ความเข้มสีเหลืองส้มที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง สามารถตรวจวัดความเข้มสีด้วยโปรแกร มประมวลผลภาพ จะได้อุปกรณ์ที่สามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถวิเคราะห์ได้ที่ละหลาย ๆ ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว ใช้รีเอเจนต์และตัวอย่างน้อย ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงในการวิเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารสกัดจากใบชาโดยวิธี CUPRAC ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นของคอปเปอร์ (II) คลอไรด์ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมอะซิเตต และเวลาที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CUPRAC reagent และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานบนอุปกรณ์ตรวจวัด

2. ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และ ค่าความสามารถในการทำซ้ำ (%RSD) ในการวิเคราะห์

สารมาตรฐาน ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid), เคอร์เซทิน (quercetin), กรดแกลลิก (gallic acid), อีพิกัลโลคาเทชิน แกลเลท (epigallocatechin gallate; EGCG) และโทรลออกซ์ (trolox)

3. ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น โดยได้ศึกษาความแม่นยำของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษร่วมกับวิธีCUPRAC ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ สามารถวิเคราะห์ได้ที่หลาย ๆ ตัวอย่าง ใช้ในการคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยไม่ต้อง ใช้เครื่องมือราคาแพงในการตรวจวัด ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์น้อย มีราคาถูก น้ำหนักเบาและสามารถนำไปตรวจภาคสนามได้อย่างแม่นยำ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ

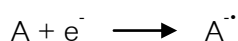
อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) อนุมูลอิสระว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (บุหรัน พันธุ์สุวรรณ, 2556)

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen radical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), hydrogen peroxide, transition metals (โลหะทรานซิชัน), carbonate radical ($\text{CO}_3^{\cdot-}$), nitrate radical ($\text{NO}_3^{\cdot-}$), methyl radical (CH_3^{\cdot}), superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxy radical (ROO^{\cdot}), reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้ (โสภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดดีสินทอง, 2550)

ก. การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส (Homolysis)



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

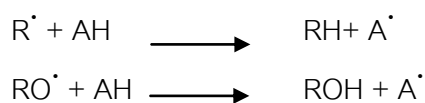


อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ คาร์โบไฮเดรต เซลล์เมมเบรน คอลลาเจน ไมโทคอนเดรีย และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคความจำเสื่อม โรคภูมิแพ้ โรคหัวใจขาดเลือด โรคมะเร็ง โรคข้ออักเสบ โรคความดันโลหิต โรคเหน็บชา โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอด และระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น

อนุมูลอิสระมีแหล่งที่มา 2 แหล่งคือจากภายในร่างกาย เช่น การเผาผลาญอาหาร การหายใจ การออกกำลังกายหักโหม การติดเชื้อ ความเครียด เป็นต้น นอกจากร่างกาย ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) การรับรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา เกิดจากมลภาวะ เช่น คาร์บอนหรือแก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนโตรออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การใช้น้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้ซ้ำ การทำอาหารไหม้เกรียมหรือเกิดจากการปิ้งย่าง เกิดจากยาบางชนิด เช่น ด็อกโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol) (โรสวันย์ พิริยะสมบุญ, 2553 ; โอบา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีผลต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระหรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม, 2554)



โดย R^\cdot และ RO^\cdot คืออนุมูลอิสระ และ AH คือสารต้านอนุมูลอิสระ

2.3 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่

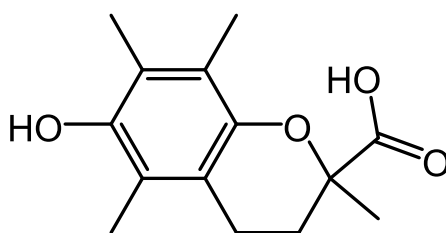
2.3.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี ส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์มีดังนี้ (โสภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2550)

2.3.1.1 trolox

trolox หรือ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

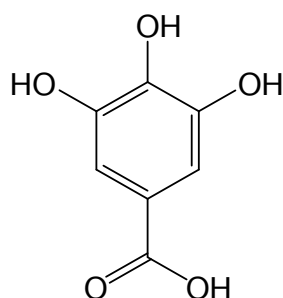
มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{14}H_{18}O_4$ เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคน เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างที่ทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบหลายวิธี ในการวิจัยนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของ trolox

2.3.1.2 gallic acid

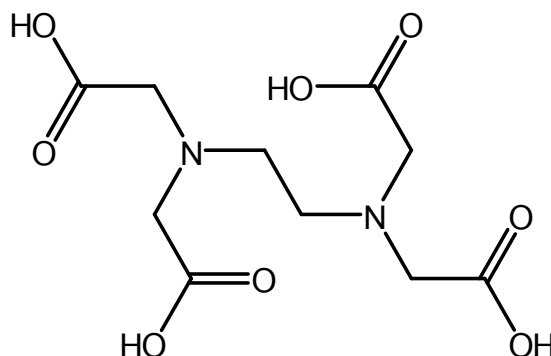
gallic acid หรือ 3,4,5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้ไผ่ และพืชอื่น ๆ โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid

2.3.1.3 EDTA

EDTA หรือ ethylenediaminetetraacetic acid มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต โดยการจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น ตะกั่ว เหล็ก สังกะสี แคลเซียม แมงกานีส และทองแดง ซึ่งประโยชน์ทางการแพทย์สามารถนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่าง ๆ ได้



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของ EDTA

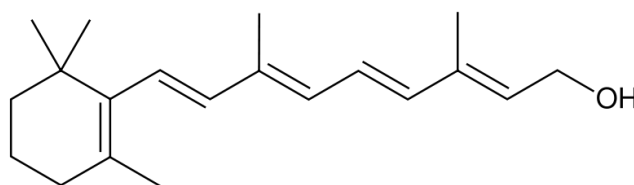
2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants)

ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามิน เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) รวมถึงกลุ่มโพลีฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) และกรดฟีนอลิก (phenolic acid) เป็นต้น

ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ มีดังนี้

2.3.2.1 วิตามินเอ

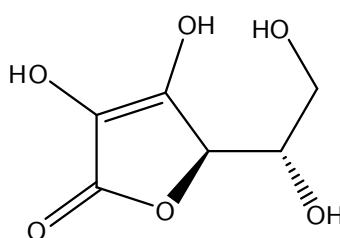
ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ จัดเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ เรียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผัก ใบเขียว ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างวิตามินเอ (retinol)

2.3.2.2 วิตามินซี

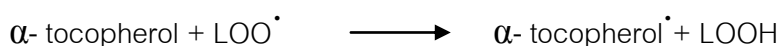
มีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxy นอกจากนี้วิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน ของวิตามินอีด้วย



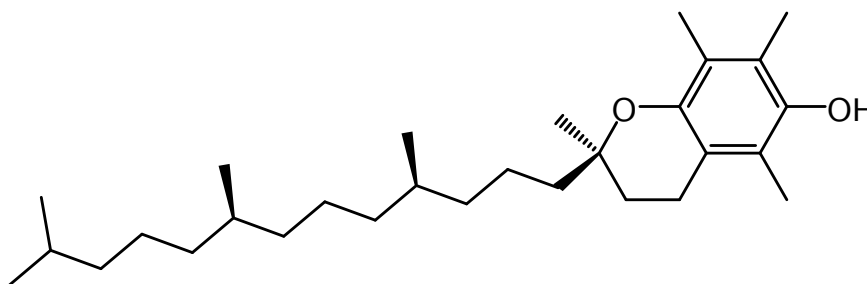
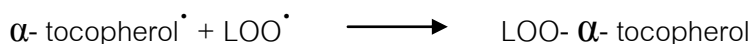
ภาพที่ 2-5 โครงสร้างวิตามินซี

2.3.2.3 วิตามินอี

เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชัน ตัวอื่น ๆ เช่น วิตามินซีและซีลีเนียม เป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะ เช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอล และโทโคโทอินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อย ๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา (α -) เบต้า (β -) แกมมา (γ -) และเดลต้า (δ -) วิตามินอี ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxy ดังสมการ



อนุมูล $\alpha\text{-tocopherol}^\bullet$ ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxy ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร ($\text{LOO-}\alpha\text{-tocopherol}$) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง



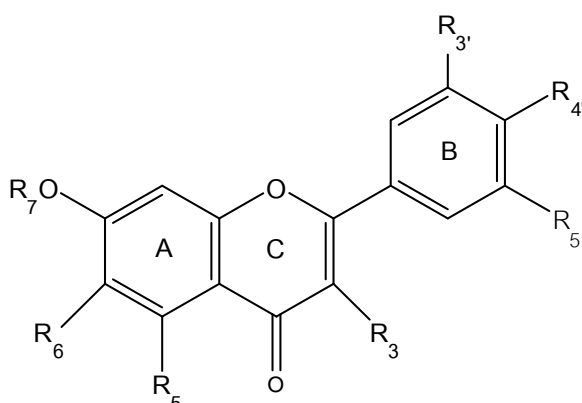
ภาพที่ 2-6 โครงสร้างวิตามินอี

2.3.2.4 ซีลีเนียม ทองแดง และสังกะสี

เป็นสารต้านออกซิเดชันทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซีลีเนียม และวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่าง ๆ เหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาถูกใช้ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product)

2.3.2.5 ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบกลุ่มพอลิฟีนอล ซึ่งประกอบด้วยวงอะโรมาติก ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยมีการจับกับคาร์บอนและ aromatic hydroxyl โครงสร้างและรูปแบบทั่วไปของฟลาโวนอยด์



R₃ = H, OH, OCH₃

R₅ = H, OH

R₆ = H, OH, OCH, OCH₃

R₇ = H, CH₃

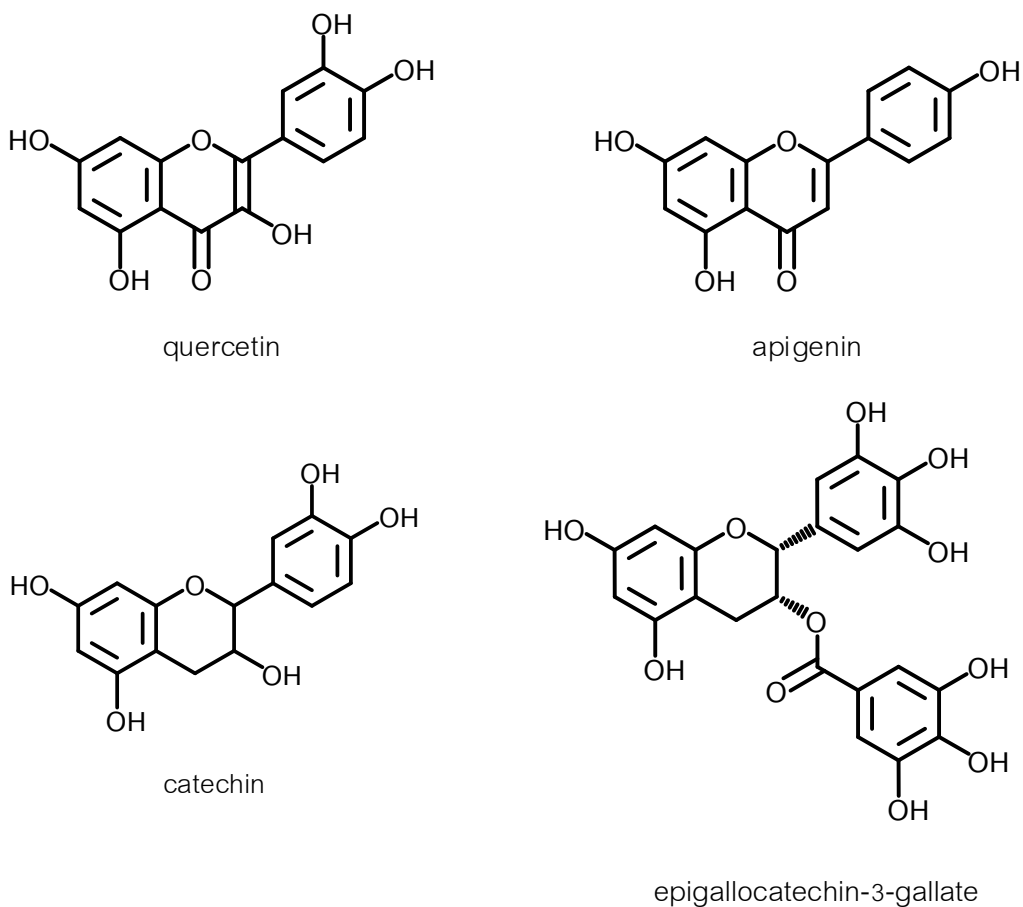
R_{3'} = H, OH

R_{4'} = H, OH, OCH₃

R_{5'} = H, OH, OCH₃

ภาพที่ 2-7 โครงสร้างทั่วไปของ flavonoids

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบพีนอลิกที่พบมากชนิดหนึ่ง จะพบมากในพืชผักและผลไม้ มีหน้าที่สองอย่าง คือ เป็นรงควัตถุ ทำหน้าที่กรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจง และทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์พืชออกไป ความสามารถในการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ และคุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ ยังสามารถช่วยลดการอักเสบ ช่วยให้หลอดเลือดแข็งตัว ทำให้การไหลเวียนเลือดดีขึ้น ต่อต้านแบคทีเรียและไวรัส ลดโคเลสเตอรอล และช่วยเสริมการทำงานของวิตามินซี ตัวอย่างสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ เช่น เคอร์ซีทิน (quercetin), อากิเจนิน (apigenin), แคทีชิน (catechin), แกลโลแคทีชิน (gallocatechin), อีพิกแคทีชิน (epicatechin), อีพิกแกลโลแคทีชิน (epigallocatechin, EGC), อีพิกแกลโลแคทีชิน-3-แกลเลต (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) และลูทีโอลิน (luteolin) เป็นต้น (วิภาพ สุทชนะ, 2556)



ภาพที่ 2-8 ตัวอย่างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.4 ตัวอย่างอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง

2.4.1 ชาเขียว

ในชาเขียวประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ gallocatechin, epigallocatechin, catechin โดยเฉพาะสาร EGCG ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรง โดยมีฤทธิ์มากกว่าวิตามินอีถึง 20 เท่า มีผลการวิจัยพบว่าชาเขียวสามารถลดอัตราการเป็นมะเร็งของอวัยวะต่าง ๆ ได้ดี โดยเฉพาะมะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้, มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งตับ นอกจากนี้ยังช่วยลดความเป็นพิษจากการสูบบุหรี่ เช่น นิโคติน และน้ำมันทาร์ เป็นต้น (Nomizu, Hashida, Makiono, & Ohara, 2008)

2.4.2 มะขามป้อม

มะขามป้อมมีสารประกอบที่มีประโยชน์ ได้แก่ ascorbic acid, trigalloyl, ellagic acid, glucoseterchebin และ corilagin เป็นต้น ซึ่งเป็นสาระสำคัญในกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัช

วิทยาอันหลากหลายของมะขามป้อม ฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยาของมะขามป้อม ที่ได้รับการวิจัยมีดังนี้ ฤทธิ์ต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ ต้านไวรัส HIV แก้อาการอักเสบ ลดความดันโลหิต ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ ทำให้ป้องกันเซลล์ร่างกายเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ลดโคเลสเตอรอล ปกป้องตับ หัวใจและหลอดเลือด ป้องกันตับ และไตจากอันตรายของสารพิษ (นิทรา เนื่องจางค์ และคณะ, 2550)

2.4.3 สารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ได้รับการขนานนามว่าเป็นสารซูเปอร์แอนตีออกซิแดนท์มานาน เนื่องจากคุณสมบัติเด่นในด้านการกำจัดอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารแอนตีออกซิแดนท์อื่น ๆ โดยสูงกว่าวิตามินซี 20 เท่า และวิตามินอี 50 เท่า ทั้งยังคงอยู่ในกระแสเลือดได้นานถึง 72 ชม. สามารถป้องกันและลดการทำลายล้างจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายเราตลอดเวลาทั้งจากปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน อันเป็นสาเหตุของความเสื่อมและอ่อนแอของร่างกายโดยรวม โดยเฉพาะระบบหลอดเลือด หัวใจ ผิวหนัง และตา (เกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์ และดรฤณี ถาวรเจริญ, 2556)

2.4.4 แครอท

แครอทจัดได้ว่าเป็นพืชที่มีคุณค่าดีเยี่ยมกับสุขภาพ อุดมไปด้วย เบต้า-แคโรทีน ซึ่งจะถูกร่างกายจะเปลี่ยนรูปให้เป็นวิตามินเอ นอกจากอุดมไปด้วยวิตามินเอ ที่อยู่ในรูปของเบต้า-แคโรทีนแล้ว ยังมีวิตามินบี, ซี, อี และแร่ธาตุต่าง ๆ แครอทยังมีสีเข้มแสดงถึงเบต้า-แคโรทีนที่มากขึ้นไปด้วย และเนื่องจากแครอทจะมีน้ำตาลอยู่ค่อนข้างมากดังนั้น ผู้ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวานก็ควรปรึกษาแพทย์ก่อน ว่าสามารถดื่มได้มากเท่าไร การดื่มน้ำแครอทจะได้ประโยชน์จากแครอทมากกว่าการกินดิบ ๆ เพราะว่า สารอาหารบางส่วนจะยังคงอยู่ในไฟเบอร์ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายโดยร่างกายได้ ดังนั้นการคั้นน้ำออกมาจะช่วยให้ร่างกายได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ ในปัจจุบันผู้คนเริ่มหันมาสนใจสุขภาพกันมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นสุขภาพกาย สุขภาพใจ และ สุขภาพผิว เราจะเห็นได้ว่า มีการวิจัย เพื่อนำสารสกัดที่มีประโยชน์มาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง หรือ อาหารเสริมกันมากขึ้น และแครอท ก็เป็นหนึ่งในพืชที่มีประโยชน์กับร่างกายและผิวพรรณดังจะเห็นได้จากการที่มีครีมบำรุงผิวนำสารสกัดจากแครอทมาใช้ (Alasalvar, Grigor, Zhang, Quantick, & Shahidi, 2001)

2.4.5 ฟักทอง

ผลฟักทอง จะมีเนื้อสีเหลืองที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเรียกว่า “เบต้า-แคโรทีน” และยังมีวิตามินเอสูง รวมทั้งฟอสฟอรัส แคลเซียม วิตามินซี แป้ง ซึ่งเป็นอาหารเสริมสุขภาพ สร้างภูมิคุ้มกันได้เป็นอย่างดี และสามารถช่วยลดการเกิดโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคหัวใจได้ ช่วยด้านความชรา ป้องกันโรคผิวหนัง บรรเทาอาการปวดเมื่อยของข้อเข่า และบั้นเอว โนเมล็ดฟักทองจะมี

สารชนิดหนึ่งเมื่อนำมาบดเป็นผง ใช้เป็นยาสำหรับถ่ายพยาธิตัวดีด ยอดอ่อนผักทอง มีวิตามินเอ สูงพอ ๆ กับเนื้อผักทอง แต่มีแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูงกว่าในเนื้อ ดอกผักทองมีวิตามินเอ ธาตุ แคลเซียมและฟอสฟอรัส มีวิตามินซีเล็กน้อย (โรสวัณย์ พิริยะสมบุญญ์, 2553)

2.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละ ประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธี ร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

2.5.1 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้าน อนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ (เช่น Shinoda test และ Pew test) โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้าน อนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (บุหรณ์ พันธุ์สุวรรณค์, 2556)

2.5.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยการทำให้เกิดสี (colorimetric assay)

เป็นวิธีการนำสารเคมีชนิดต่าง ๆ มาทำ ปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และดูสีที่เกิดขึ้น หลังจากการเกิดปฏิกิริยา ตัวอย่างของวิธีนี้ได้แก่

1. วิธี Shinoda test เป็นการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (cyanidins reaction) โดยการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างกับผงแมกนีเซียม (magnesium ribbon) กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น และออกทิลแอลกอฮอล์ (octyl alcohol) ซึ่งจะเกิดการแยกชั้น ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีสาร จำพวกฟลาโวนอล (flavonol) ฟลาวาโนน (flavanone) ฟลาวาโนนอล (flavanonol) หรือแซนโทน (xanthone)

2. วิธี Pew test หรือการทดสอบของพิว เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่าง กับผงสังกะสี (zinc dust) และกรดไฮโดรคลอริก ถ้าเกิดสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที แสดงว่ามีสาร ฟลาวาโนนอล (flavanonol) และฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ (flavonol-3-glycoside) แต่ถ้าเป็นสี จาง ๆ แสดงว่ามี สารฟลาวาโนน (flavanone) และฟลาโวนอล (flavonol) วิธีการทั้งสองมีข้อดี คือ

ทำได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน ขึ้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อน และใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์สาร ตัวอย่าง แต่มีข้อเสีย คือ มีความไว (sensitivity) และความแม่นยำ (precision) ต่ำ และเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ เพราะสารหลาย ๆ ชนิดอยู่ด้วยกันที่เกิขึ้นสามารถรบกวนกันได้ วิธีการดังกล่าวข้างต้นได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาสารโพลีฟีนอล

2.5.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography, TLC)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารและวิเคราะห์สารโพลีฟีนอลในเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารด้วยตัวทำละลายหรือตัวพา (mobile phase) กับการดูดซับโดยตัวดูดซับ (adsorbent หรือ stationary phase) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารตัวอย่างกับตัวทำละลาย และความสามารถในการดูดซับของตัวดูดซับที่มีต่อสารตัวอย่างในแต่ละชนิด สารตัวอย่างที่ต่างกันจะถูกละลายและดูดซับได้ไม่เท่ากัน โดยสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่เร็ว ค่า R_f เข้าใกล้ 1.0 (R_f = ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ส่วนสารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ค่า R_f จะเข้าใกล้ 0 ซึ่งตัวดูดซับที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจล และตัวทำละลายหรือตัวพาที่นำมาใช้ในการแยกสารมีหลายชนิด ทั้งนี้อาจมีการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด ตัวอย่างของตัวทำละลาย เช่น น้ำ เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเตต คลอโรฟอร์ม เป็นต้น สารตัวอย่างบางชนิดสามารถแยกโดยใช้ TLC แล้วสามารถมองเห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ชาลโคน (chalcone) และออโรน (ourone) เป็นต้น แต่บางชนิดต้องนำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยาต่อกับไอของแอมโมเนีย หรือส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) หรือฉีดพ่นด้วยสารต่าง ๆ เช่น สารละลายฟอสฟอรัส สารละลายวานิลลินในกรดซัลฟิวริก สารละลายวานิลลินในกรดไฮโดรคลอริก เป็นต้น ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย วิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ขึ้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่าง สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างได้ทั้งที่มีสีและไม่มีสี แต่มีข้อเสีย คือ มีความไวและความแม่นยำต่ำ และในกรณีที่องค์ประกอบต่าง ๆ ในตัวอย่างมีค่า R_f ใกล้เคียงกันมาก จะไม่สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านั้นออกจากกันได้ หรือแยกได้แต่ไม่บริสุทธิ์

2.5.1.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

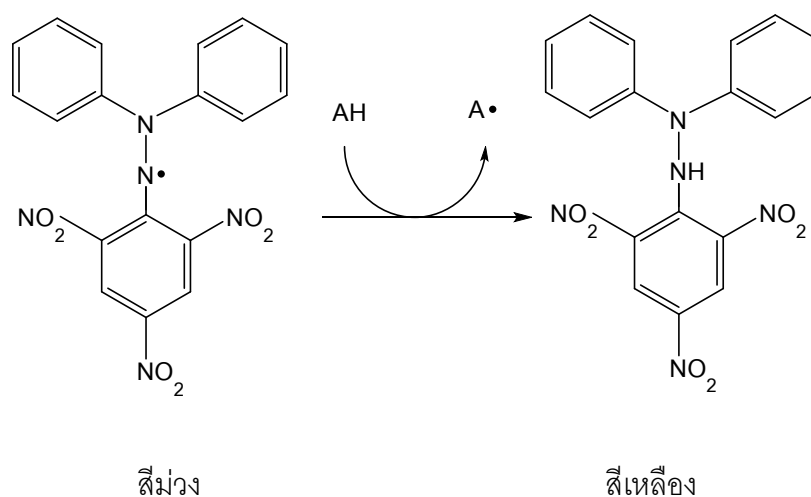
ใช้หลักการคล้ายกับเทคนิคของ TLC โดยเครื่อง HPLC มีส่วนของปั๊มมาช่วยให้ตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และตัวดูดซับหรือเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) บรรจุเป็นทรงกลมเล็ก ๆ หรือเรียกว่าคอลัมน์ (column) โดยสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หรือ stationary phase ได้แตกต่างกัน คอลัมน์ต่างชนิดกันแยกสารได้แตกต่างกัน ซึ่งสารที่ถูกดูดซับได้น้อยจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาก่อน ส่วนสารที่ถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทีหลังองค์ประกอบอีกส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนตรวจวัดสัญญาณ (detector) มีหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณของสารตัวอย่างที่แยกออกมาแต่ละชนิด ซึ่งสัญญาณที่ตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค (peak) เรียกว่าโครมาโตแกรม (chromatogram) โดยส่วนตรวจวัดสัญญาณสามารถตรวจวัดด้วย UV, fluorescence, IR เป็นต้น ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสารแตกต่างกัน การแยกสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่อง HPLC สามารถตรวจหาสารได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณในเวลาเดียวกัน อีกทั้งสามารถหาสารหลายชนิดไปพร้อม ๆ กัน ทั้งนี้ต้องมีสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบโดยสารชนิดเดียวกันจะมีพีคออกมาในระยะเวลา (retention time) เดียวกันเสมอ ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน และวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำ ๆ แต่มีข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากเครื่อง HPLC มีราคาค่อนข้างแพง และ mobile phase ต้องใช้ประเภท HPLC grade

2.5.2 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•]) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) และ cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ (1) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และ (2) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC₅₀, 50 % of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ $\mu\text{M}/\text{mg}$, mM/mg , $\mu\text{M}/\text{mL}$, mM/mL และ mmol/g เป็นต้น (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

2.5.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี่ก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กทรอนิกส์) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลืองดังภาพ



ภาพที่ 2-9 แสดงปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระดีพีพีเอชทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้ง DPPH[•] สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

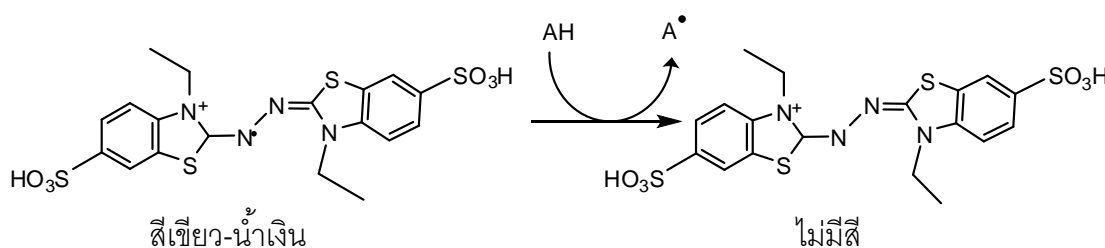
โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่างสารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ ไทโรลิกซ์ แสดงค่าเป็น TEAC

ข้อดีของ วิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH[•] ค่อนข้างเสถียรไม่วิเคราะห์ปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ที่ได้นั้นต่ำกว่าความเป็นจริง และต้องเตรียมสารละลายในตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างเป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรบกวนแล้วทำให้สีของ DPPH[•] จางลงได้เช่นกัน

2.5.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS^{•+} ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS^{•+} มาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง ดังภาพ

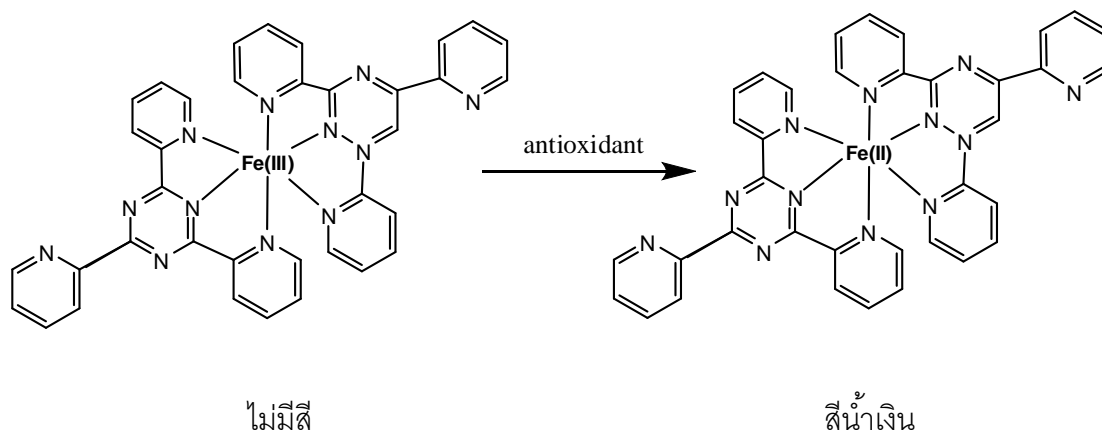


ภาพที่ 2-10 แสดงปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระเอบีทีเอสทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ ABTS^{•+} ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (Apak et al., 2013)

2.5.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ionreducing antioxidant power (FRAP) assay)

วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ดังภาพ



ภาพที่ 2-11 แสดงปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

ซึ่ง $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ประกอบด้วยนำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striaazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอร์ริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้ข้างอิงต้องใช้น้ำ ปราศจากไอออน (deionized water)

ตามท่อนส่งที่ได้สร้างไว้ ไปยังบริเวณทดสอบได้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทาง การแพทย์ การควบคุมคุณภาพอาหาร การตรวจทางด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ถือว่าเป็นทางเลือก ใหม่ที่น่าสนใจเพราะข้อดีของอุปกรณ์นี้คือ สามารถผลิตได้ง่าย และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ เนื่องจากวัสดุที่ใช้ในการผลิตเป็นกระดาษเป็นวัสดุที่หาซื้อได้ง่าย พบได้ในชีวิตประจำวัน นอกจากนี้อุปกรณ์การวิเคราะห์หีบกระดาษยังพกพาได้สะดวก และสามารถทิ้งได้หลังการ วิเคราะห์ (ปวีณา เตือนฉาย และวิจิตรา เตือนฉาย, 2557)

2.6.1 อุปกรณ์วิเคราะห์หีบกระดาษประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1. ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) อาศัยคุณสมบัติที่ชอบน้ำของกระดาษ น้ำจะซึมไป ตามช่องในระดับไมโครบนกระดาษ

2. ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ใช้เป็นส่วนกันเพื่อควบคุมบริเวณการตรวจวัด

2.6.2 เทคนิคการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการเตรียมอุปกรณ์การวิเคราะห์หีบกระดาษด้วยระบบของไหล จุลภาคมีด้วยกันหลาย ยกตัวอย่างเช่น

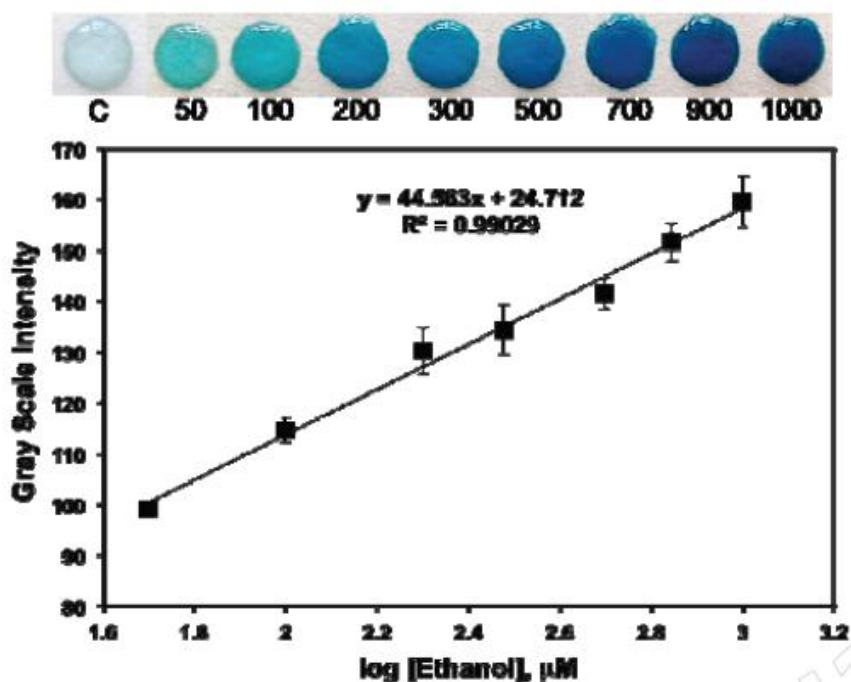
1. การพิมพ์ด้วยแสง (photolithography) (Martinez, Phillips, Butte, & Whitesides, 2007)
2. การพิมพ์ด้วยเครื่องพล็อตเตอร์ (plotter) (Bruzewicz, Reches, & Whitesides, 2008)
3. การสลักด้วยการฉีกหมึก (ink jet etching) (Abe, Kotera, Suzuki, & Citterio, 2010)
4. การปรับสภาพด้วยพลาสมา (plasma treatment) (Li, Tian, & Shen, 2010)
5. การตัดกระดาษ (paper cutting) (Wang, Wu, & Zhu, 2010)
6. การพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) (Lu, Shi, Jiang, Qin, & Lin, 2009)
7. การพิมพ์ด้วยน้ำหมึกฉีด (ink jet printing) (Delaney, Hogan, Tian, & Shen, 2011)
8. การพิมพ์แบบยืดหยุ่น (flexography printing) (Olkkonen, Lehtinen, & Erho, 2010).
9. การพิมพ์สกรีน (screen printing) (Sameenoi, Nongkai, Nouanthavong, Henry, & Nacapricha, 2014)
10. การปรับสภาพด้วยเลเซอร์ (laser treatment) (Chitnis, Ding, Chang, Savran, & Ziaie, 2011)

2.6.3 เทคนิคการตรวจวัดที่ประยุกต์กับอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษดาส

สำหรับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสามารถใช้เทคนิคต่าง ๆ เข้าร่วมในการวิเคราะห์ผลได้

2.6.3.1 การตรวจหาโดยการเทียบสี (colorimetric detection)

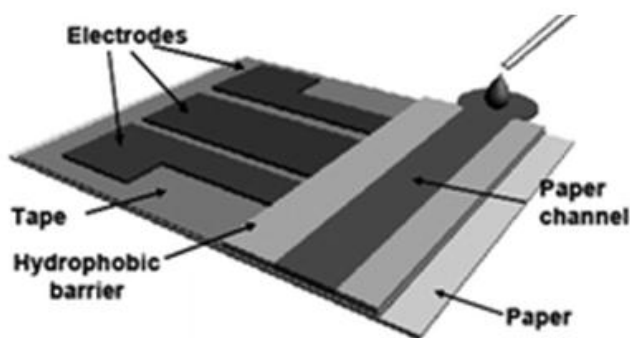
วิธีนี้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวาง เพราะวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย และสามารถมองเห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า เช่น การวิเคราะห์หมู่โคส (Martinez et al., 2007 ; Ornatka, Sharpe, Andreescu, & Andreescu, 2011) การวิเคราะห์แอลกอฮอล์ (กนกวรรณ พิสันเทียะ และยุภาพร สมิน้อย, 2557) (ภาพ 2-13) ซึ่งทำการตรวจเทียบสีด้วยตาเปล่า หรือโดยการถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายรูปหรือการใช้สแกนเนอร์ จากนั้นนำรูปส่งไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี โดยใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์ซึ่งง่ายในการแปลผลข้อมูลจากการทดลอง แสดงตัวอย่างในการวิเคราะห์



ภาพที่ 2-13 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษดาสโดยการเทียบสีและกราฟมาตรฐานแสดงการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ (กนกวรรณ พิสันเทียะ และยุภาพร สมิน้อย, 2557)

2.6.3.2 การตรวจหาด้วยวิธีการทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical detection)

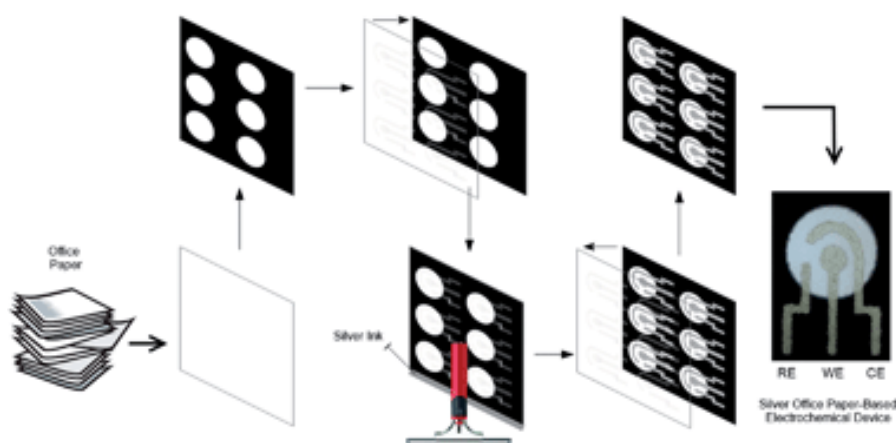
เป็นการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า โดยเทคนิคนี้จะใช้ขั้วไฟฟ้าทั้งหมด 3 ชนิดในระบบ ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าช่วย (counter, electrode) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode) และขั้วไฟฟ้าใช้งาน (working electrode) ซึ่งจะทำการสร้างกระแสโดยนำขั้วทั้ง 3 ชนิดเคลือบหรือติดไว้บนกระดาษ ดังภาพที่ 2-14



ภาพที่ 2-14 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยวิธีการทางเคมีไฟฟ้า (Nie et al., 2009)

2.6.3.3 การตรวจหาด้วยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity)

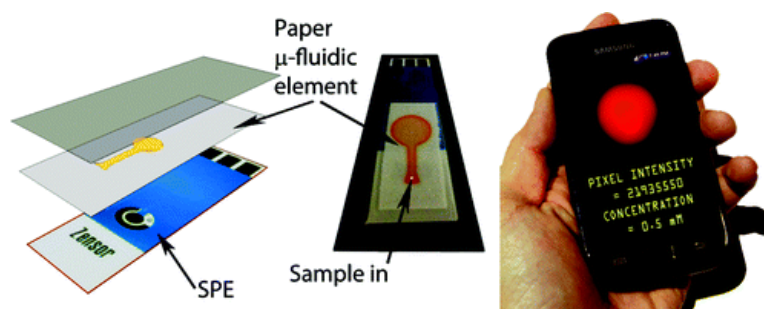
เป็นวิธีที่วัดการเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้าของสารเคมี แต่การใช้เทคนิคนี้ในอุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษยังมีข้อจำกัดในการประยุกต์การตรวจวัดสารในสถานะแก๊ส ดังภาพที่ 2-15



ภาพที่ 2-15 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยวัดค่าการนำไฟฟ้า (Araujo & Paixão, 2014)

2.6.3.4 การตรวจหาโดยวิธีการทางเคมีเรืองแสง (chemiluminescent) และวิธีการทางไฟฟ้าเคมีเรืองแสง (electrochem luminescent detection)

การตรวจหาโดยวิธีการทางไฟฟ้าเคมีเรืองแสงแสดงตัวอย่างในภาพที่ 2-16 เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ประสบผลสำเร็จในการนำมาประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตได้ง่าย ราคาถูก และมีความไวในการตรวจวัดสูง



ภาพที่ 2-16 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยวิธีการทางไฟฟ้าเคมีเรืองแสง (Delaney et al., 2011)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กนกวรรณ พิสันเทียะ และยุภาพร สมิน้อย (2557) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์ฮอร์สราดิสเปอร์ออกซิเดส โดยมี 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดิน เป็นซับสเตรทที่เปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถตรวจวัดความเข้มข้นอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จากการวิเคราะห์เอทานอลด้วยสภาวะที่เหมาะสม พบว่าให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 50-1000 μM ขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 1.50 μM และมีความสามารถการทำให้ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 μM ที่มีร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.93, 1.66 และ 1.24 ตามลำดับ ($n=10$) จากผลการทดลองเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัด ที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มสามารถใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่ำ มีราคาถูก และเหมาะสำหรับการตรวจวัดภาคสนาม

Martinez et al. (2007) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์กลูโคสและโปรตีนในปัสสาวะ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้พร้อมกันและใช้สารตัวอย่างเพียง 5 μM การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษ ใช้เทคนิคการพิมพ์ด้วยแสง

(photolithography) ในการวิเคราะห์กลูโคสและโปรตีนในปัสสาวะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสได้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์กรดยูริก แต่เปลี่ยนจากเอนไซม์ออกซิเดสเป็นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ยูริเอส จากการศึกษาทำให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดที่มีราคาถูก ที่มีขนาดเล็ก ที่ใช้แล้วทิ้งที่ใช้งานง่าย และเหมาะสำหรับการตรวจวัดภาคสนาม

Dungchai, Chailapakul, and Henry (2011) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์กลูโคสและโปรตีนในน้ำเลือด การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษ (μ PAD) ใช้เทคนิคการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) นอกจากนี้ศึกษาคูณหภูมิจำกัดและเวลาที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดโดยใช้ความกว้างต่ำสุดของช่องทางน้ำและส่วนกั้นน้ำ 650 μ m และ 1300 μ m ตามลำดับ และนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตโดยเทคนิค ใช้เทคนิคการพิมพ์ด้วยแสง (photolithography) ผลพบว่าการผลิตทั้งสองวิธีให้กระดาษที่มีประสิทธิภาพไม่ต่างกัน ในการวิเคราะห์กลูโคสและโปรตีนในน้ำเลือดอาศัยการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสได้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์กรดยูริกแต่เปลี่ยนจากเอนไซม์ออกซิเดสเป็นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ยูริเอส การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ผลิตด้วยวิธีพิมพ์ด้วยขี้ผึ้งเป็นที่ง่ายต่อการใช้งานและราคาไม่แพงวิธีการผลิตทางเลือกสำหรับ μ PAD ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา

Vella et al. (2012) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อใช้ตรวจวัดตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้วเพื่อวิเคราะห์การทำงานของตับ โดยวัดความเข้มข้น จากการทดลองพบว่าอุปกรณ์ที่ผู้วิจัยสร้างขึ้น สามารถตรวจสอบผู้ที่มีความผิดปกติของไตได้โดยการเจาะเลือดปลายนิ้วซึ่งช่วยลดปัญหาในการเก็บตัวอย่าง สามารถเตรียมตัวอย่างและทำการประเมินผลบนอุปกรณ์เพียงชิ้นเดียว การตรวจวัด 1 ครั้งใช้เวลาในการทดสอบเพียง 30-35 นาที สามารถทำการประเมินหลายด้านพร้อมกันได้ และเมื่อใช้งานเรียบร้อยแล้วสามารถทำลายได้ง่ายเพื่อป้องกันการติดเชื้อโรคที่ติดมากับเลือด

Teerinen, Lappalainen, and Erho (2014) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อวิเคราะห์หีมอร์ฟินในตัวอย่างน้ำลายโดยใช้เทคนิค Immunochematographic ซึ่งสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิค lateral flow อุปกรณ์ทดสอบแบ่งออกเป็น 5 ส่วน คือ sample pad, conjugate pad, immunochematographic membrane, adsorbent pad และ backing card ผลการศึกษาพบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพการวิเคราะห์หีมอร์ฟินเทียบเท่า

Nitrocellulose สามารถนำไปใช้งานแบบ point-of-care ที่สามารถทำการวิเคราะห์โดยตรง เตรียมตัวอย่างง่าย วิเคราะห์ได้ผลรวดเร็ว มีต้นทุนต่ำ พกพาสะดวก มีความปลอดภัยในการใช้ และทำลายได้ง่ายเพื่อป้องกันการติดเชื้อโรค

Klasner et al. (2010) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษระบบของไหลจุลภาค (paper-based microfluidic device) เพื่อวิเคราะห์คีโตนและกลูโคสในปัสสาวะ และไนไตรท์ในตัวอย่างน้ำลายโดยใช้เทคนิค dipstick ซึ่งสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยการผสมพอลิเมอร์เทียบกับวิธีพิมพ์ด้วยแสง (photolithography) การวิเคราะห์ระดับคีโตนในปัสสาวะ และไนไตรท์ในน้ำลาย โดยวัดความเข้มสีพบว่าให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 5-16 mM , และ 5-250 μ M ตามลำดับ มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัด 0.5 mM, และ 5 μ M ตามลำดับ อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดได้โดยใช้เวลาเพียง 25 นาที และช่วยลดขั้นตอนของการวิเคราะห์ ตัวอย่าง

Li, Then, Li, and Shen (2014) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกลุ่ม secondary blood เพื่อสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดการเกิดตะกอนของหมู่เลือดที่ให้ผลรวดเร็วและแม่นยำ ติดตามผลโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ ผลพบว่า แอนติบอดีที่มีโครงสร้าง IgM มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาสามารถเห็นตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างชัดเจน ค่า pH ที่เหมาะสมของสารละลายในการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงคือสภาพเดียวกันกับร่างกายการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษให้ผลการทดลองที่รวดเร็ว และมีคุณภาพเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน

Noiphung et al. (2015) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เพื่อใช้ในการศึกษากลุ่มเลือดในระบบ ABO และ Rh โดยใช้เทคนิค immunochromatographic การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์แบบกระดาษ (PAD) ใช้เทคนิคการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) จากผลการวิจัยพบว่าการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น มีความถูกต้องของข้อมูลในการตรวจวัดดังนี้ A (n = 12), B (n = 13), AB (n = 9), O (n = 14) และ Rh (n = 48) มีค่า 92%, 85%, 89%, 93% และ 96% ตามลำดับ ใช้เวลาทดสอบรวมเพียง 10 นาที แอนติบอดีที่ถูกดูดซับบนกระดาษ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C นาน 21 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีคุณภาพเทียบเท่าวิธีตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ สามารถนำไปใช้งานแบบ point-of-care สามารถทำการวิเคราะห์โดยตรงโดยไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง วิเคราะห์ได้ผลรวดเร็ว มีต้นทุนต่ำ พกพาสะดวก มีความปลอดภัยในการใช้และสามารถทำลายได้ง่ายเพื่อป้องกันการติดเชื้อโรค

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO AG 204)
2. เครื่อง Ultrasonic Sonicator (Crest-ultrasonic, ประเทศไทย)
3. Micro pipette ขนาด 10, 20, 200, 1,000 μ L (Biopette)
4. กระดาษกรอง เบอร์ 4 (Whatman International Ltd. ประเทศไทย)
5. บล๊อคสกรีน
6. สแกนเนอร์ (cannon scanner Lide110)
7. Spectrophotometer (GENESYS 20 Visible Spectrophotometer thermo scientific, United States)
8. ปิเปตทิป
9. ตู้ดูดความชื้น (Amphoe house Model : GH 120, Taiwan)
10. เครื่องวัด pH (Mettler Toledo FiveEasy Benchtop Meter)
11. ขวดสีชาขนาด 5 และ 10 mL
12. บีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ 250 mL

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. trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (M.W. 250.29 g/mol, Sigma Aldrich CAS 53188-07-1)
3. วิตามินซี หรือ L-ascorbic acid (2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-enediol) (M.W. 176.12 g/mol, Sigma Aldrich CAS 50-81-7)
4. quercetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one) (M.W. 302.24 g/mol, Sigma Aldrich CAS 117-39-5)

5. epigallocatechin gallate, EGCG { [(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate} (M.W. 458.37 g/mol, Sigma Aldrich CAS 989-51-5)
6. toluene (AR grade บริษัท Fluka)
7. polystyrene (ซื้อจากร้านบัณฑิตเครื่องเขียน, ชลบุรี ประเทศไทย)
8. neocuproine (M.W. 208.26 g/mol, Sigma Aldrich CAS 484-11-7)
9. copper (II) chloride ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (M.W. 170.44 g/mol, Ajax Finechem CAS 1015-13-0)
10. ammonium acetate (M.W. 77.08 g/mol, Ajax Finechem CAS 631-61-8)

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 การเตรียมสารละลาย CUPRAC

3.3.1.1 การเตรียมสารละลาย 4 mM CuCl_2

ซึ่ง $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มา 0.0170 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 5.00 mL

3.3.1.2 การเตรียมสารละลาย 10 mM ammonium acetate pH 7

ซึ่ง ammonium acetate มา 0.1927 g ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 250 mL ปรับ pH = 7

3.3.1.3 การเตรียมสารละลาย 12 mM neocuproine

ซึ่ง neocuproine มา 0.0139 g ละลายใน 96% ethanol 1.00 mL จะได้สารละลาย neocuproine 66.74 mM จากนั้นปิเปตสารมา 300.0 μL แล้วเติมน้ำกลั่น 1,365.5 μL จะได้สารละลาย 12 mM neocuproine

3.3.2 การเตรียมสารละลาย gallic acid

เตรียม stock ของ gallic acid ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5.00 mL โดยซึ่ง gallic acid 0.0085 g ละลายใน 96 % ethanol 5.00 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.001–5.000 mM ด้วยน้ำกลั่น

3.3.3 การเตรียมสารละลาย trolox

เตรียม stock ของ trolox ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5.00 mL โดยซึ่ง trolox 0.0125 g ละลายใน 96 % ethanol 5.00 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.001-5 mM ด้วยน้ำกลั่น

3.3.4 การเตรียมสารละลายวิตามินซี (*L-ascorbic acid*)

เตรียม stock ของ ascorbic acid ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5.00 mL โดยชั่ง ascorbic acid 0.0088 g ละลายในน้ำกลั่น 5.00 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.001-5 mM ด้วยน้ำกลั่น

3.3.5 การเตรียมสารละลาย quercetin

เตรียม stock ของ quercetin ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5.00 mL โดยชั่ง quercetin 0.0151 g ละลายใน 96% ethanol 5.00 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.001-5 mM ด้วยน้ำกลั่น

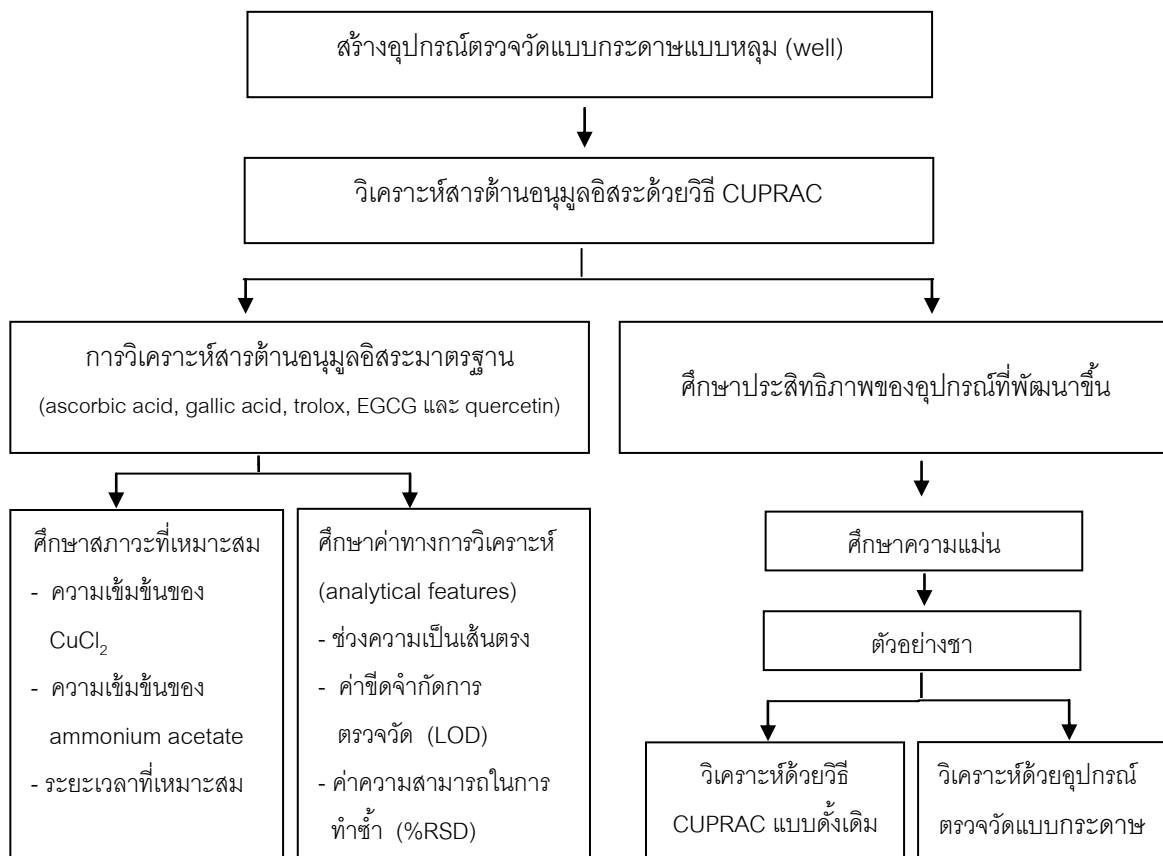
3.3.6 การเตรียมสารละลาย epigallocatechin gallate

เตรียม stock ของ epigallocatechin gallate ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5.00 mL โดยชั่ง epigallocatechin gallate 0.0229 g ละลายใน 96 % ethanol 5.00 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.001-5 mM ด้วยน้ำกลั่น

3.3.7 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างชามา 2 กรัม ละลายในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ปริมาตร 200 mL ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองตะกอนชาออก นำน้ำชาที่ได้ไปวิเคราะห์หรือเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

3.3 แผนการดำเนินการวิจัย

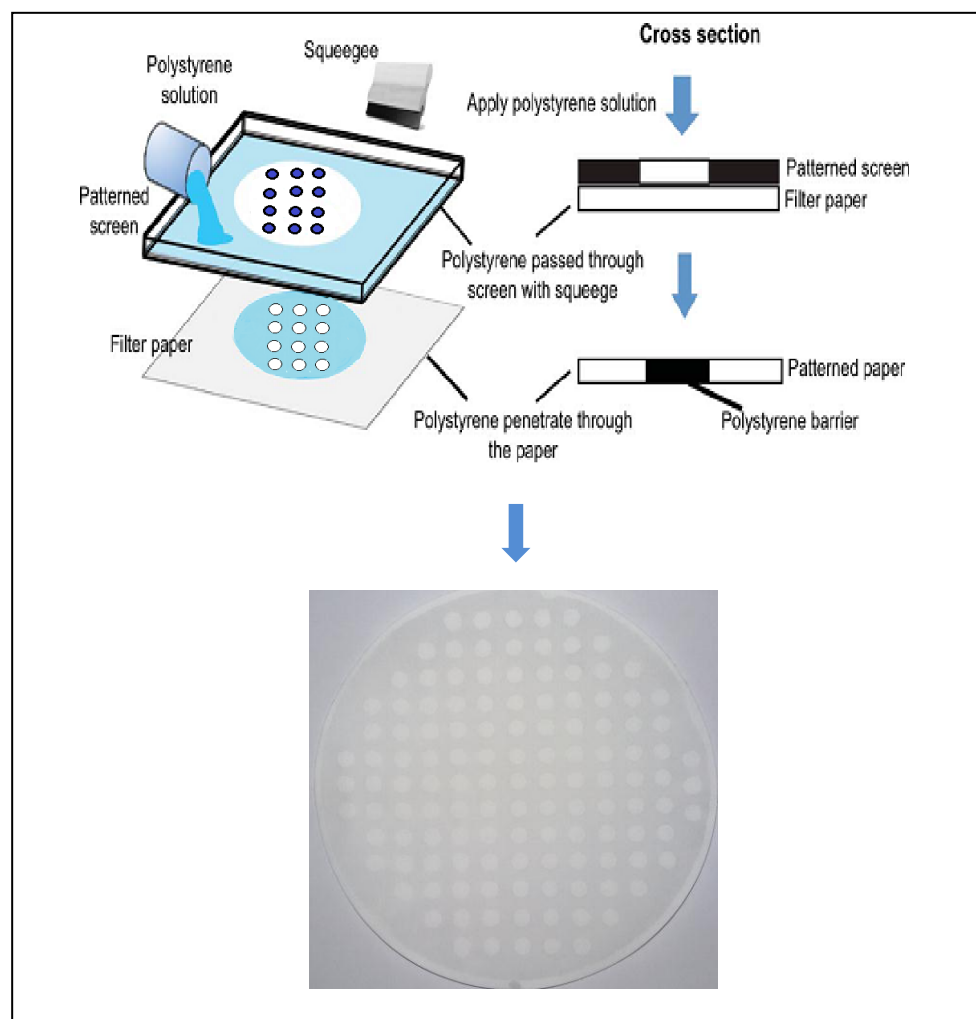


ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการเกิดสีของสารละลาย copper(II)-neocuproine [Cu(II)-Nc] จากไม่มีสีเป็น copper(I)-neocuproine [Cu(I)-Nc] ที่มีสีส้ม-เหลือง ในการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาโดยใช้ ascorbic acid, trolox, EGCG, gallic acid และ quercetin เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา จะแสดงเป็น gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ ค่าหาได้โดยประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษอย่างง่ายโดยอาศัยการวัดความเข้มสีนำสัญญาณที่ได้ไปแทนค่าในกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน

3.4 การเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

เตรียมโดยการชั่ง polystyrene ละลายด้วย toluene ในอัตราส่วน 1.25 g : 5 mL จากนั้นนำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator เพื่อไล่ฟองอากาศประมาณ 5–10 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเทบนบล็อกลสกรีนที่อยู่บนกระดาษกรอง ปาดสารละลายให้ซึมผ่านสกรีนไปยังกระดาษรอให้แห้ง ตัดด้านหลังด้วยสก็อตเทป ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารละลายที่นำมาทดสอบจะเห็นได้ว่ารูปร่างของอุปกรณ์ขึ้นอยู่กับแบบบล็อกลสกรีน ในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ศึกษาอุปกรณ์แบบกระดาษที่มีรูปร่างแบบหลุม (well format) ทำได้โดยสกรีนให้มีลักษณะเป็นหลุมดังภาพที่ 3-2 โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 5 มิลลิเมตร (Sameenoi et al., 2014)



ภาพที่ 3-2 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบหลุม (well format)

3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี CUPRAC ได้แก่

3.5.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย CuCl_2

หยดสารละลาย CuCl_2 เข้มข้นในช่วง 1- 20 mM จำนวน 2 μL ลงบนอุปกรณ์แบบกระดาษ โดยมีการทำ blank ควบคู่กับทุกความเข้มข้นของ CuCl_2 รอให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย ammonium acetate เข้มข้น 100 mM จำนวน 2 μL รอให้แห้ง แล้วหยดสารละลาย neocuproine เข้มข้น 12 mM จำนวน 2 μL รอให้แห้ง สูดทำยหยดสารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 5 mM จำนวน 2 μL ปลอ่ยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี

เลือกความเข้มข้นของสารละลาย CuCl_2 ที่ให้ค่าความเข้มสีสูงสุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.5.1 โดยเลือกความเข้มข้นของสารละลาย CuCl_2 ที่มีค่าความเข้ม 4 mM และสารละลาย ammonium acetate pH 7 เข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 mM ปลอ่ยให้เกิดปฏิกิริยา แล้วนำไปสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี

เลือกความเข้มข้นของสารละลาย ammonium acetate ที่ให้ค่าความเข้มสีสูงสุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.3 ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.5.1 โดยเลือกความเข้มข้นของสารละลาย CuCl_2 ที่มีค่าความเข้ม 4 mM สารละลาย ammonium acetate เข้มข้น 10 mM และ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM ปลอ่ยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10, 20, 30 และ 45 นาที ก่อนสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี

เลือกเวลา ที่ให้ค่าความเข้มสีสูงสุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

3.6.1 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid

3.6.1.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารต้านอนุมูลอิสระโดยมี ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

หยดสารละลาย CuCl_2 เข้มข้น 4 mM จำนวน 2 μL รอให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย ammonium acetate เข้มข้น 10 mM จำนวน 2 μL รอให้แห้ง แล้วหยดสารละลาย neocuproine เข้มข้น 12 mM จำนวน 2 μL รอให้แห้ง สุดท้ายหยดสารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 0.001-10 mM จำนวน 2 μL ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 20 นาที ก่อนสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี แล้วผลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

3.6.1.2 ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) โดยมี ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.6.1.1 ใช้น้ำกลั่นแทนสารมาตรฐาน โดยทำซ้ำ 10 ครั้ง ก่อนสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี จากนั้นหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ตามสมการดังต่อไปนี้ (Armbruster & Pry, 2008)

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD)

$$I_{\text{LOD}} = I_0 + 3SD_{\text{blank}}$$

เมื่อ

I_{LOD} คือ ค่าความเข้มสีของ CUPRAC ที่ความเข้มข้นระดับขีดจำกัดการตรวจวัด

I_0 คือ ค่าความเข้มสี ของ blank

SD_{blank} คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความเข้มสีของ blank (n=10)

นำ I_{LOD} ไปคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (x_{LOD}) ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานดังสมการ

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

เมื่อ

m คือ ความชัน

c คือ จุดตัดแกนในกราฟมาตรฐาน

x_{LOD} คือ ขีดจำกัดการตรวจวัด

3.6.1.3 ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของวิธี (reproducibility) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยมี ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.6.1.1 ใช้สารละลาย ascorbic acid 2 ความเข้มข้น (เลือกความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง) โดยทำซ้ำความเข้มข้นละ 10 ครั้ง แล้วนำไปสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาความสามารถในการทำซ้ำของวิธี (reproducibility) โดยรายงานเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้ดังนี้

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

เมื่อ

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด

ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ของสารมาตรฐานตัวอื่น ๆ ได้แก่ gallic acid, trolox,

EGCG และ quercetin

3.7 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม

3.7.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชงด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.6.1.1 ใช้ตัวอย่างชา 2 μL แทนสารมาตรฐาน ก่อนสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี แล้วผลที่ได้ไปเทียบกราฟมาตรฐานของ gallic acid และคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา โดยแสดงเป็น gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g}$ tea

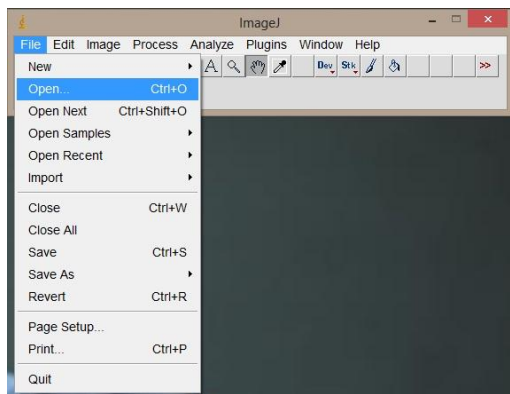
3.7.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชงด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม

นำสารละลาย นำสารมาตรฐาน gallic acid 0–2 mM และ สารตัวอย่างชา เดิม สารละลายรีเอเจนท์ CUPRAC (สารละลาย CuCl_2 เข้มข้น 1 M + สารละลาย ammonium acetate เข้มข้น 1 M + สารละลาย neocuproine 7.5 mM อย่างละ 1 mL) แล้วเติมน้ำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 4.1 mL ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำผลที่ได้มาสร้างกราฟ

มาตรฐานและคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา โดยแสดงในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g}$ tea

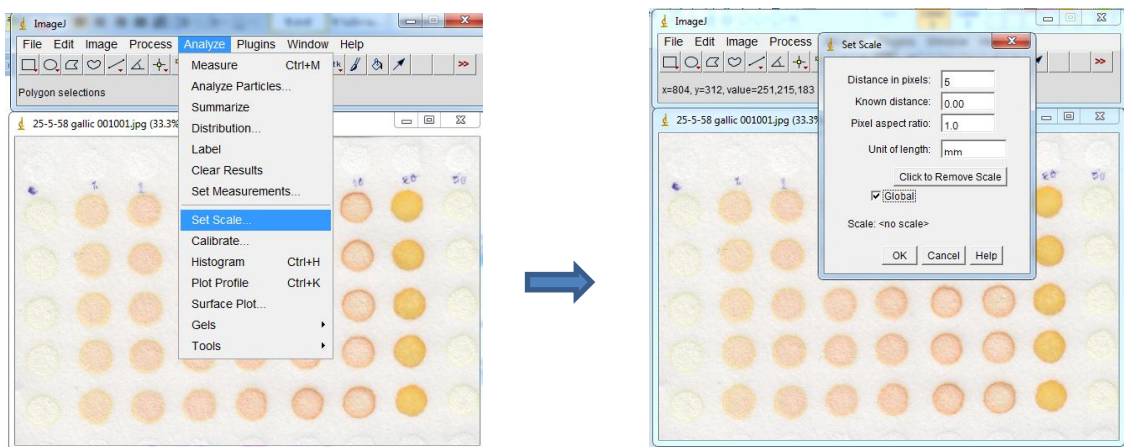
3.8 การวิเคราะห์ความเข้มข้นด้วยโปรแกรม ImageJ

1. เปิดโปรแกรม ImageJ
2. เลือก open แล้วเลือกรูปที่ต้องการประมวลผล



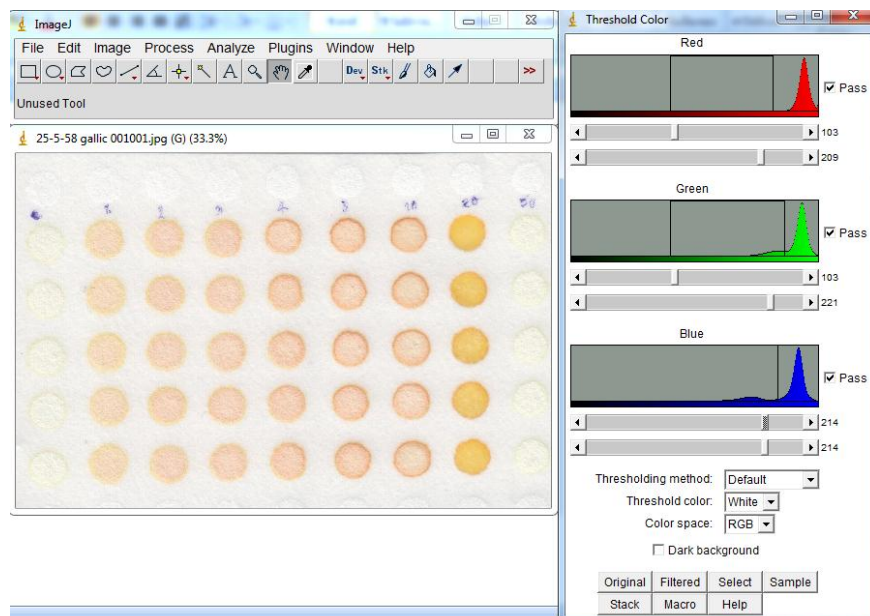
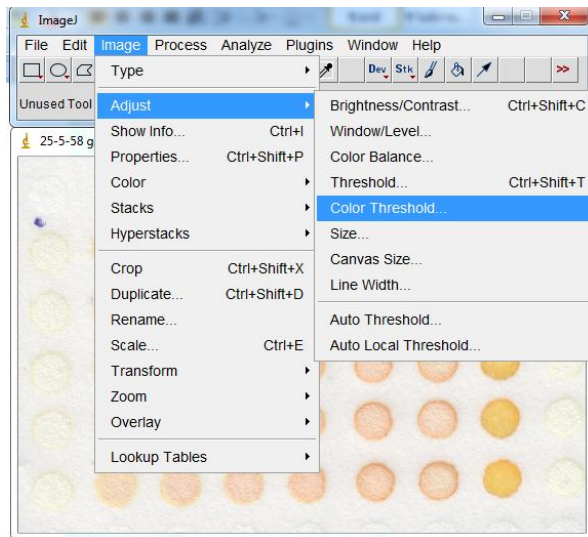
ภาพที่ 3-3 แสดงการเปิดโปรแกรม ImageJ

3. Set scale ของบริเวณที่ตรวจวัด



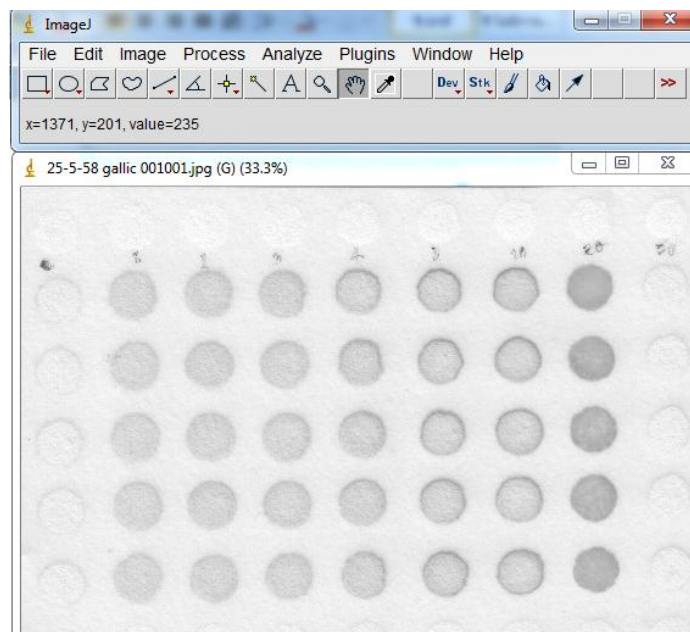
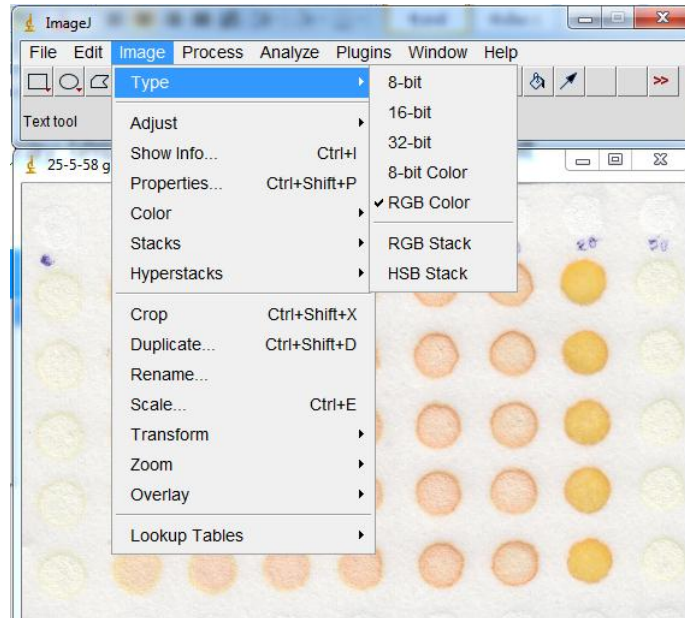
ภาพที่ 3-4 แสดง Set scale ของบริเวณที่ตรวจวัดในโปรแกรม ImageJ

4. ปรับรูปให้เหลือเฉพาะสีที่ต้องการโดยไปที่ Image--> adjust-->color threshold จะปรากฏ box ขึ้นมาดังรูป เลือก pass ทั้งหมด เลือก Threshold color : White, Color space : RGB ส่วน scale ขึ้นให้ปรับตามภาพที่ 3-5



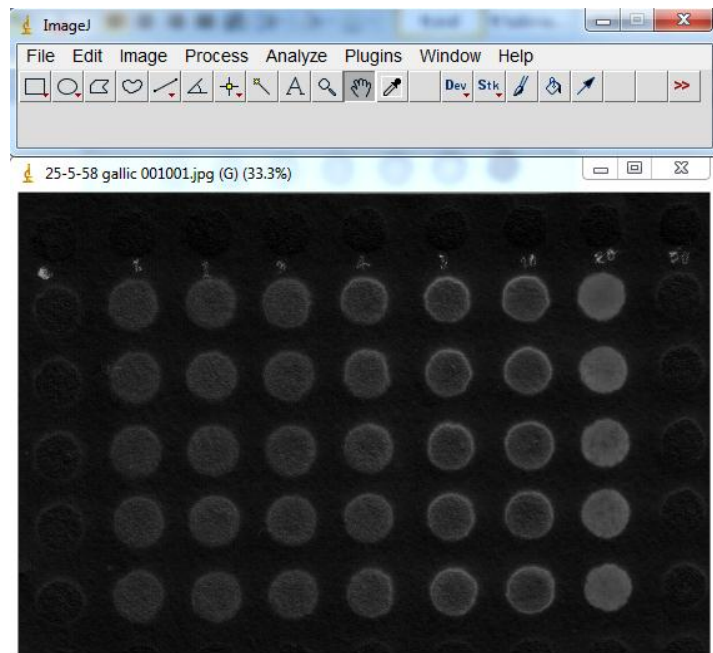
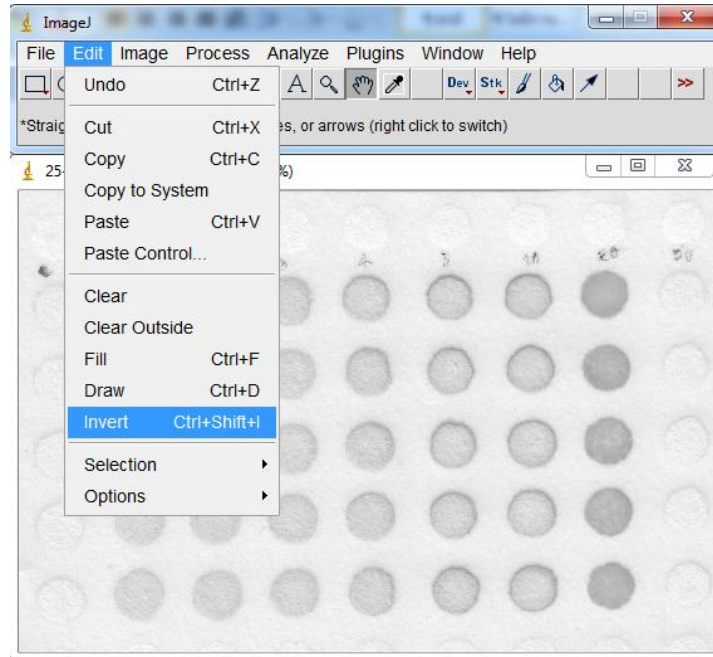
ภาพที่ 3-5 แสดงการปรับสีในโปรแกรม ImageJ

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



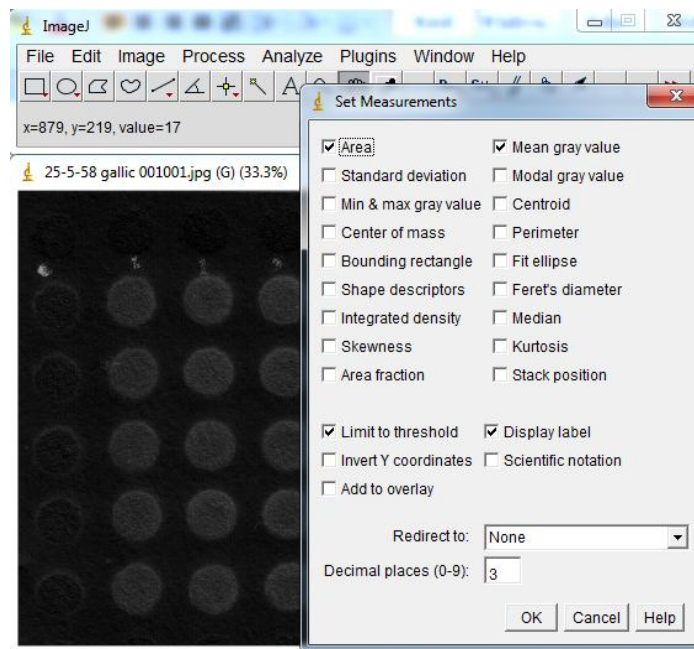
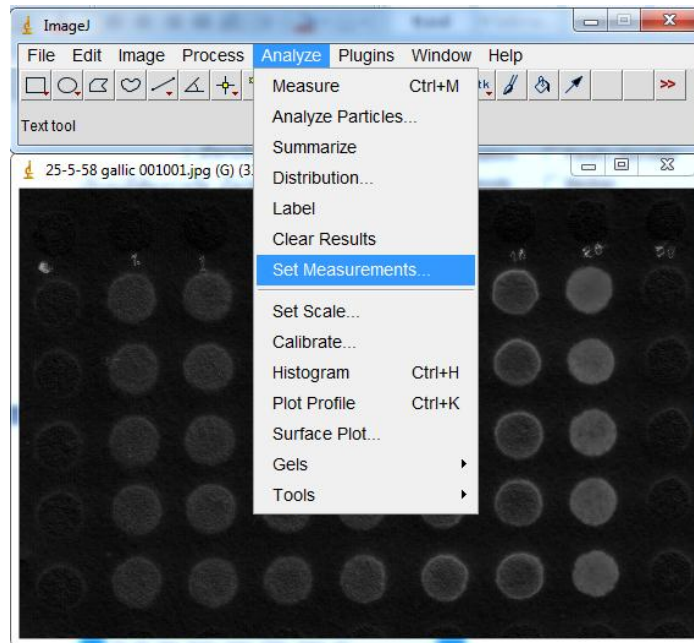
ภาพที่ 3-6 แสดงการปรับเป็นสี gray ในโปรแกรม ImageJ

6. ปรับให้เป็น gray intensity โดยเลือก Edit--> invert



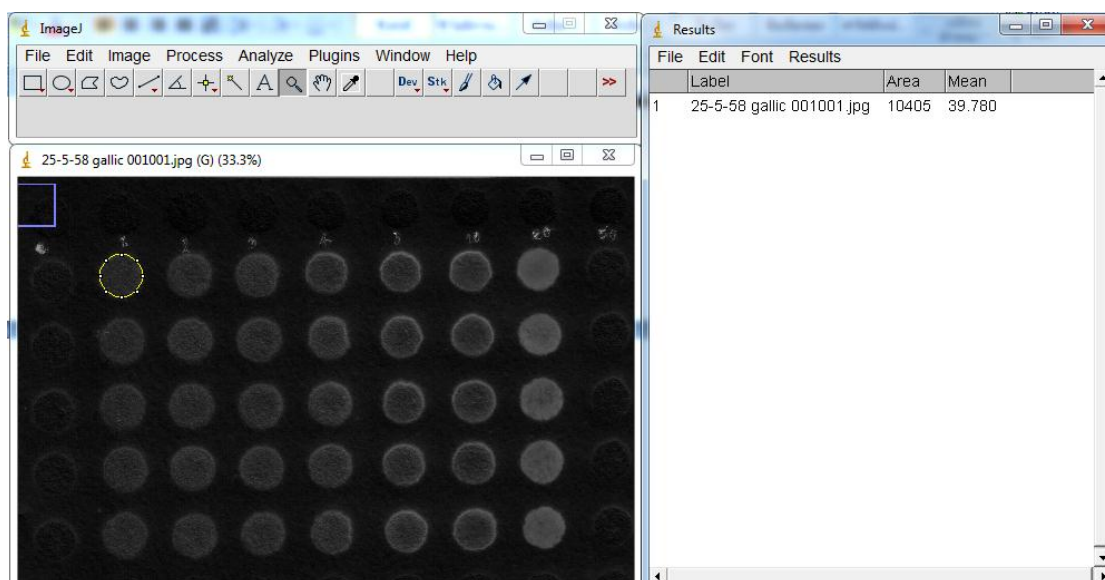
ภาพที่ 3-7 แสดงการปรับเป็น gray intensity ในโปรแกรม ImageJ

7. ตั้งค่าวัดความเข้มสีโดยไปที่ set measurements จะปรากฏ box ดังรูปให้เลือก Area, Mean gray value, limit to threshold และ display label (ทำเฉพาะครั้งแรกที่ใช้โปรแกรม) แล้วคลิก OK



ภาพที่ 3-8 แสดงการ set measurements ในโปรแกรม ImageJ

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



ภาพที่ 3-9 แสดงการ Analyze Measurement ในโปรแกรม ImageJ

บทที่ 4

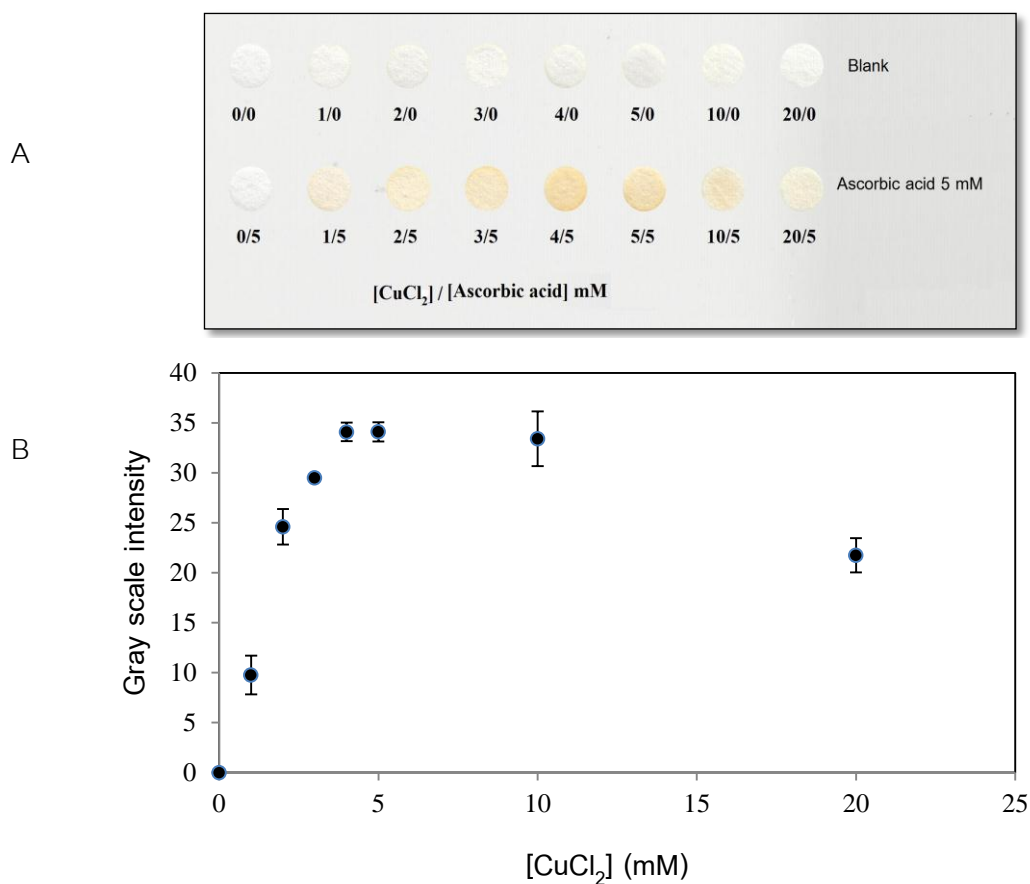
ผลการการวิจัยและอภิปราย

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี CUPRAC ได้แก่

4.1.1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย CuCl_2

เนื่องด้วยการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC เป็นการวัดการเพิ่มขึ้นของสัญญาณของ CUPRAC reagent เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ CuCl_2 ในการนำไปวิเคราะห์จึงเป็นปัจจัยสำคัญ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจะต้องเป็นความเข้มข้นที่ให้สัญญาณที่สูงเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปเพียงเล็กน้อย งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ CuCl_2 ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน โดยการศึกษาคความเข้มข้นของ CuCl_2 ตั้งแต่ 1-20 mM โดยหยดสารละลาย CuCl_2 จำนวน 2 μL ลงบนอุปกรณ์แบบกระดาษ (n=3) ซึ่งมีการทำ blank ควบคู่กับทุกความเข้มข้นของ CuCl_2 รอให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย ammonium acetate เข้มข้น 100 mM จำนวน 2 μL รอให้แห้ง แล้วหยดสารละลาย neocuproine เข้มข้น 12 mM จำนวน 2 μL รอให้แห้ง สุดท้ายหยดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid เข้มข้น 5 mM จำนวน 2 μL ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี นำค่าความเข้มสีมาสร้างกราฟ โดยพลอตระหว่างความเข้มข้นของ CuCl_2 และความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM แสดงในภาพที่ 4-1

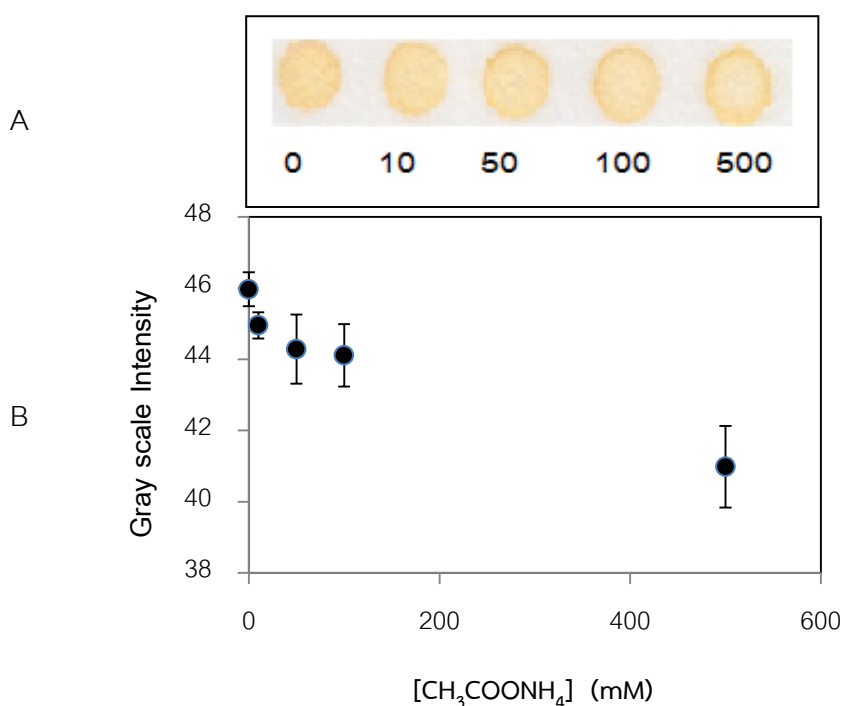


ภาพที่ 4-1 การศึกษาความเข้มข้นของ CuCl_2 ที่เหมาะสมใน CUPRAC reagent สำหรับการวิเคราะห์ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM (A) แสดงสี CUPRAC reagent บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ CuCl_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid กับ CuCl_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ($n=3$)

จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CuCl_2 และความเข้มสี CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CuCl_2 เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent ก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วยและคงที่ที่ความเข้มข้นของ CuCl_2 เท่ากับ 4 mM ขึ้นไปในการทดลองนี้จึงเลือก CuCl_2 ที่มีความเข้มข้น 4 mM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากให้สัญญาณที่สูงภายหลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

4.1.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย ammonium acetate

จากการศึกษาความเข้มข้นสารละลาย ammonium acetate pH 7 เข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 mM ได้ผลการทดลองดังแสดงในกราฟที่พลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent กับความเข้มข้นสารละลาย ammonium acetate ดังภาพที่ 4-2

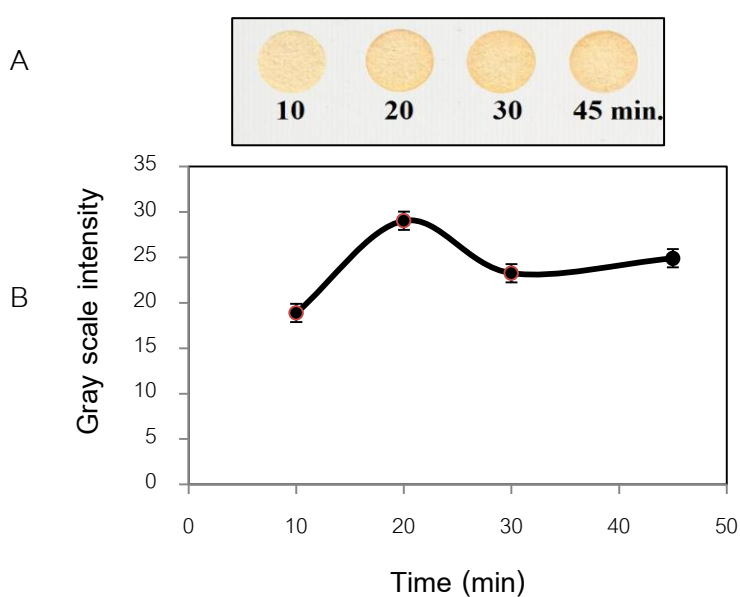


ภาพที่ 4-2 การศึกษาความเข้มข้นของ ammonium acetate ที่เหมาะสมใน CUPRAC reagent สำหรับการวิเคราะห์ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM (A) แสดงสี CUPRAC reagent บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ ammonium acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid กับ ammonium acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)

จากการศึกษาความเข้มข้นสารละลาย ammonium acetate ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CUPRAC reagent กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น 5 mM พบว่าความเข้มข้นสารละลาย ammonium acetate ที่เหมาะสมที่สุด คือ 10 mM เนื่องจากเป็นค่าความเข้มข้นที่ให้สัญญาณสูงและยังสามารถทำหน้าที่ควบคุมค่า pH ไม่ให้เปลี่ยนแปลงได้

4.1.3 ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CUPRAC reagent กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 5 mM ได้ผลการทดลองดังแสดงในกราฟที่พลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 (A) แสดงสีของสารละลาย CUPRAC reagent ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (n=3)

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CUPRAC reagent กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 5 mM พบว่าที่เวลาในการทำปฏิกิริยา 20 นาที ให้ค่าสัญญาณความเข้มสีของ CUPRAC reagent ที่สูงสุด ในการทดลองนี้จึงเลือกระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 20 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้น

4.2 ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

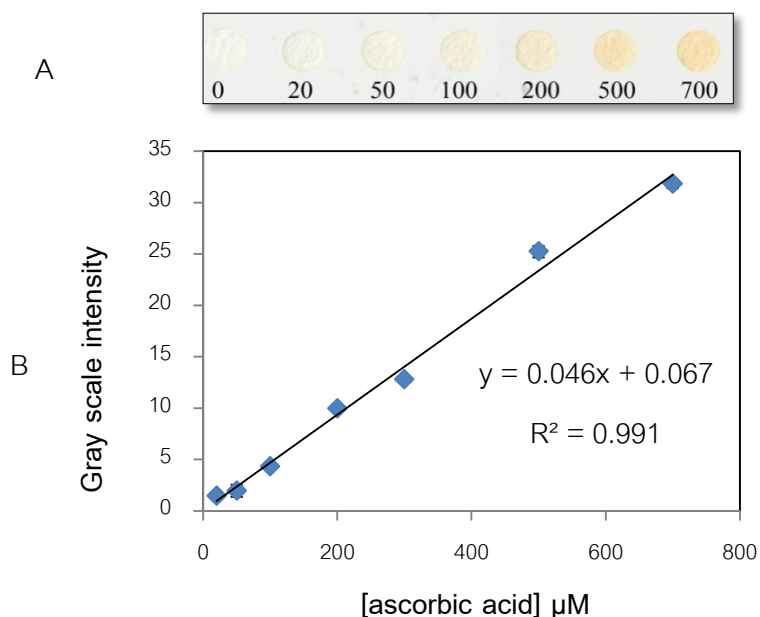
4.2.1 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid

ascorbic acid เป็นรูปที่ออกฤทธิ์ ของวิตามินซี วิตามินซีมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวที่สามารถละลายน้ำได้ดีมาก คงตัวในอากาศเมื่ออยู่ในสภาวะบริสุทธิ์ และแห้ง แต่สลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อโดนความชื้นและแสง ascorbic acid แสดงสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น บริเวณพันธะคู่ของกรดไขมัน โดยทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นด้วยการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันไปเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น และจับกับโลหะไอออนที่เป็นสารเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ณัฐสุภา รัชตะนาวิน, 2547)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ascorbic acid ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-4 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ ascorbic acid เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากสารเชิงซ้อน Cu(II)-neocuproine complex ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid ส่งผลให้ไอออน Cu(II) ถูกรีดิวซ์กลายเป็น Cu (I) เกิดสารเชิงซ้อน Cu(I)- neocuproine complex ที่มีสีเหลืองส้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4-4 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ ascorbic acid พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ ascorbic acid เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 4-4 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ ascorbic acid เท่ากับ 20-700 μM ($R^2 = 0.991$) (ตารางที่ ก-1 ภาคผนวก ก)

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ ascorbic acid ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง ความเข้มข้นละ 10 μM พบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 13.3-17.7 (n=10) (ตารางที่ ก-6 ภาคผนวก ก และแสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน ascorbic acid

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ ascorbic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 13 μM (ตารางที่ ก-6 ภาคผนวก ก และแสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข)



ภาพที่ 4-4 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ ascorbic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)

4.2.2 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

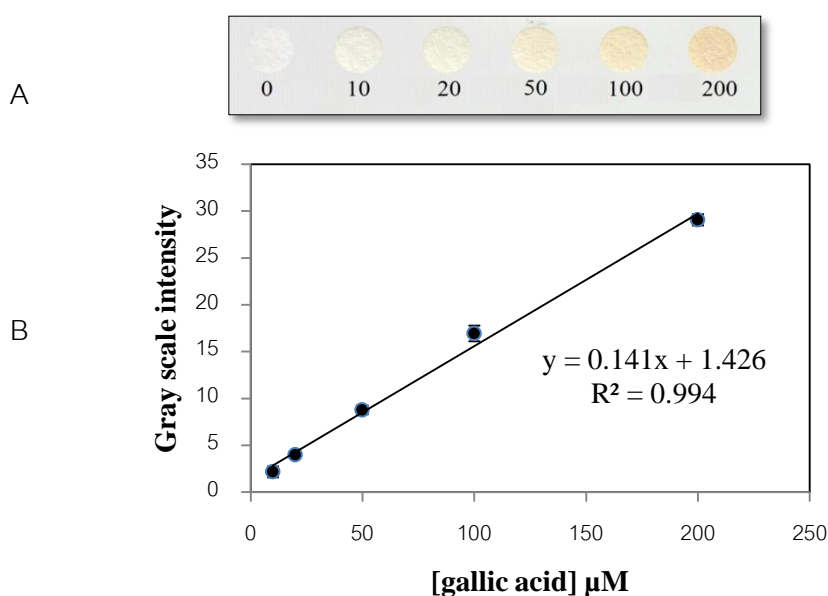
gallic acid เป็นกรดอินทรีย์ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียดเมื่ออายุมากขึ้นซึ่งช่วยลดโรคหัวใจและโรคกระดูกในผู้สูงอายุ โดยสามารถพบได้ในอาหาร เช่น บลูเบอร์รี่ แอปเปิ้ล ใบชาออลนท์ (Phakthong, Liawruangrath, & Liawruangrath, 2014)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-5 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ gallic acid เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4-5 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ gallic acid เพิ่มขึ้นดังภาพที่ 4-5 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ gallic acid เท่ากับ 10-200 µM ($R^2 = 0.994$) (ตารางที่ ก-2 ภาคผนวก ก)

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ gallic acid ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 7.3 -15.1

(n=10) (ตารางที่ ก-7 ภาคผนวก ก) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน gallic acid

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ gallic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 5.7 μM (ตารางที่ ก-7 ภาคผนวก ก)



ภาพที่ 4-5 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)

4.2.3 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG

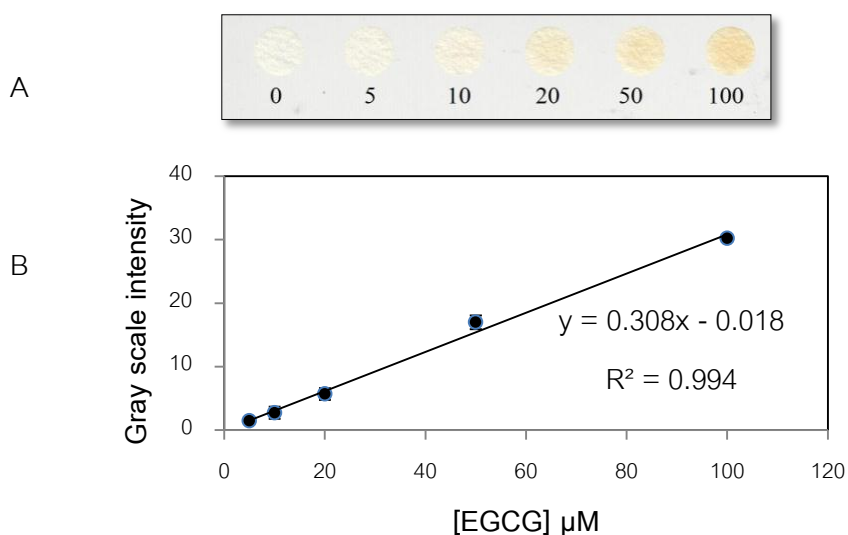
EGCG มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง ทำลายเซลล์มะเร็งและหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ ช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด พบมากใน ชาเขียว (Nagle, Ferreira, & Zhou, 2006)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ EGCG ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-6 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ EGCG เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4-6 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ EGCG พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ EGCG เพิ่มขึ้นดังภาพที่ 4-6 B และ

กราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ EGCG เท่ากับ 5–100 μM ($R^2 = 0.994$) (ตารางที่ ก-3 ภาคผนวก ก)

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ EGCG พบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.93-14.4 ($n=10$) (ตารางที่ ก-8 ภาคผนวก ก) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน EGCG

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ EGCG ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 1.2 μM (ตารางที่ ก-8 ภาคผนวก ก)



ภาพที่ 4- 6 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ EGCG

ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ EGCG ความเข้มข้นต่าง ๆ ($n=3$)

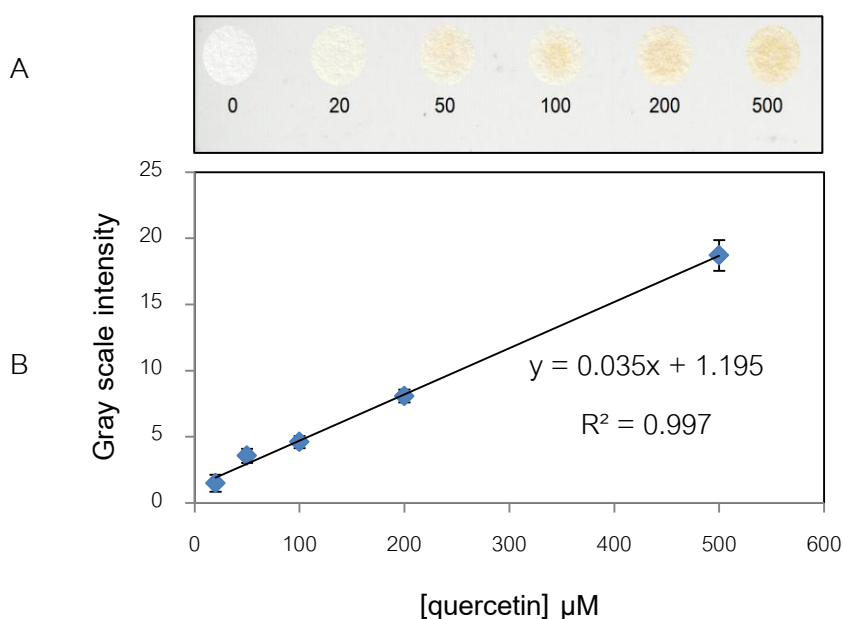
4.2.4 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin

quercetin เป็นสารพฤษเคมีที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด มักจะอยู่ตามเปลือกไม้และผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล, ชา, หัวหอม และไวน์แดง เป็นไบโอฟลาโวนอยด์ที่มีประสิทธิภาพต่อต้านอนุมูลอิสระและลดอาการอักเสบ (วิภพ สุทชนะ, 2556)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ quercetin ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-7 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ quercetin เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4-7 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ quercetin พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ quercetin เพิ่มขึ้นดังภาพที่ 4-7 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ quercetin เท่ากับ 20–500 μM ($R^2 = 0.997$) (ตารางที่ ก-4 ภาคผนวก ก)

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ quercetin ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 4.70-9.80 ($n=10$) (ตารางที่ ก-9 ภาคผนวก ก) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน quercetin

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ quercetin ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 21 μM (ตารางที่ ก-9 ภาคผนวก ก)



ภาพที่ 4-7 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ ($n=3$)

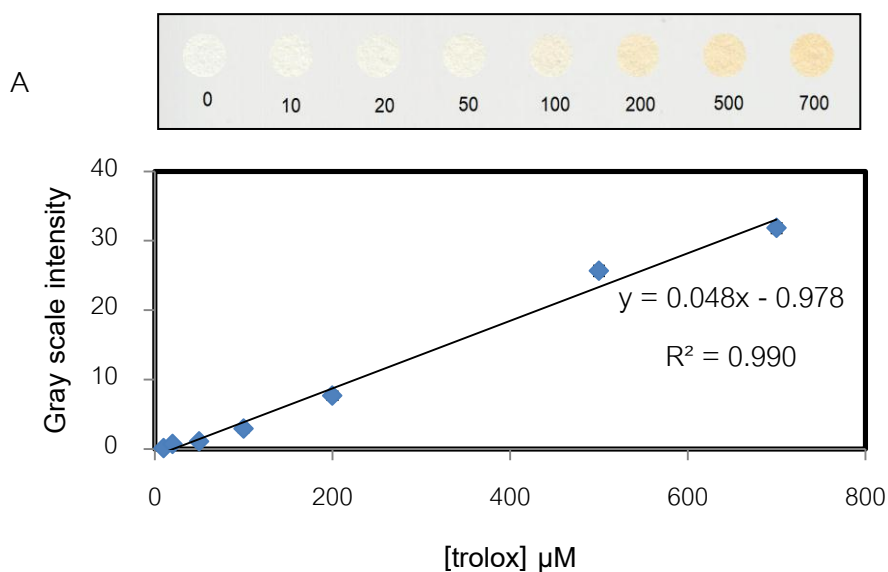
4.2.5 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

trolox เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคน เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างที่ทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบหลายวิธี ในการวิจัยนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (โอบา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ trolox ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-8 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ trolox เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 4-8 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ trolox พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ trolox เพิ่มขึ้นดังภาพที่ 4-8 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ trolox เท่ากับ 10–700 μM ($R^2 = 0.990$) (ตารางที่ ก-5 ภาคผนวก ก)

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ trolox ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 μM พบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 3.95-22.8 ($n=10$) (ตารางที่ ก-10 ภาคผนวก ก) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน trolox

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ trolox ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 6.4 μM (ตารางที่ ก-7 ภาคผนวก ก)



ภาพที่ 4- 8 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)

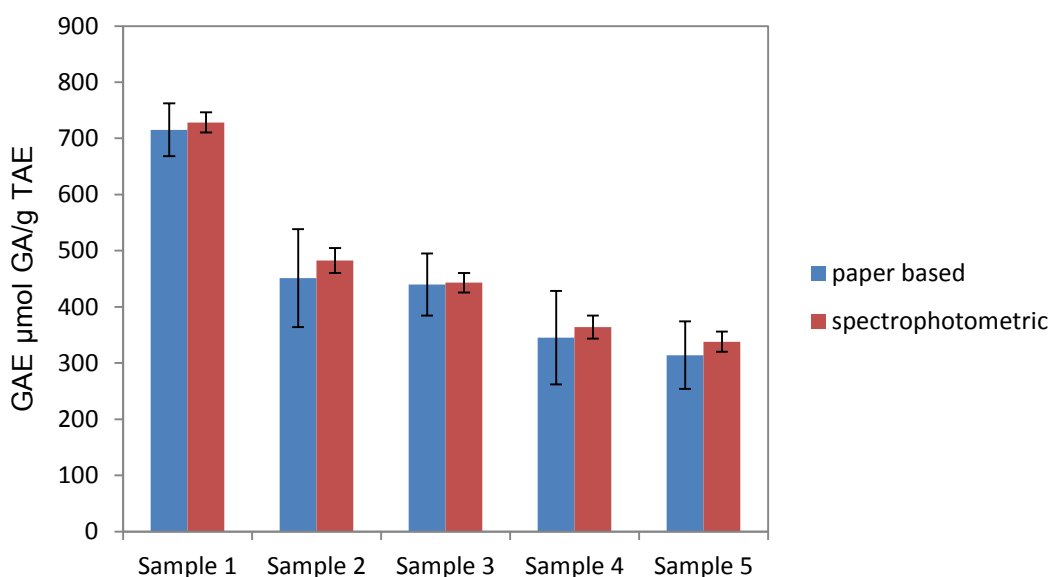
จากการวิเคราะห์สามมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถสรุปค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ได้ดังนี้

ตารางที่ 4-1 ค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธี CUPRAC

Antioxidant standards	Linear range		Reproducibility (%RSD)	LOD (μM)
	μM	R^2		
L-ascorbic acid	20-700	0.991	13.3-17.7	13
gallic acid	10-200	0.994	7.31-15.1	5.7
EGCG	5-100	0.994	1.93-14.4	1.2
quercetin	20-500	0.997	4.70-9.80	21
trolox	10-700	0.990	3.95 - 22.8	6.4

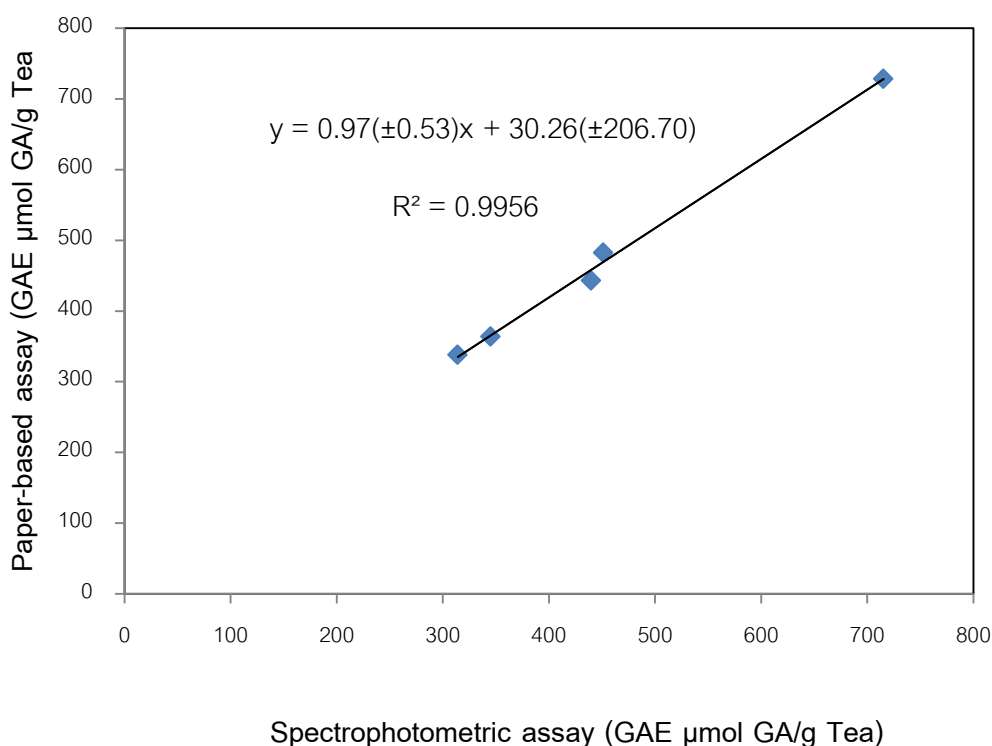
4.3 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid, gallic acid, EGCG, quercetin และ trolox พบว่าสามารถทำได้โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ปริมาตร 2 μL และ CUPRAC reagent ปริมาตรรวม 6 μL สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกันและใช้สารในการวิเคราะห์เพียง 8 μL ให้ค่าการวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงสูง แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์ได้จริง ขั้นตอนต่อไปจึงทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในใบชาแห้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธีแบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วย μmol gallic acid equivalent/g tea ซึ่งหมายถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบ μmol gallic acid ต่อหนึ่งกรัมของชา ซึ่งมีการทำ sample blank ควบคู่กับทุกตัวอย่างชาจากการวิเคราะห์ ได้ผลการทดลองดังแสดงภาพที่ 4-9 (แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ตารางที่ ค-1, ค-2, ค-3, ค-4 และ แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ค)



ภาพที่ 4-9 แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา sample 1-5 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างชาทั้ง 5 ชนิดนำค่าจากการทดลองไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติ โดยใช้ linear regression ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธีแบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) หากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันจะได้ค่า slope และ intercept ของกราฟ ใกล้เคียง 1 และ 0 ตามลำดับ (Miller et al., 2000)



ภาพที่ 4-10 กราฟ linear regression แสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา 5 ชนิด ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

จากการทดสอบ linear regression ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าได้สมการ $y = 0.97(\pm 0.53)x + 30.26(\pm 206.70)$, $R^2 = 0.995$ กราฟมีค่า intercept เท่ากับ $30.26(\pm 206.70)$ ซึ่งเป็นค่าที่ผ่าน 0 และกราฟมีค่า slope เท่ากับ $0.97(\pm 0.53)$ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าค่า GAE ที่วิเคราะห์ได้ระหว่างวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธีแบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) มีค่าไม่แตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญ เป็นการยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แม่นยำเทียบเท่ากับวิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม นอกจากนี้จะเห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) เป็นวิธีที่ใช้ปริมาตรสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในปริมาณน้อย สามารถลดของเสียที่เกิดขึ้นหลังจากการวิเคราะห์ได้มาก อุปกรณ์สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันทีละหลาย ๆ ตัวอย่าง (>20 ตัวอย่างต่อครั้ง) ใช้อุปกรณ์แบบกระดาษที่มีราคาถูกในการวิเคราะห์และใช้สแกนเนอร์ร่วมกับโปรแกรมประมวลผลภาพเป็นระบบตรวจวัดสัญญาณ ทำให้การวิเคราะห์สามารถนำไปตรวจภาคสนามได้ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงในการตรวจวัด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based device) สร้างด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์ โดยวิธี CUPRAC ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเชิงซ้อนที่ไม่มีสีของ Cu(II)-neocuproine complex กับสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่รีดิวซ์ Cu(II) กลายเป็นสารเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproine complex ที่มีสีเหลืองส้ม ความเข้มข้นสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง โดยเบื้องต้นได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม ของ CuCl_2 ความเข้มข้นของ ammonium acetate และ ระยะเวลาที่เหมาะสม โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระคือ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CuCl_2 เท่ากับ 4 mM ความเข้มข้นของ ammonium acetate เท่ากับ 10 mM และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 20 นาที จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมไปศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) คือ ช่วงความเป็นเส้นตรง ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ค่าขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) และค่าความสามารถในการทำซ้ำ (%RSD) โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ คือ ascorbic acid, trolox, EGCG, gallic acid และ quercetin และศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยใช้ตัวอย่างชาชนิดชง 5 ยี่ห้อ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชารายงานเป็นค่า gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ พบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษร่วมกับวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ สามารถวิเคราะห์ได้ที่หลากหลายตัวอย่าง ใช้ในการคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงในการตรวจวัด ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์น้อย มีราคาถูก น้ำหนักเบาและสามารถนำไปตรวจภาคสนามได้อย่างแม่นยำ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการวิเคราะห์สารอื่น ๆ
2. ควรทำการศึกษาทดลองคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอื่น ๆ เช่น ในน้ำผลไม้ หรือพืชชนิดต่าง ๆ

บรรณานุกรม

- กนกวรรณ พิสน์เพ็ญ และยุภาพร สมীন้อย. (2557). อุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ แอลกอฮอล์โดยอาศัยการตรวจวัดทางเอนไซม์. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19(3), 160-167.
- เกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์ และดรฤณี ถาวรเจริญ. (2556). คุณภาพผลและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ในองุ่นพันธุ์ 'Harmony'. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 44(2), 309-312.
- เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มา และกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*, 1(1), 59-70.
- ณัฐฐา รัชตะนาวิน . (2547). สารต้านอนุมูลอิสระ. *แสงแดด และผิวหนัง*, 433-449.
- นิทรา เนื่องจำนงค์, นงคราญ เรืองประพันธ์, สุภาภรณ์ คณิตวิทยา, สุดชญา ศรีประสิทธิ์, ประภาพรพน พนมหิรัญกุล, ภาวดี น้อยอาษา และ บุษบง สุขเว. (2550). การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นในเครื่องดื่มที่ทำจากผลไม้และสมุนไพรไทย. *วารสารวิชาการสาธารณสุข*, 16(5), 778-786.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 275-286.
- ปวีณา เตือนฉาย และวิจิตรา เตือนฉาย. (2557). อุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษ. *วารสารวิชาการปทุมวัน*, 4(10), 37-47.
- โรสวัฒน์ พิริยะสมบุญ. (2553). "อาหารต้านอนุมูลอิสระ" Antioxidant ตัวการร้าย ปัจจัยเสื่อม. กรุงเทพฯ: Feel good.
- วิภาพ สุทชนะ. (2556). ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์: กลไกการออกฤทธิ์. *ศรีนครินทร์เวชสาร*, 28(4), 567-582.
- โสภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: นิเวศมิตรการพิมพ์.
- Abe, K., Kotera, K., Suzuki, K., & Citterio, D. (2010). Inkjet-printed paperfluidic immunochemical sensing device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 885-893.
- Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., & Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory

- quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3), 1410–1416.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957–998.
- Araujo, W. R., & Paixão, T. (2014). Fabrication of disposable electrochemical devices using silver ink and office paper. *Analyst*, 139, 2742-2750.
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clinical Biochemistry*, 29, 49-52.
- Bruzewicz, D. A., Reches, M., & Whitesides, G. M. (2008). Low-cost printing of PDMS barriers to define microchannels in paper. *Analytical Chemistry*, 80(9), 3387–3392.
- Chitnis, G., Ding, Z., Chang, C. L., Savran, C. A., & Ziaie, B. (2011). Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform. *Lab on a Chip*, 11(6), 1161-1165.
- Delaney, J. L., Hogan, C. F., Tian, J., & Shen, W. (2011). Electrogenerated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors. *Analytical chemistry*, 83, 1300-1306.
- 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.
- Klasner, S. A., Price, A. K., Hoeman, K. W., Wilson, R. S., Bell, K. J., & Culbertson, C. T. (2010). Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(5), 1821-1829.
- Li, M., Then, W. L., Li, L., & Shen, W. (2014). Paper-based device for rapid typing of secondary human blood groups. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(3), 669-677.

- Li, X., Tian, J., & Shen, W. (2010). Progress in patterned paper sizing for fabrication of paper-based microfluidic sensors. *Cellulose*, 17(3), 649-659.
- Lu, J., Ge, S., Ge, L., Yan, M., & Yu, J. (2012). Electrochemical DNA sensor based on three-dimensional folding paper device for specific and sensitive point-of-care testing. *Electrochimica Acta*, 80, 334-341.
- Lu, Y., Shi, W., Jiang, L., Qin, J., & Lin, B. (2009). Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, 30(9), 1497-1500.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1318-1320.
- Miller, J. C., & Miller, J. N. (2000). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (4th ed.). England: Pearson Education.
- Nagle, D. G., Ferreira, D., & Zhou, Y. D. (2006). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*, 67(17), 1849-1855.
- Nie, Z., Nijhuis, C. A., Gong, J., Chen, X., Kumachev, A., Martinez, A. W., Narovlyansky, M., & Whitesides, G. M. (2010). Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 10, 477-483.
- Noiphung, J., Songjaroen, T., Dungchai, W., Henry, C. S., Chailapakul, O., & Laiwattanapaisal, W. (2013). Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta*, 788, 39-45.
- Noiphung, J., Talalak, K., Hongwarittorn, I., Pupinyo, N., Thirabowonkitphithan, P., & Laiwattanapaisal, W. (2015). A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups. *Biosens Bioelectron*, 67, 485-489.
- Nomizu, K., Hashida, K., Makiono, R., & Ohara, S. (2008). Antioxidants from steamed used tea leaves and their reaction behavior. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72 (7), 1682-1689.

- Olkkonen, J., Lehtinen, K., & Erho, T. (2010). Flexographically printed fluidic structures in paper. *Analytical Chemistry*, 82(24), 10246-10250.
- Ornatska, M., Sharpe, E., Andreescu, D., & Andreescu, S. (2011). Paper bioassay based on ceria nanoparticles as colorimetric probes. *Analytical chemistry*, 83, 4273-4280.
- Phakthong, W., Liawruangrath, W., & Liawruangrath, S. (2014). Determination of gallic acid with rhodanine by reverse flow injection analysis using simplex optimization. *Talanta*, 130, 577-584.
- Sameenoi, Y., Nongkai, P. N., Nouanthavong, S., Henry, C. S., & Nacapricha, D. (2014). One-step polymer screen-printing for microfluidic paper-based analytical device (mPAD) fabrication. *Analyst*, 139, 6580-6588.
- Teerinen, T., Lappalainen, T., & Erho, T. (2014). A paper-based lateral flow assay for morphine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(24), 5955-5965.
- Vella, S. J., Beattie, P., Cademartiri, R., Laromaine A., Martinez, A. W., Phillips, S. T., & Mirica, K. A. (2012). Measuring markers of liver function using a micro-patterned paper device designed for blood from a fingerstick. *Analytical Chemistry*, 84(6), 2883-2891.
- Wang, W., Wu, W. Y., & Zhu, J. J. (2010). Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration. *Journal of Chromatography A*, 1217(24), 3896-3999.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ผลการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัด
แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก ก-1 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน
ascorbic acid

[ascorbic acid] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -N
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
Blank	1.446	1.285	1.157	1.30	0.14	0.00
20	2.11	2.25	2.77	2.38	0.35	1.08
50	2.90	2.66	2.69	2.75	0.13	1.45
100	2.99	2.83	3.91	3.24	0.59	1.95
200	5.31	5.79	5.71	5.60	0.25	4.31
300	11.55	11.02	11.18	11.25	0.27	9.95
500	14.31	14.04	13.90	14.08	0.21	12.79
700	26.07	27.16	26.39	26.54	0.56	25.24

ตารางภาคผนวก ก-2 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน
gallic acid

[gallic acid] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -N
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
Blank	1.81	1.91	1.56	1.76	0.18	0.00
10	4.60	3.61	3.59	3.93	0.58	2.17
20	5.74	5.70	5.81	5.75	0.06	3.99
50	11.06	10.21	10.32	10.53	0.46	8.77
100	19.00	19.34	17.77	18.71	0.83	16.95
200	31.35	30.97	30.16	30.83	0.61	29.07

ตารางภาคผนวก ก-3 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน
EGCG

[EGCG] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -N
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
Blank	1.25	1.24	1.27	1.25	0.02	0.00
5	2.56	2.49	3.02	2.69	0.29	1.44
10	4.22	2.91	4.78	3.97	0.96	2.71
20	5.86	7.53	7.41	6.94	0.93	5.68
50	17.27	17.99	19.43	18.23	1.10	16.97
100	31.41	31.22	31.75	31.46	0.27	30.20

ตารางภาคผนวก ก-4 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน
quercetin

[quercetin] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -N
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
Blank	1.58	1.51	1.40	1.50	0.07	0.00
20	3.70	3.07	2.16	2.98	0.63	1.48
50	5.44	4.28	5.42	5.05	0.54	3.55
100	5.91	5.65	6.73	6.10	0.46	4.60
200	10.01	9.79	8.89	9.56	0.48	8.07
500	21.81	19.66	19.14	20.20	1.16	18.71

ตารางภาคผนวก ก-5 แสดงผลการวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

[trolox] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -N
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
Blank	0.57	0.52	0.54	0.54	0.03	0.00
10	0.78	0.73	0.42	0.64	0.20	0.10
20	1.51	1.27	0.94	1.24	0.28	0.70
50	1.78	1.36	1.72	1.62	0.22	1.08
100	4.06	3.03	3.28	3.46	0.54	2.91
200	8.03	7.70	8.94	8.22	0.64	7.68
500	26.98	25.49	26.12	26.20	0.75	25.66
700	31.54	32.99	32.57	32.37	0.74	31.83

ตารางภาคผนวก ก-6 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid
เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD

ครั้งที่	Intensity		
	blank	[ascorbic acid] 200 μ M	[ascorbic acid] 500 μ M
1	0.54	2.39	25.83
2	0.52	4.06	27.74
3	0.47	3.03	28.26
4	0.51	3.28	26..20
5	0.57	2.87	28.26
6	0.75	2.31	27.13
7	0.57	2.88	26.06
8	0.34	3.28	25.57
9	0.52	3.02	26.89
10	0.54	4.04	28.06
\bar{X}	0.53	3.11	27.00
SD	0.10	0.59	1.04
\bar{X} -N	0.00	2.58	26.47
LOD		13 μ M	
%RSD		13.3-17.7	

ตารางภาคผนวก ก-7 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid
เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD

ครั้งที่	Intensity		
	blank	[gallic acid] 20 μ M	[gallic acid] 100 μ M
1	1.73	6.62	17.47
2	1.93	5.74	17.29
3	1.45	5.70	17.77
4	1.44	5.03	19.34
5	1.26	6.73	17.34
6	1.02	6.93	19.00
7	1.52	4.62	20.58
8	1.29	4.40	19.77
9	1.62	5.68	20.53
10	1.73	5.81	20.49
\bar{X}	1.50	5.73	18.96
SD	0.27	0.87	1.39
\bar{X} -N	0.00	4.23	17.46
LOD		5.7 μ M	
%RSD		7.31-15.1	

ตารางภาคผนวก ก-8 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG
เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD

ครั้งที่	Intensity		
	blank	[EGCG] 50 μ M	[EGCG] 100 μ M
1	1.27	22.94	31.22
2	1.13	23.54	31.75
3	1.00	23.61	30.05
4	1.15	22.15	30.73
5	1.08	19.43	31.91
6	0.94	23.67	30.81
7	1.13	17.27	31.21
8	1.34	17.99	31.46
9	1.25	21.11	31.51
10	1.24	15.52	32.02
\bar{X}	1.15	20.72	31.27
SD	0.12	2.98	0.60
\bar{X} -N	0.00	19.57	30.11
LOD		1.2	
%RSD		1.93-14.4	

ตารางภาคผนวก ก-9 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin
เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD

ครั้งที่	Intensity		
	blank	[quercetine] 50 μ M	[quercetine] 500 μ M
1	1.29	5.92	21.81
2	1.58	5.40	16.87
3	1.24	6.06	19.66
4	1.51	5.40	19.14
5	1.11	6.07	18.26
6	1.40	5.44	19.08
7	1.85	4.28	17.91
8	1.87	5.44	17.55
9	1.50	5.29	18.62
10	1.54	5.92	19.02
\bar{X}	1.49	5.52	18.79
SD	0.25	0.54	0.89
\bar{X} -N	0.00	4.03	17.30
LOD		21 μ M	
%RSD		4.7-9.8	

ตารางภาคผนวก ก-10 แสดงผลของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox
เพื่อวิเคราะห์ LOD และ %RSD

ครั้งที่	Intensity		
	blank	[trolox] 100 μ M	[trolox] 500 μ M
1	0.54	2.39	25.83
2	0.52	4.06	27.74
3	0.47	3.03	28.26
4	0.51	3.28	26.20
5	0.57	2.87	28.26
6	0.75	2.31	27.13
7	0.57	2.88	26.06
8	0.34	3.28	25.57
9	0.52	3.02	26.89
10	0.54	4.04	28.06
\bar{X}	0.53	3.11	27.00
SD	0.10	0.59	1.04
\bar{X} -N	0.00	2.58	26.47
LOD		6.4 μ M	
%RSD		3.95-22.8	

ภาคผนวก ข

การคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD)

และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

1. การคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น โดยมี ascorbic acid เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

$$\text{LOD} = 3\text{SD}_{\text{blank}}/m$$

เมื่อ m คือ ความชัน

SD_{blank} คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความเข้มข้นของ blank ($n=10$)

LOD คือ ขีดจำกัดการตรวจวัด

แทนค่า $m = 0.046$ และ $\text{SD}_{\text{blank}} = 0.202$ ในสมการ

$$\text{จะได้ } \text{LOD} = (3 \times 0.202) / 0.046$$

$$\text{LOD} = 13$$

∴ ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ ascorbic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ให้ได้มีค่าเท่ากับ 13 μM

2. การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD)

ใช้สารละลาย ascorbic acid 2 ความเข้มข้น (เลือกความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง) โดยทำซ้ำความเข้มข้นละ 10 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาความสามารถในการทำซ้ำของวิธี (reproducibility) โดยรายงานเป็นค่า เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้ดังนี้

- ความเข้มข้น ascorbic acid 200 μM

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

เมื่อ SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด

แทนค่า $\text{SD} = 1.13$ และ $\bar{X} = 6.39$ ที่ความเข้มข้น ascorbic acid 200 μM

ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned} \% \text{RSD} &= \frac{1.13 \times 100}{6.39} \\ &= 17.7 \end{aligned}$$

∴ % RSD ที่ความเข้มข้น ascorbic acid 200 μM มีค่าเท่ากับ 17.7

- ความเข้มข้น ascorbic acid 500 μM

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

แทนค่า $\text{SD} = 1.38$ และ $\bar{X} = 10.41$ ที่ความเข้มข้น ascorbic acid 500 μM

ในสมการ จะได้

$$\begin{aligned} \% \text{RSD} &= \frac{1.13 \times 100}{6.39} \\ &= 13.3 \end{aligned}$$

\therefore % RSD ที่ความเข้มข้น ascorbic acid 500 μM มีค่าเท่ากับ 13.3

ทำการศึกษาค่า LOD และ % RSD เหมือนกัน แต่เปลี่ยนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
มาตรฐานตัวอื่น ๆ ได้แก่ trolox, EGCG, gallic acid และ quercetin

ภาคผนวก ค

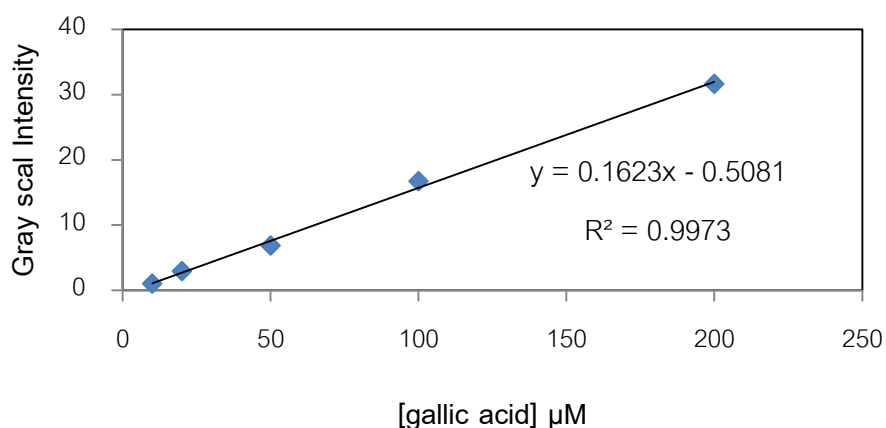
การศึกษาคงทนของการวิเคราะห์ที่ฐานอนุมูลอิสระ
ของวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) เทียบกับ
วิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

1. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษ ด้วยวิธี CUPRAC

ตารางภาคผนวก ค-1 แสดงผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay)

[gallic acid] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -blank
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
blank	2.39	3.01	2.96	2.79	0.35	0.00
10	4.30	3.91	3.15	3.79	0.58	1.00
20	5.32	6.53	5.26	5.70	0.71	2.92
50	10.50	9.43	9.03	9.65	0.76	6.87
100	18.74	20.15	19.68	19.52	0.72	16.74
200	33.17	35.17	34.91	34.41	1.09	31.63

นำข้อมูลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟและแสดง Calibration curve ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based CUPRAC assay) ได้ดังนี้



ภาพภาคผนวก ค-1 แสดง Calibration cuver ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based CUPRAC assay)

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

ตัวอย่างชา sample 1 เจือจาง 100 เท่า จาก 2.00g/200 ml

สมการเส้นตรงจาก Calibration curve ของ Std. gallic acid คือ $y = 0.162x - 0.508$

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

X คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างชา

แทนค่า $y = 11.08$ ในสมการ

จะได้ $11.08 = 0.162x - 0.508$

$$X = (11.08 + 0.508) / 0.162$$

$$X = 71.5 \mu\text{M}$$

ตัวอย่างชาเจือจาง 100 เท่า มีความเข้มข้น gallic acid = 71.53 μM

ตัวอย่างชาที่ยังไม่เจือจางมีความเข้มข้น gallic acid = 7153 μM

สารตัวอย่าง 1000 ml มี gallic acid 7153 μmol

สารตัวอย่าง 200 ml มี gallic acid 1431 μmol

สารตัวอย่าง 2.00 g มี gallic acid 1431 μmol

สารตัวอย่าง 1.00 g มี gallic acid 715.5 μmol

∴ ตัวอย่างชา มี gallic acid equivalent = 715.5 $\mu\text{mol GA/g tea}$

นำผลการวิเคราะห์ของตัวอย่างชาอื่นมาคำนวณเหมือนตัวอย่างที่ 1 โดยแสดงในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ และได้ข้อมูลดังตาราง

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

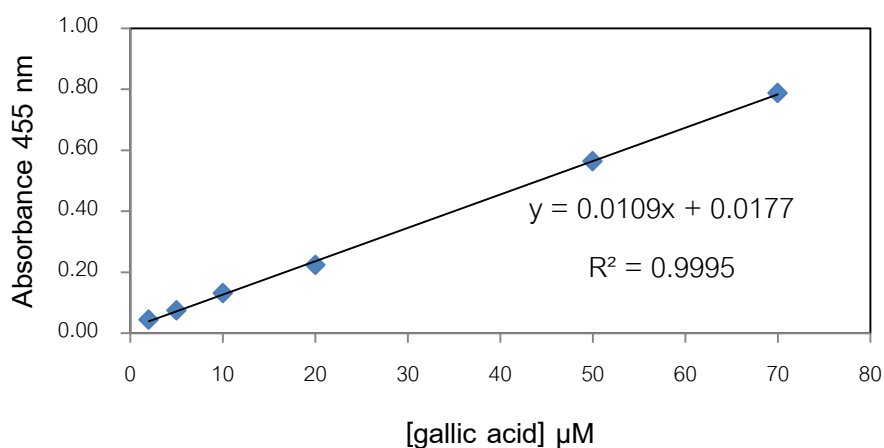
[ascorbic acid] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -blank	μmol GA/g tea
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3				
blank sample 1	0.14	0.20	0.15	0.16	0.03	0.00	-
sample 1	14.11	14.23	13.74	14.03	0.26	11.08	715.5
blank sample 2	0.17	0.16	0.19	0.17	0.01	0.00	-
sample 2	9.15	9.33	10.79	9.76	0.90	6.80	451.1
blank sample 3	0.17	0.66	0.35	0.40	0.25	0.00	-
sample 3	10.25	9.57	9.58	9.80	0.39	6.62	439.8
blank sample 4	0.27	0.31	0.25	0.28	0.03	0.00	-
sample 4	8.01	7.37	9.04	8.14	0.84	5.08	345.0
blank sample 5	0.29	0.36	0.17	0.27	0.09	0.00	-
sample 5	7.87	7.95	7.10	7.64	0.47	4.58	314.0

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

ตารางภาคผนวก ค-3 แสดงผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

[gallic acid] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -blank
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
0	0.024	0.024	0.025	0.024	0.001	0.024
2	0.044	0.045	0.044	0.044	0.001	0.044
5	0.073	0.075	0.074	0.074	0.001	0.074
10	0.131	0.130	0.132	0.131	0.001	0.131
20	0.223	0.227	0.221	0.224	0.003	0.224
50	0.564	0.563	0.562	0.563	0.001	0.563
70	0.781	0.794	0.787	0.787	0.007	0.787

นำข้อมูลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟและแสดง Calibration curve ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) ได้ดังนี้



ภาพภาคผนวก ค-2 แสดง Calibration cuver ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

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

ตัวอย่างชา sample 1 เจือจาง 100 เท่า จาก 2.00g/200 ml

สมการเส้นตรงจาก Calibration curve ของ Std. gallic acid คือ $y = 0.010x + 0.017$

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

X คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างชา

แทนค่า $y = 0.711$ ในสมการ

จะได้ $0.711 = 0.010x + 0.017$

$$X = (0.711 - 0.017) / 0.010$$

$$X = 72.83 \mu\text{M}$$

ตัวอย่างชาเจือจาง 100 เท่า มีความเข้มข้น gallic acid = 72.83 μM

ตัวอย่างชาที่ยังไม่เจือจางมีความเข้มข้น gallic acid = 7283 μM

สารตัวอย่าง 1000 ml มี gallic acid 7283 μmol

สารตัวอย่าง 200 ml มี gallic acid 1456 μmol

สารตัวอย่าง 2.00 g มี gallic acid 1456 μmol

สารตัวอย่าง 1.00 g มี gallic acid 728.3 μmol

∴ ตัวอย่างชา มี gallic acid equivalent = 728.3 $\mu\text{mol GA/g tea}$

นำผลการวิเคราะห์ของตัวอย่างชาอื่นมาคำนวณเหมือนตัวอย่างที่ 1 โดยแสดงในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g tea}$ และได้ข้อมูลดังตาราง

ตารางภาคผนวก ค-4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในหน่วย gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{mol/g}$ tea ด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

[ascorbic acid] μM	Intensity			\bar{X}	SD	\bar{X} -blank	μmol GA/g tea
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3				
blank sample 1	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.00	-
sample 1	0.712	0.714	0.713	0.713	0.001	0.711	728.3
blank sample 2	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.00	-
sample 2	0.464	0.471	0.474	0.470	0.005	0.466	482.6
blank sample 3	0.006	0.006	0.007	0.006	0.001	0.00	-
sample 3	0.432	0.433	0.432	0.432	0.001	0.426	443.0
blank sample 4	0.008	0.010	0.009	0.009	0.001	0.00	-
sample 4	0.357	0.359	0.352	0.356	0.004	0.347	364.0
blank sample 5	0.002	0.002	0.003	0.002	0.001	0.00	-
sample 5	0.324	0.322	0.324	0.323	0.001	0.321	338.0

ภาคผนวก ง

การหาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max})

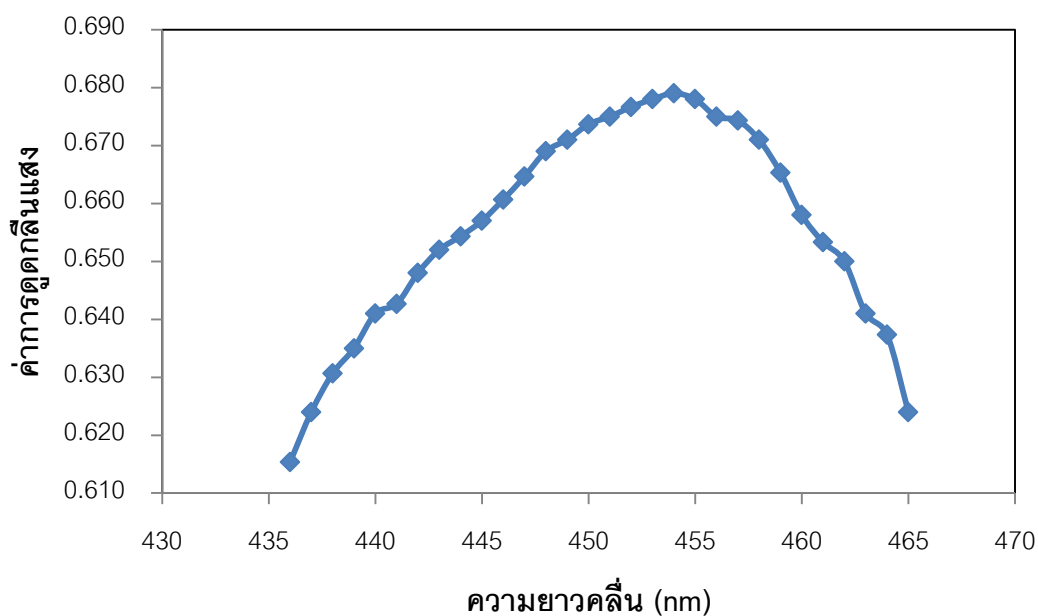
ตารางภาคผนวก ง-1 แสดงข้อมูลการหาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})

ความยาวคลื่น (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง			\bar{X}
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
436	0.6160	0.6150	0.6150	0.6153
437	0.6240	0.6240	0.6240	0.6240
438	0.6310	0.6310	0.6300	0.6307
439	0.6350	0.6350	0.6350	0.6350
440	0.6410	0.6410	0.6410	0.6410
441	0.6420	0.6430	0.6430	0.6427
442	0.6480	0.6480	0.6480	0.6480
443	0.6520	0.6520	0.6520	0.6520
444	0.6540	0.6540	0.6550	0.6543
445	0.6570	0.6570	0.6570	0.6570
446	0.6600	0.6610	0.6610	0.6607
447	0.6640	0.6650	0.6650	0.6647
448	0.6690	0.6690	0.6690	0.6690
449	0.6710	0.6710	0.6710	0.6710
450	0.6730	0.6740	0.6740	0.6737
451	0.6750	0.6750	0.6750	0.6750
452	0.6760	0.6770	0.6770	0.6767
453	0.6780	0.6780	0.6780	0.6780
454	0.6790	0.6790	0.6790	0.6790
455	0.6780	0.6780	0.6780	0.6780
456	0.6750	0.6750	0.6750	0.6750
457	0.6740	0.6750	0.6740	0.6743
458	0.6710	0.6710	0.6710	0.6710
459	0.6650	0.6650	0.6660	0.6653

ตารางภาคผนวก ง-1 แสดงข้อมูลการหาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max})
(ต่อ)

ความยาวคลื่น (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง			\bar{X}
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
460	0.6580	0.6580	0.6580	0.6580
461	0.6530	0.6530	0.6540	0.6533
462	0.6500	0.6500	0.6500	0.6500
463	0.6410	0.6410	0.6410	0.6410
464	0.6370	0.6370	0.6380	0.6373
465	0.6240	0.6240	0.6240	0.6240

จากข้อมูลการวัดค่าความยาวคลื่นในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี
CUPRAC โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สามารถนำไปพลอตกราฟได้ดังภาพ ง-1



ภาพภาคผนวก ง-1 แสดงกราฟการหาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max})

จากกราฟค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) คือ 455 nm