



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์แบบรู้ผลรวดเร็ว
ของความสามารถต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

Development of paper-based DPPH assay for high throughput
analysis of antioxidant activity in foods and natural products

ดร.ยุภาพร สมีน้อย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล

(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802351

สัญญาเลขที่ 72/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์แบบรู้ผล
รวดเร็วของความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

Development of paper-based DPPH assay for high throughput
analysis of antioxidant activity in foods and natural products

ดร.ยุภาพร สมีน้อย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กุมภาพันธ์ 2560

กิติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนาวิธีตีพีพีไอเชบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์แบบรู้ผลรวดเร็วของความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 72/2558 นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ Prof. Charles S. Henry ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา ดร.อนันต์ อธิพรชัย สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ขอขอบคุณนิสิตทุกคนที่ช่วยทำการทดลองให้สำเร็จลุล่วง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆ ในการทำการทดลอง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษทำงานร่วมกับวิธี DPPH หลักการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาศัยการตรวจวัดสีของ DPPH ที่ถูกฟอกจางภายหลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณความเข้มข้นของ DPPH ที่ลดลงแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง วิเคราะห์สีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้แก่ ความเข้มข้นของ DPPH เริ่มต้น และเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอุปกรณ์ตรวจวัดโดยการวิเคราะห์และนำสภาวะที่เหมาะสมไปวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 6 ชนิด (กรดแกลลิก, โทลือกซ์, กรดแอสคอร์บิก, กรดคาเฟอิก, กรดวานิลลิกและ เคออสิทิน) ทดสอบความแม่นยำของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชา 7 ชนิดเทียบกับวิธี DPPH ดั้งเดิม (spectrophotometric assay) จากการทดลองพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ gallic acid equivalent (GAE, $\mu\text{mol GA/g tea}$) ที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (two tailed $P = 0.8114$) แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้จริง ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนต์น้อย วิเคราะห์สารได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ และอุปกรณ์มีน้ำหนักเบาสามารถนำไปตรวจวัดภาคสนามได้

Abstract

This research developed a method to analyze antioxidant activity using a paper-based analytical device (μ PAD) with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Analysis of antioxidant activity was based on measuring the decreasing of DPPH color after reacted with antioxidant compounds. Changes of color intensity are directly proportional to antioxidant activity and quantified using imaging software. Optimization of the assay for the DPPH analysis on a paper-based device was carried out including starting concentration of DPPH and reaction time. The optimal condition was applied for the analysis of 6 different model standard antioxidants including Gallic acid, Trolox, Ascorbic acid and Caffeic acid, Vanillic acid and Quercetin. The developed DPPH μ PAD assay was validated against traditional DPPH spectrophotometric assay for the analysis of 7 tea samples. The results showed that antioxidant activities expressed as gallic acid equivalent (GAE, $\mu\text{mol GA/g tea}$) for all samples obtained from the two methods are not significant difference at 95% confidence level (two tailed $P = 0.8114$). This result indicated that the developed DPPH- μ PAD assay was effectively used to analyze antioxidant activity of real tea samples. Furthermore, the developed μ PAD required low-level sample and reagent volume with inexpensive analysis cost and is suitable for field-testing.

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อภาษาไทย	iv
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v
สารบัญ	vi
สารบัญภาพ	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	5
2.2 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay	6
2.3 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based device)	7
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 3 การทดลอง	10
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	10
3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง	11
3.2.1. สารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	11
3.2.2. สารละลาย gallic acid	11
3.2.3. สารละลาย trolox	11
3.2.4. สารละลาย l-ascorbic acid	11
3.2.5. สารละลาย caffeic acid	11
3.2.6. สารละลาย vanillic acid	11
3.2.7. สารละลาย quercetin	12
3.2.8. สารละลายตัวอย่าง	12
3.3 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	12
3.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	12
3.4.1 การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสม	12
3.4.2 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	13
3.4.2.1 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.2.2 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid	13
3.4.2.3 ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility)	13
3.4.2.4 ศึกษาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection)	14
3.4.2.5 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานตัวอื่นๆ	14
3.4.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	14
3.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิม	15
3.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นด้วยโปรแกรม ImageJ	16
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	19
4.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	19
4.2 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid, trolox, ascorbic acid และ caffeic acid	20
4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น	21
4.3.1. ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid	21
4.3.2. ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox	22
4.3.3. ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid	23
4.3.4 ศึกษาการวิเคราะห์ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน caffeic acid	24
4.3.5. ศึกษาการวิเคราะห์ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน vanillic acid	26
4.3.6. ศึกษาการวิเคราะห์ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin	27
4.4 ผลการศึกษาตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและวิธี DPPH แบบดั้งเดิม	29
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	31
ผลผลิต (output)	32
รายงานการเงิน	33
บรรณานุกรม	34
ประวัตินักวิจัย	37
ผลงานวิจัยที่ได้เผยแพร่	40

สารบัญภาพ

รูปภาพ	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงรูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ลงบนกระดาษ (A) แบบช่องการไหลด้านข้าง (lateral flow) (B) แบบหลุม (well)	8
รูปที่ 2.2 (A) แสดงรูปร่างของกระดาษกรองที่ตรึงด้วยสารรีเอเจนท์ (B) แสดงการใช้อุปกรณ์ microtiter plate ที่ทำงานร่วมกับกระดาษในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ gallic acid ด้วย DPPH assay	9
รูปที่ 2.3 แสดง กราฟมาตรฐานแสดงที่ได้จากการพล็อตความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีเรียที่เปลี่ยนไปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid (GA) และ, epigallocatechin gallate (EGCG)	9
รูปที่ 3.1 แสดงการเตรียมกระดาษกรองและแผ่นพลาสติกเคลือบสำหรับสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธีการเคลือบ (lamination)	12
รูปที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	12
รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการหดยาสารละลายที่ใช้เป็น blank และสารตัวอย่างที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	15
รูปที่ 4.1(A) รูปแสดงความเข้มข้นของ DPPH (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ DPPH กับความเข้มข้นที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (n=3)	19
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ DPPH กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (A). gallic acid, (B) trolox, (C) ascorbic acid, (D) caffeic acid	20
รูปที่ 4.3 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid	21
รูปที่ 4.4 (A) รูปแสดงการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก (B) กราฟพล็อตระหว่างความเข้มข้นกับความเข้มข้นของ gallic acid (n=3)	21
รูปที่ 4.5 โครงสร้างทางเคมีของ trolox	22
รูปที่ 4.6 (A) รูปแสดงผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ trolox (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ DPPH ที่ลดลง กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox (n=3)	23

สารบัญญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.7 โครงสร้างเคมีของ ascorbic acid	23
รูปที่ 4.8 (A) รูปแสดงผลความเข้มสีที่ลดลงในการทำปฏิกิริยาของ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid กับความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลง (n=3)	24
รูปที่ 4.9 โครงสร้างทางเคมีของ caffeic acid	25
รูปที่ 4.10 (A) รูปแสดงผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid (B) กราฟแสดงความเข้มสี DPPH ที่ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid (n=3)	25
รูปที่ 4.11 แสดงโครงสร้างเคมีของ vanillic acid	26
รูปที่ 4.12 (A) รูปแสดงความเข้มสีของ DPPH ลดลงด้วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ Vanillic acid กับความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลง (n=3)	27
รูปที่ 4.13 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ quercetin	28
รูปที่ 4.14 (A) รูปแสดงความเข้มสี DPPH จากการทำปฏิกิริยากับ quercetin (B) กราฟแสดงความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงต่อความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin (n=3)	28
รูปที่ 4.15 กราฟที่พลอตระหว่าง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g TEA}$ ของการวิเคราะห์ห่า Sample 1-7 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธีดั้งเดิม (spectrophotometric assay)	30

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสารที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูงเกิดได้จากทั้งกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและมลพิษต่างๆ เช่น โอโซน โลหะหนัก คาร์บอนพรี เมื่ออยู่ในร่างกายสามารถทำลายชีวโมเลกุลที่เข้าอย่างต่อเนื่องกันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทำให้เกิดความเสียหายแก่โมเลกุลที่ได้รับผลกระทบ เช่น ความเสียหายของ DNA ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคความจำเสื่อม เป็นต้น นอกจากนี้เมื่ออยู่ในอาหาร อนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันส่งผลให้อาหารเน่าเสียได้ง่าย สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีความสำคัญต่อการยับยั้งการปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระโดยเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระทำให้ลดความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากลายเป็นโมเลกุลที่เสถียรในที่สุด โดยปกติแล้วในร่างกายคนจะมีระบบต้านอนุมูลอิสระอยู่ แต่หากบุคคลนั้นอยู่ในพื้นที่เสี่ยงที่ทำให้เกิดการผลิตอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายมากจนทำให้ระบบการมีอนุมูลอิสระและการต้านอนุมูลอิสระไม่สมดุลขั้นรุนแรง (serious imbalance) จะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งนำมาสู่โรคต่างๆตามที่กล่าวมาแล้ว ในกรณีนี้ผู้ที่อยู่ในภาวะเสี่ยงจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกเข้าไปด้วยเป็นประจำ สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพร นอกจากนี้จะช่วยยับยั้งการเกิดโรคในคนแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระยังมีส่วนสำคัญในด้านเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย โดยสารต้านอนุมูลอิสระถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหารเพื่อให้อาหารส่งออกไปไม่เน่าเสียก่อนถึงมือผู้บริโภคทั้งที่อยู่ในที่ห่างไกลทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพิ่มความเชื่อมั่นต่อผู้บริโภคเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารที่มาจากประเทศไทย

ด้วยความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระดังที่กล่าวมาแล้ว ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจากทั้งภาคส่วนวิจัยและองค์กรที่เกี่ยวข้องกับอาหารและยา เพื่อให้ทราบและเป็นแหล่งข้อมูลแก่ผู้บริโภคเพื่อส่งเสริมการรักษาสุขภาพเป็นข้อมูลแก่ภาคส่วนอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการผลิตยารักษาโรครวมถึงด้านเศรษฐกิจเพื่อการส่งออกอาหาร

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ถูกพัฒนาขึ้นมาหลากหลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธี Total radical trapping (TRAP) (Mulholland & Strain, 1991), วิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS•+) (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, & Milner, 1993; Van Hung, Maeda, Miyatake, & Morita, 2009), วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie & Strain, 1996), วิธี oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) (Cao, Verdon, Wu, Wang, & Prior, 1995), วิธี cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) (Apak, Güçlü, Özyürek, & Karademir, 2004), วิธี electrochemical estimation of total reducing capacity (Chevion, Roberts, & Chevion, 2000), และวิธีดีพีพีเอช 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) assay (Bortolomeazzi, Verardo, Liessi, & Callea, 2010; Cheng, Moore, & Yu, 2006; Katsube et al., 2004) ในบรรดาวิธีเหล่านี้ วิธี DPPH เป็นวิธีที่นำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่าง

กว้างขวาง เนื่องจากมีวิธีวิเคราะห์ที่ง่าย DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร จึงให้การวิเคราะห์ที่แม่นยำ ปฏิบัติการที่ใช้ในการวิเคราะห์ก็เป็นปฏิบัติการที่ง่าย ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับตัว DPPH เองและสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเท่านั้น

วิธีการวิเคราะห์ที่ปฏิบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay แบบดั้งเดิมทำได้โดยวัดการลดลงของสีม่วงของ DPPH radicals ภายหลังจากที่ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร โดยปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทั้งสารตัวอย่างและสารละลายรวมประมาณ 10 mL ต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่าง และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาประมาณ 30 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง วิธีวิเคราะห์ที่ทนทานบวกกับการใช้สารเคมีปริมาณมากต่อหนึ่งตัวอย่างจึงไม่เหมาะกับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่มีอยู่ปริมาณมากได้ทำให้เกิดความล่าช้าในการศึกษา หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ให้เป็นแบบคัดกรอง (high-throughput screening) และการวิเคราะห์แบบรู้ผลเร็ว (high-throughput analysis) ด้วยการวิเคราะห์บนถาดหลุม (96 well microtiter plate) โดยผสม DPPH และตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระบนหลุมโดยให้การวิเคราะห์หนึ่งหลุมสำหรับหนึ่งตัวอย่าง จากนั้นวัดสีม่วงของ DPPH radicals ที่ลดลง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader spectrophotometer วิธีดังกล่าวสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่างในคราวเดียวกันสามารถอ่านผลได้พร้อมกัน ทำให้เพิ่มขีดความสามารถที่จะได้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระได้รวดเร็วขึ้นมาก อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่เนื่องจากจำเป็นต้องใช้เครื่อง microplate reader spectrophotometer ที่มีราคาแพง เป็นเครื่องมือเฉพาะที่ไม่ได้มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป ผู้ใช้จำเป็นต้องมีความรู้เกี่ยวกับการใช้เครื่องและซอฟต์แวร์การใช้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถ:

- (i) ทดสอบตัวอย่างได้หลายๆตัวอย่างในคราวเดียวกันทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ high throughput screening และ high throughput analysis
- (ii) ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย
- (iii) มีเวลาในการวิเคราะห์รวดเร็ว
- (iv) มีค่าการวิเคราะห์ถูก
- (v) พกพาไปตรวจวัดภาคสนามได้
- (vi) ไม่จำเป็นต้องพึ่งพาเครื่องมือราคาแพงในการตรวจวัดสัญญาณ

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวข้างต้น โครงการวิจัยนี้จะพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper based device) ให้ทำงานร่วมกับ DPPH assay เพื่อการวิเคราะห์ที่ปฏิบัติต้านอนุมูลอิสระในส่วนสกัดของตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สนใจ โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีข้อดีกว่าวิธีวิเคราะห์แบบใช้ microtiter plate ดังนี้

1. วิธีและวัสดุหลักที่ใช้ทำอุปกรณ์ตรวจวัดคือกระดาษมีราคาถูก ทำให้ประหยัดค่าในการสร้างอุปกรณ์ (มีราคา < 1 บาทต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่างสำหรับค่าอุปกรณ์)

2. อุปกรณ์ตรวจวัดใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนท์ในการน้อยในระดับสิบไมโครลิตร ดังนั้นจึงประหยัดปริมาณตัวอย่างส่วนสกัดและรีเอเจนท์ DPPH ทำให้ลดราคาในการวิเคราะห์ลงไปอีก และยังลดของเสียที่เกิดจากการวิเคราะห์ได้ด้วย
3. อุปกรณ์ตรวจวัดสามารถออกแบบให้มีลักษณะคล้าย microtiter plate สามารถวิเคราะห์หลายตัวอย่างได้ในคราวเดียวกัน
4. อุปกรณ์สามารถออกแบบให้ใช้ง่ายและพร้อมใช้ (ready to use) โดยผู้ใช้งานเพียงแค่เติมสารตัวอย่างลงไปก็สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้
5. การตรวจวัดสีที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์แบบกระดาษไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง เช่น spectrophotometer แต่สามารถตรวจวัดได้โดยการถ่ายภาพและประมวลผลภาพโดยใช้โปรแกรมฟรีดาวน์โหลด imageJ จาก the US National Institute of Health
6. อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีน้ำหนักเบาและขนาดเล็กสามารถพกพาและทำการตรวจวัดภาคสนามได้

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยการวิเคราะห์บนสามารถทำได้โดยหยดสาร DPPH ลงบนกระดาษที่ได้สร้างส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำให้มีลักษณะเป็นหลุม จากนั้นหยดตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะทำให้สีม่วงของ DPPH radicals ลดลง ความเข้มสีม่วงที่ลดลงสามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมประมวลผลภาพ จากวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวจะเห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถใช้ง่าย ดังนั้นอุปกรณ์ชนิดนี้มีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ โดยจะออกแบบให้อุปกรณ์สามารถทดสอบตัวอย่างได้ที่ละหลายๆตัวอย่าง เป็นอุปกรณ์พร้อมใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่สนใจ ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือราคาแพงในการตรวจวัด สัญญาณที่เกิดขึ้นของการวิเคราะห์ที่ใช้ง่ายโดยที่ผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องเข้ารับการฝึกอบรม อุปกรณ์มีราคาถูก ให้การวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ สามารถให้ผลการตรวจวัดที่ละเอียด ใช้สารตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. พัฒนารูปแบบ DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (gallic acid , trolox, L-ascorbic acid, caffeic acid, vanillic acid และ quercetin) และตัวอย่างชาได้โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สภาวะที่ศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของ DPPH เริ่มต้นที่เหมาะสม เวลาใน

การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระที่เหมาะสม โดยสมภาวะที่ดีจะต้องสามารถตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้รวดเร็ว แม่นยำ มีความไวสูง และมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่รวดเร็ว

4.ทดสอบประสิทธิภาพของวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นด้วยสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยหาค่าการวิเคราะห์ให้ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ค่าการทำซ้ำ (reproducibility, %RSD) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection)

5.เปรียบเทียบประสิทธิภาพความสามารถในการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารระหว่างวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นกับวิธี DPPH แบบดั้งเดิมโดยใช้ตัวอย่างใบชาแห้งและชาซองซอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

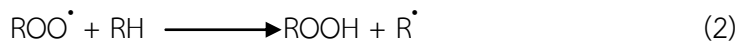
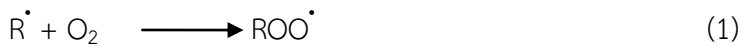
วิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถตรวจวัดคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นประโยชน์แก่หน่วยงานที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ

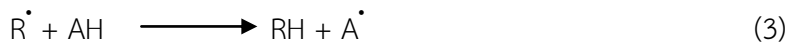
บุหรัน พันธุ์สุวรรณ (พันธุ์สุวรรณ, 2556) ได้กล่าวถึงอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระไว้ดังนี้ อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสี ultraviolet มลพิษในอากาศ โลหะหนัก อาหารประเภททอด ปิ้งย่าง และเกิดจากกระบวนการเผาผลาญในร่างกาย หรือจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่ อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลาตั้งสมการ 1 และ 2



($R \cdot$ และ $RO \cdot$ คือ อนุมูลอิสระ)

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), hydrogen peroxide, โลหะทรานซิชัน, carbonate radical เป็นต้น นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภททั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา โรคหัวใจขาดเลือด โรคมะเร็ง โรคความจำเสื่อม โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิต โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง โรคกล้ามเนื้ออักเสบ และความผิดปกติของปอดและระบบประสาท เป็นต้น อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วยังสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ เป็นต้น จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันทูหรือแก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้ซ้ำ การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียมไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง จากยาบางชนิด

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระตั้งสมการ 3 และ 4



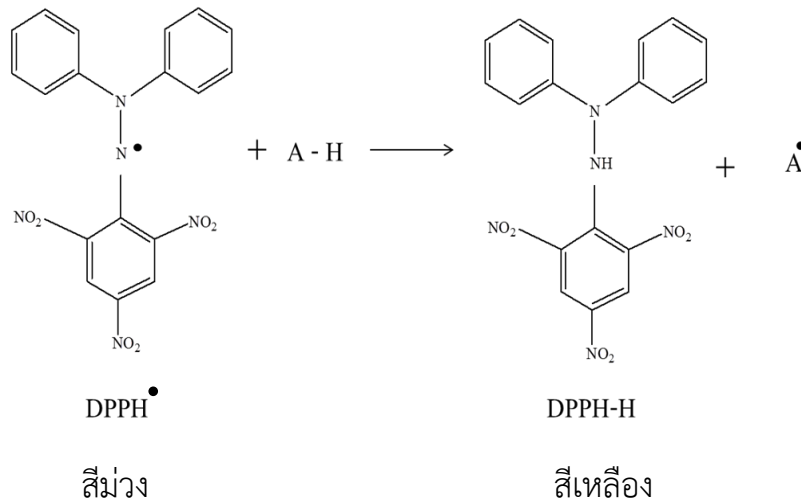
(R[·] และ RO[·] คืออนุมูลอิสระ และ AH คือสารต้านอนุมูลอิสระ)

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

ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น vitamin C (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไฮโดรลาซิม) vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และ glutathione (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไฮโดรลาซิมและเมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอ็นไซม์ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอ็นไซม์ superoxid dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน O₂^{·-} เป็น H₂O₂ สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล นอกจากนี้อีกส่วนได้จากสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายรับประทานเข้าไปจำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวได้จากพืชผักและผลไม้ ตัวอย่างอาหารที่มีเบต้าแคโรทีนสูง ได้แก่ ผักใบเขียว เช่น ตำลึง และผักบุ้ง อาหารที่มีซีลีเนียม เช่น แครอท มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ พริกทอง อาหารที่มีวิตามินซี (vitamin C หรือ ascorbic acid) สูง ได้แก่ พืช ผักสีเขียว และผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ตำลึง ผักบุ้ง พริกหยวก ฝรั่ง มะขามป้อม ส้ม มะนาว สับปะรด (วิตามินซีจากพืชผักดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระที่แรงมากและละลายน้ำได้ดี) วิตามินอี (vitamin E หรือ tocopherol) ละลายได้ดีในน้ำมัน โดยวิตามินอีมีในน้ำมันจากเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ เช่น รำละเอียดในพวกธัญพืชที่ไม่ขัดขาว ข้าวโพด ข้าวกล้อง ถั่วแดง ถั่วเหลือง ผักกาดหอม เมล็ดทานตะวัน งา น้ำมันรำ

2.2 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้อนุมูลอิสระดีฟิพีเอช (DPPH[·], diphenylpicrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 - 520 นาโนเมตร (Kedare & Singh, 2011) เมื่อ DPPH[·] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (สารที่ให้อิเล็กตรอน) DPPH จะกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ซึ่งจะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ดังสมการที่ 5



สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ Gallic acid แสดงค่าเป็น GAE (gallic acid equivalent)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจากการวิเคราะห์เกี่ยวข้องกับรีเอเจนต์เพียงตัวเดียวคือ DPPH

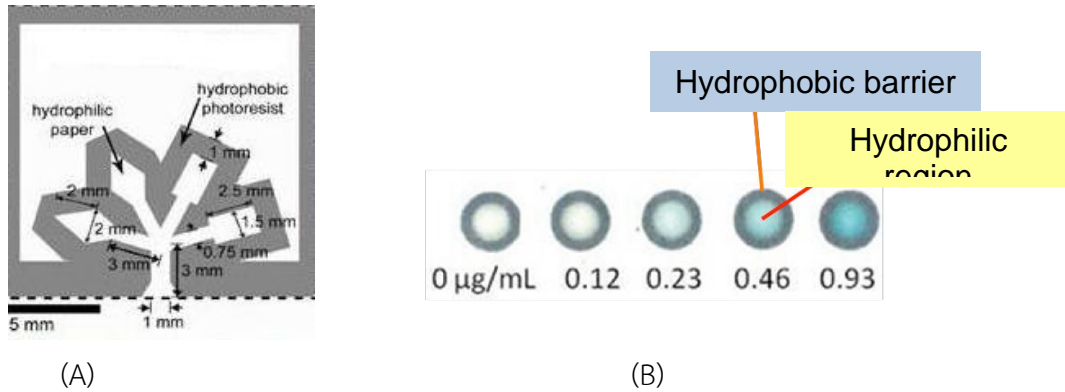
ข้อเสีย คือ DPPH[•] ค่อนข้างเสถียรไม่วางต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง

2.3 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based device)

อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษ (microfluidic paper-based analytical device, μ PADs) เป็นเทคโนโลยีทางเลือกหนึ่งของการสร้างอุปกรณ์ที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ พกพาได้ สามารถใช้แล้วทิ้งสำหรับใช้ในประเทศกำลังพัฒนา (Martinez, Phillips, Butte, & Whitesides, 2007) การผลิตอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษทำได้โดยสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ตามรูปแบบที่ต้องการลงบนกระดาษ โดยได้สร้างส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำลงบนกระดาษ ทำให้เกิดเป็นบริเวณที่ชอบน้ำ (hydrophilic region) สำหรับใช้ทดสอบ พบว่าอุปกรณ์ชนิดนี้มีต้นทุนราคาถูก สร้างได้ง่าย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในการวิเคราะห์น้อย

สามารถสร้างส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษให้เป็นลวดลายต่างๆได้ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การฉายแสง (photolithography) (Martinez et al., 2007) การพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) (Carrilho, Martinez, & Whitesides, 2009) การวาดด้วยปากกาคันน้ำ (permanent marker plotting) (Nie et al., 2012) การสกรีนด้วยขี้ผึ้ง (wax screen-printing) (Dungchai, Chailapakul, & Henry, 2011) และการใช้มีดตัด (cutting knives) (Fenton, Mascarenas, López, & Sibbett, 2008) เป็นต้น รูปแบบลวดลายของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีอยู่สองแบบ ได้แก่ แบบช่องการไหลด้านข้าง (lateral flow) ดังภาพที่ 2-1 (A) ซึ่งสารตัวอย่างสามารถไหลไปบนแผ่นกระดาษในท่อการไหลด้วยแรงแคปิลลารี (capillary action) เรียงตามเยื่อกระดาษไปยังบริเวณตรวจวัด (test zone) แล้วเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับรีเอเจนต์ (Martinez et al., 2007) และแบบหลุม (well) ดังภาพที่ 2-1 (B) (Jokerst et al., 2012) วิเคราะห์ได้โดยการนำสารตัวอย่างผสมกับรีเอเจนต์หยดลงไปบริเวณที่ชอบน้ำของกระดาษ การ

วิเคราะห์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารตัวอย่างกับรีเอเจนท์ สามารถทำได้โดยการถ่ายภาพ จากนั้นนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ แล้ววัดค่าความเข้มสี ซึ่งค่าความเข้มสีจะแปรผันตรงกับปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง

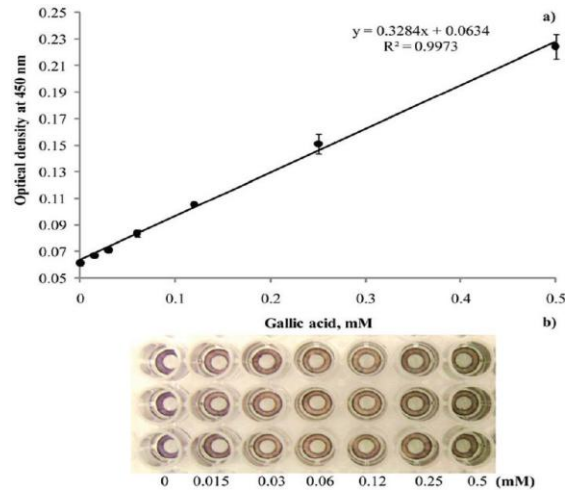
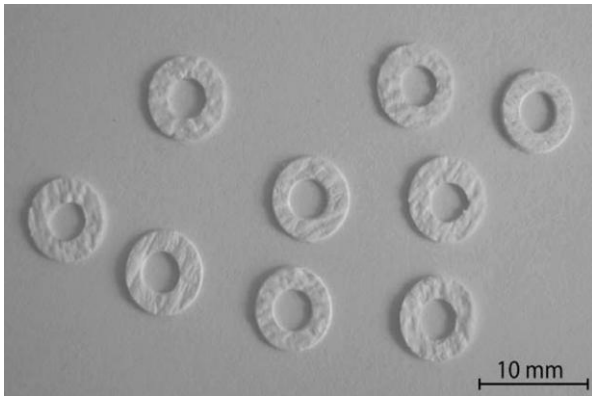


รูปที่ 2.1 แสดงรูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ลงบนกระดาษ (A) แบบช่องการไหลด้านข้าง (lateral flow) (Martinez et al., 2007) (B) แบบหลุม (well) (Jokerst et al., 2012)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Fenton และคณะ (2008) (Fenton et al., 2008) ได้สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษรูปแบบช่องการไหลด้านข้างใช้สำหรับวิเคราะห์สารชีวภาพที่หลากหลาย โดยสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธีการตัดด้วยเครื่องตัดอัตโนมัติ (craft cutting machine) เคลือบกระดาษด้วยพลาสติกใส (lamination) ซึ่งอุปกรณ์ที่สร้างมีข้อดีได้แก่ ช่วยลดการระเหยของรีเอเจนท์ ช่วยป้องกันไม่ให้พื้นผิวที่จะทำการทดสอบปนเปื้อนและไม่ให้สารตัวอย่างและรีเอเจนท์รั่วออกจากอุปกรณ์ มีราคาถูก เหมาะสำหรับไปใช้ในประเทศที่กำลังพัฒนา

Piletska และคณะ (2012) (Piletska, Piletsky, Whitcombe, Chianella, & Piletsky, 2012) ได้พัฒนารูปแบบใหม่ของ microtiter Plate สำหรับตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ วิธีวิเคราะห์ทำโดยตัดกระดาษกรองให้เป็นวงดังรูปที่ 2.2(A) แล้วนำไปจุ่มในรีเอเจนต์ DPPH ทำให้แห้งแล้ววิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาด้วย microtiter plate readers โดยไม่มีขั้นตอนอื่นๆเพิ่มเติม แนวคิดดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ได้หลากหลาย เช่น การตรวจสอบสารบ่งชี้ชีวภาพชนิดต่างๆโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเอนไซม์ เช่น การวิเคราะห์กลูโคสและกรดยูริก การตรวจสอบโปรตีน การวิเคราะห์ค่า pH และการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายโดยมีเพียงขั้นตอนการเติมสารและขั้นตอนการตรวจวัด จึงทำให้สามารถตรวจวัดสารตัวอย่างได้รวดเร็วเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ทางการแพทย์ที่ต้องวิเคราะห์สารหลายๆอย่างในคราวเดียวกัน อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวจำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการ (laboratory based analysis) เนื่องจากเครื่อง microplate reader เป็นเครื่องมือที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถพกพาไปตรวจวัดภาคสนามได้

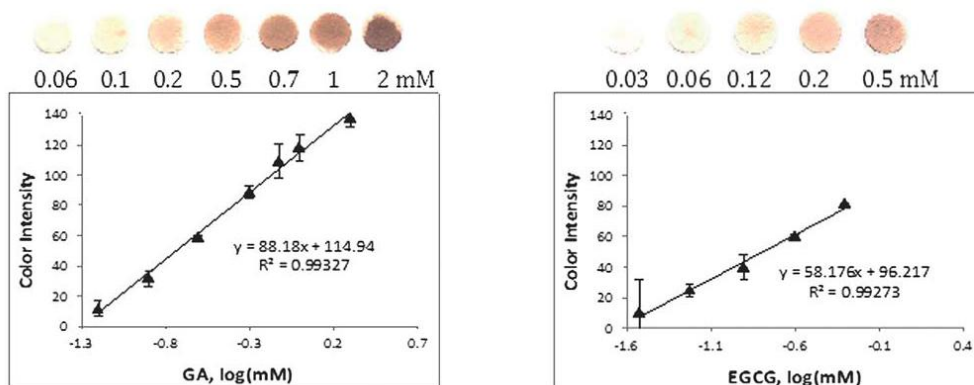


(A)

(B)

รูปที่ 2.2 (A) แสดงรูปร่างของกระดาษกรองที่ตรึงด้วยสารรีเอเจนท์ (B) แสดงการใช้อุปกรณ์ microtiter plate ที่ทำงานร่วมกับกระดาษในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ gallic acid ด้วย DPPH assay

Sharpe และคณะ (2012) (Sharpe, Frasco, Andreescu, & Andreescu, 2013) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจสอบแบบพกพาสำหรับวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอาหารโดยใช้การตรึงอนุภาคนาโนซีเรีย (CeO₂) ไว้ที่กระดาษซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับเซ็นเซอร์ขนาดเล็ก อุปกรณ์ดังกล่าววิเคราะห์ได้โดยวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีเรียซึ่งจะเปลี่ยนจากสีเหลืองกลายเป็นสีน้ำตาล อุปกรณ์แบบพกพาดังกล่าวนำไปวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ascorbic acid, gallic acid, vanillic acid, quercetin, caffeic acid, epigallocatechin gallate และได้นำไปวิเคราะห์กับสารตัวอย่างจริง ได้แก่ ชาและเห็ด ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถทดสอบได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงเนื่องจากมีการใช้โปรแกรมประมวลผลภาพแทน microplatereader spectrophotometer จึงมีศักยภาพในการวิเคราะห์ในสถานที่อื่นนอกเหนือจากห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 2.3 แสดง กราฟมาตรฐานแสดงที่ได้จากการพล็อตความเข้มสีของอนุภาคนาโนซีเรียที่เปลี่ยนไปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid (GA) และ, epigallocatechin gallate (EGCG)

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 (Whatman, USA)
2. พลาสติกเคลือบบัตร ขนาด A4 216 mm x 303 mm 100 μm
3. ไมโครปิเปต ขนาด 10, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร
4. มีดคัตเตอร์
5. กรรไกร
6. ที่เจาะกระดาษแบบรูเดียวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm
7. เครื่องเคลือบบัตร
8. ขวดสีชาขนาด 5 มิลลิลิตร
9. ปีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
10. ปิเปตทิบสำหรับไมโครปิเปตขนาด 10, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร
11. เครื่องสแกน (Canon Scan LiDE 110 Manual)
12. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

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. vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) (M.W. 168.14 g/mol, Fluka CAS 121-34-6)
4. caffeic acid (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid) (M.W. 180.16 g/mol, Sigma Aldrich CAS 331-39-5)
5. 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)
6. 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)
7. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (M.W. 394.32 g/mol, Sigma Aldrich CAS 1898-66-4)
8. เมทานอล (Methanol) (M.W. 32.04 g/mol) (Sigma Aldrich CAS 67-56-1)

3.1 3 สารตัวอย่างในการทดลอง

ใบชาแห้ง และชาซอง จำนวน 7 ยี่ห้อ

1. ชาเขียวกู่หลาน
2. ชาเขียวบ้านไร่ 5 ดาว (มะลิ)
3. ชาเขียวบ้านไร่ 5 ดาว
4. ชาอู่หลง
5. ชา minute
6. ชาเขียวดอยแม่สลอง
- 7.

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

3.2.1. สารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

เตรียม stock DPPH ความเข้มข้น 6.590 mM ปริมาตร 1mL โดยชั่ง DPPH 0.0026 g ละลายในเมทานอล 1 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 mM ด้วยเมทานอล

3.2.2. สารละลาย gallic acid

เตรียม stock Gallic acid ความเข้มข้น 3821 μ M ปริมาตร 2 mL โดยชั่ง Gallic acid 0.0013 g ละลายในเมทานอล 2 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 1000 μ M ด้วยเมทานอลเป็นสารละลาย intermediate จากนั้นเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้สารละลาย Gallic acid ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 และ 600 μ M

3.2.3. สารละลาย trolox

เตรียม stock Trolox ความเข้มข้น 5194 μ M ปริมาตร 2 mL โดยชั่ง trolox 0.0026 g ละลายในเมทานอล 2 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 1500 μ M ด้วยเมทานอลเป็นสารละลาย intermediate จากนั้นเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้สารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 และ 1500 μ M

3.2.4. สารละลาย l-ascorbic acid

เตรียม stock L-ascorbic acid ความเข้มข้น 15898 μ M ปริมาตร 1 mL โดยชั่ง L-ascorbic acid 0.0028 g ละลายในเมทานอล 1 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 1500 μ M ด้วยเมทานอล เป็นสารละลาย intermediate จากนั้นเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้สารละลาย ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1100, 1200, 1300, 1400 และ 1500 μ M

3.2.5. สารละลาย caffeic acid

เตรียม stock caffeic acid ความเข้มข้น 4718 μ M ปริมาตร 2 mL โดยชั่ง caffeic acid 0.0017 g ละลายในเมทานอล 2 mL แล้วเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 1500 μ M ด้วยเมทานอลเป็นสารละลาย intermediate จากนั้นเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้สารละลาย caffeic acid ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 และ 1500 μ M

3.2.6. สารละลาย vanillic acid

เตรียม stock Vanillic acid ความเข้มข้น 143 mM ปริมาตร 2 mL โดยชั่ง vanillic acid 0.0211 g ละลายในเมทานอล 2 mL เป็นสารละลาย intermediate จากนั้นเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้สารละลาย vanillic acid 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, และ 100 mM

3.2.7. สารละลาย quercetin

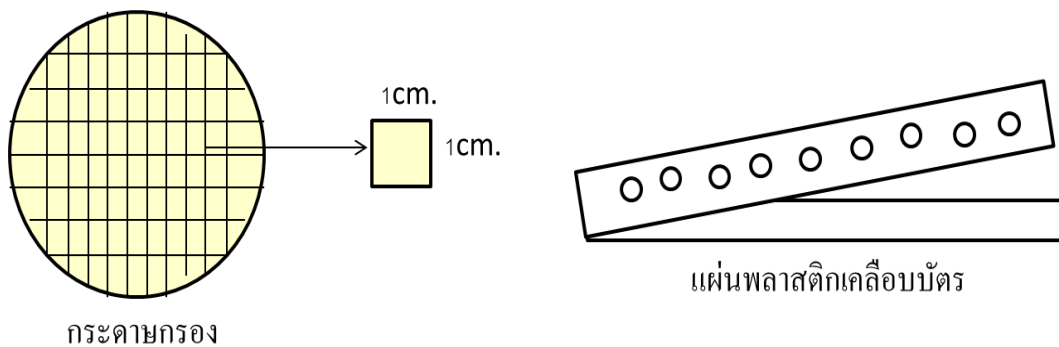
เตรียม stock quercetin ความเข้มข้น 3805 μM ปริมาตร 2 mL โดยชั่ง quercetin 0.0023 g ละลายในเมทานอล 2 mL เป็นสารละลาย intermediate จากนั้นเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้สารละลาย quercetin ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 μM

3.2.8. สารละลายตัวอย่าง

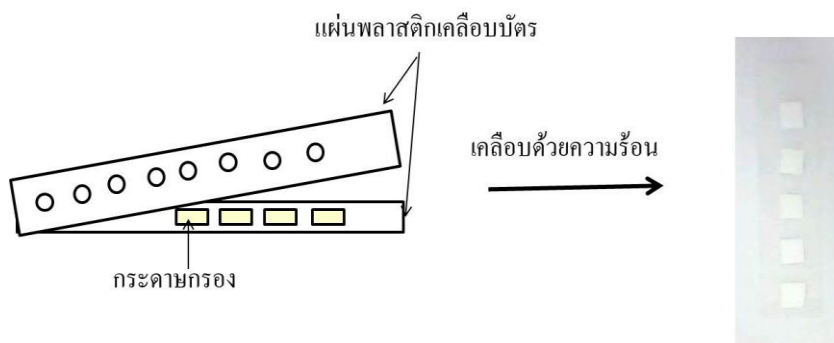
การวิเคราะห์ตัวอย่างชาผงสำหรับชง เตรียมตัวอย่างโดยชั่งชา 2 กรัม แล้วเติมน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และหากสารละลายตัวอย่างชามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากเกินไปจะต้องทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

3.3 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษจะสร้างบริเวณส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ด้วยการตัดและเคลือบด้วยพลาสติก มีขั้นตอนการสร้างโดยเตรียมกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ตัดให้ขนาด 1 cm. x 1 cm. เตรียมพลาสติกเคลือบด้วยที่ใช้เจาะกระดาษเจาะแผ่นพลาสติกด้านบนมีลักษณะเป็นวงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm. ดังรูปที่ 3.1 หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่เตรียมไว้ มาจัดเรียงบริเวณพลาสติกที่เป็นรูแล้วเข้าเครื่องเคลือบด้วยรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.1 แสดงการเตรียมกระดาษกรองและแผ่นพลาสติกเคลือบด้วยสำหรับสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธีการเคลือบ (lamination)



รูปที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.4.1 การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 mM แล้วหยดสารละลาย DPPH ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยในแต่ละหลุมหยดปริมาตร 1.0 μL และในแต่ละความเข้มข้นหยดจำนวน 5 หลุม จากนั้นสแกนแล้วนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดความเข้มของสีม่วงที่เกิดขึ้น จากนั้นนำค่าความเข้มสีมาสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งพลอตระหว่างความเข้มข้น DPPH และค่าความเข้มสี จากนั้นเลือกความเข้มข้น DPPH ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.4.2 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.4.2.1 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2 mM ในเมทานอล และเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0, 50 และ 100 μM ในเมทานอล ทำการทดสอบโดยหยดสารละลาย gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหลุมละ 1.0 μL ($n=5$) หลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH หลุมละ 1.0 μL จากนั้นสแกนภาพโดยสแกนทุกๆ 3 นาที เป็นเวลา 39 นาที นำภาพไปเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี แล้วพลอตกราฟระหว่างระยะเวลาและค่าความเข้มสี แล้วเลือกเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.4.2.2 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2.0 mM ในเมทานอล และเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 μM ในเมทานอล ทำการทดสอบโดยหยดสารละลาย gallic acid ความเข้มข้นต่างๆลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหลุมละ 1.0 μL ($n=5$) หลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH หลุมละ 1.0 μL วางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปสแกนภาพ นำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น gallic acid และค่าความเข้มสีเพื่อใช้สำหรับหาช่วงความเป็นเส้นตรงของ gallic acid

3.4.2.3 ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility)

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2.0 mM ในเมทานอล และเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 100, 250, 400 μM ในเมทานอลทำการทดสอบโดยหยดสารละลาย gallic acid ความเข้มข้นต่างๆลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหลุมละ 1.0 μL ($n=10$) หลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH หลุมละ 1.0 μL วางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปสแกนภาพ นำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี หลังจากนั้นคำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage of relative standard deviation, %RSD)

3.4.2.4 ศึกษาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection)

ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการวิเคราะห์ด้วย DPPH คือความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้สัญญาณของ DPPH ต่ำว่าสัญญาณเริ่มต้นเป็นสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์ นำค่าความเข้มข้นของการวิเคราะห์ 0 μM gallic acid (blank) ด้วยวิธี DPPH มาคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด gallic acid จากความสัมพันธ์

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

เมื่อ I_{LOD} คือค่าความเข้มข้นของ DPPH เมื่อเติม gallic acid ที่ความเข้มข้นระดับขีดจำกัดการตรวจวัด

I_0 คือค่าความเข้มข้นของ DPPH ที่ไม่ได้เติม gallic acid (blank)

SD_{blank} คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความเข้มข้นของ DPPH

การคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัด gallic acid

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

เมื่อ m และ c คือ ความชันและจุดตัดแกนในกราฟมาตรฐาน ตามลำดับ

X_{LOD} คือ ขีดจำกัดการตรวจวัด

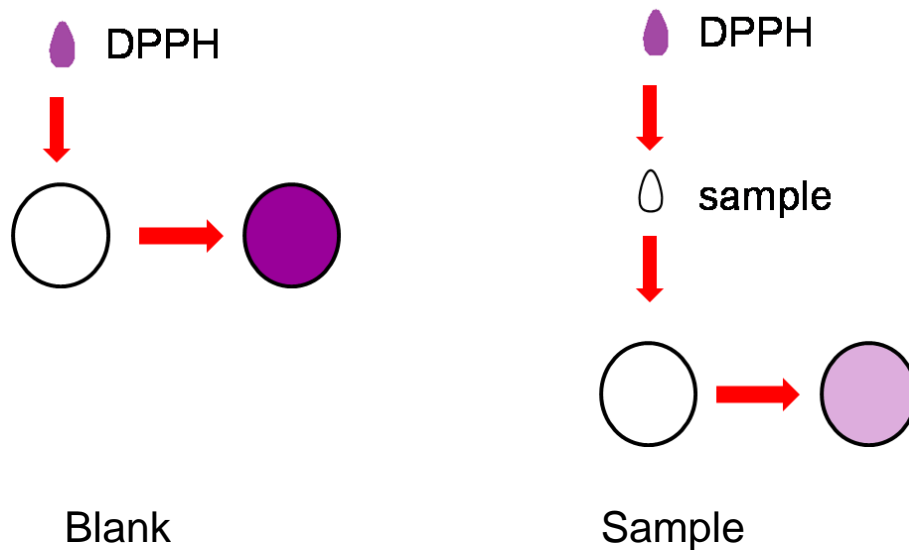
3.4.2.5 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานตัวอื่นๆ

ทำการศึกษาการวิเคราะห์ trolox, l-ascorbic acid, caffeic acid, vanillic acid และ quercetin คล้ายกับการศึกษา gallic acid

3.4.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐาน gallic acid โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2 mM ในเมทานอล และเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400, 600 μM ในเมทานอลเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid ทำการทดสอบโดยหยดสารละลาย Gallic acid ความเข้มข้นต่างๆลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหลุมละ 1.0 μL ($n=5$) หลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH หลุมละ 1.0 μL วางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปสแกนภาพ นำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ แล้วสร้างกราฟมาตรฐานพล็อตระหว่างค่าความเข้มข้น gallic acid และค่าความเข้มข้น

หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระตัวอย่างชา โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างตาม หัวข้อ 3.2.1 ข้อย่อยที่ 8 จากนั้นนำมาตรวจวัดบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ทำการทดสอบโดยหยดสารละลายตัวอย่างชาลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหลุมละ 1.0 μL ($n=5$) หลังจากนั้นหยดสารละลาย DPPH หลุมละ 1.0 μL วางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปสแกนภาพ วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยการตรวจวัดค่าความเข้มข้นเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid และคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า $\mu\text{mol gallic acid equivalent/g tea}$ ($\mu\text{molGAE/g tea}$)



รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการหยดสารละลายที่ใช้เป็น blank และสารตัวอย่างที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

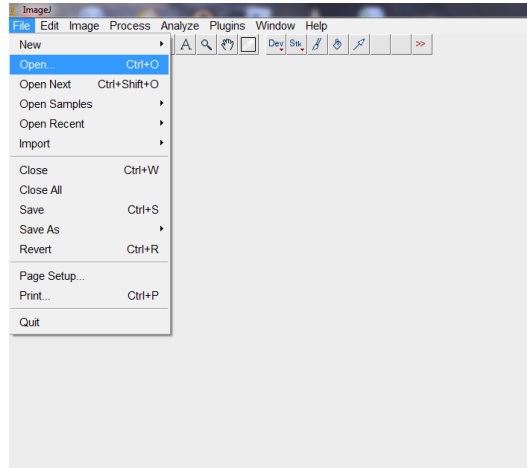
3.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิม

ศึกษาความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของ DPPH ในช่วง 500-520 nm พบว่า λ_{max} ของ DPPH คือ 515 nm จึงตั้งความยาวคลื่นของเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm อุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเซตแบลงค์ด้วยเมทานอล เตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300, 400, 600 μ M ในเมทานอลเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid โดยผสม DPPH ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 μ L กับสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 μ L และเมทานอล 3 mL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm

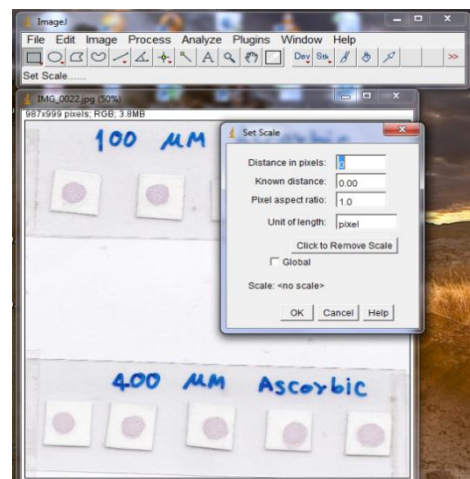
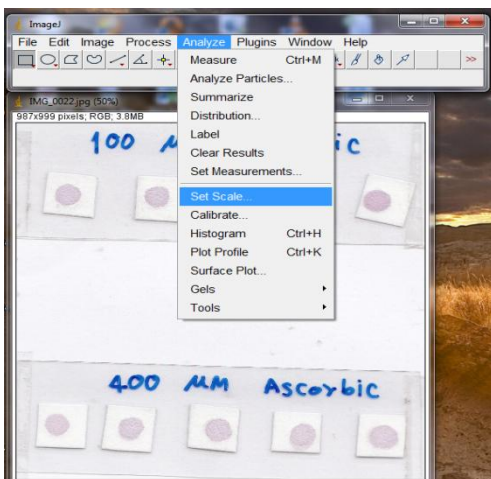
เตรียมสารละลายตัวอย่างชาปริมาตร 50 μ L โดยผสม DPPH ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 μ L และเมทานอล 3 mL รอให้เกิดปฏิกิริยาโดยการเก็บไว้ในที่มืด 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 515 nm วิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้กราฟมาตรฐานของ gallic acid และถ้าสารตัวอย่างที่วิเคราะห์วัดค่าได้นอกเหนือจากเส้นตรง ต้องนำสารละลายที่ได้มาเจือจางแล้ววัดค่าใหม่ รายงานผลการวิเคราะห์ในรูปของ μ mol gallic acid equivalent/g tea (μ molGAE/g tea)

3.6 การวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ

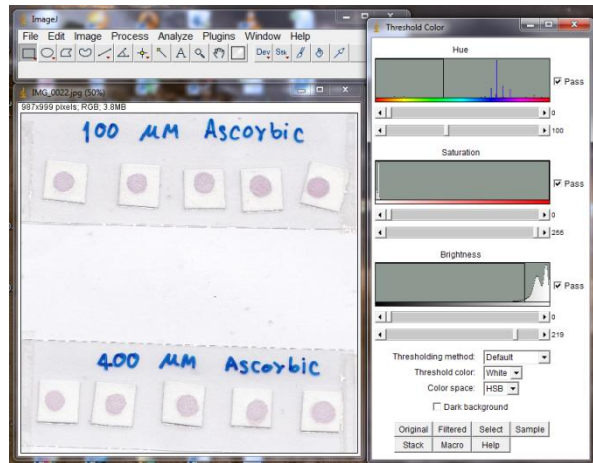
1. เปิดโปรแกรม ImageJ
2. เลือก open แล้วเลือกรูปที่ต้องการประมวลผล



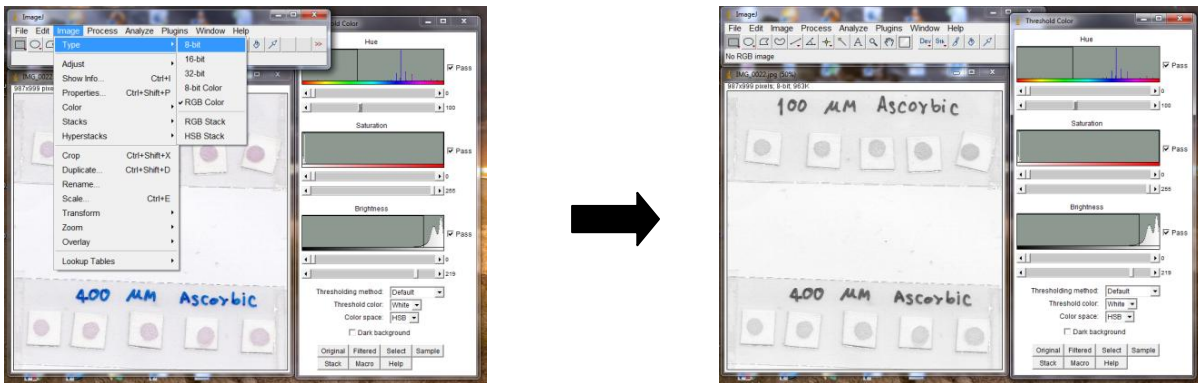
3. Set scale ของบริเวณที่ตรวจวัด



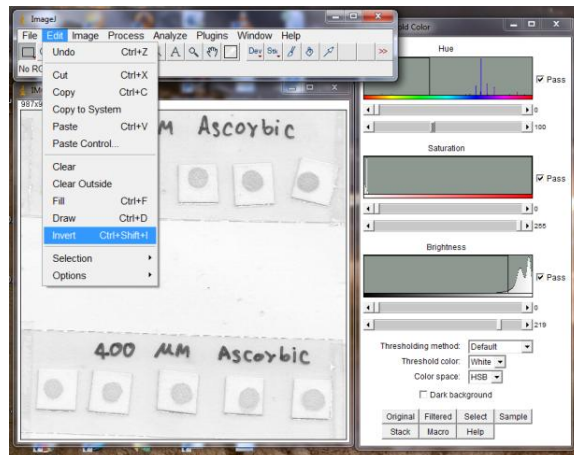
4. ปรับรูปให้เหลือเฉพาะสีที่ต้องการโดยไปที่ Image--> adjust-->color threshold จะปรากฏ box ขึ้นมาดังรูป เลือก pass ทั้งหมด เลือก Threshold color : White, Color space : HSB ปรับสีโดยเลื่อน scale บริเวณ Hue = 100



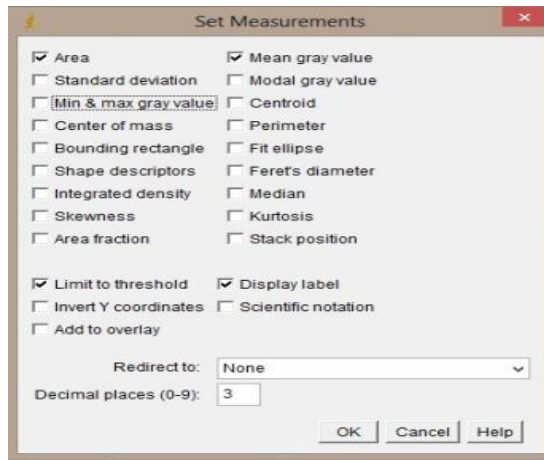
5. ปรับเป็นสี gray โดยไปที่ Image--> 8 bit



6. ปรับให้เป็น gray intensity โดยเลือก Edit--> invert



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



8. เลือกบริเวณที่ต้องการวัด intensity โดยเลือก shortcut ตามแบบรูปที่ต้องการจากนั้นลากกรอบบริเวณที่ต้องการวัด เมื่อได้บริเวณแล้วให้ไปที่ Analyze Measurement หรือใช้ Ctrl+M ได้เลย ค่าMean ที่ปรากฏคือค่า mean gray scale intensity ที่ได้จากการประมวลผลภาพ

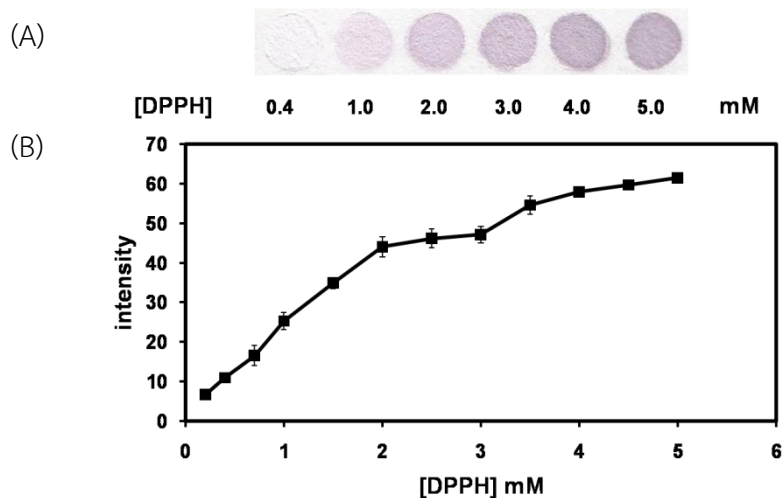


บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เนื่องจากวิธี DPPH เป็นวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างโดยวัดการลดลงของสัญญาณ DPPH ความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการศึกษา โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมคือความเข้มข้นที่ให้สัญญาณสูง และสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณได้อย่างรวดเร็วเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปเพียงเล็กน้อย ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระโดยการเตรียม DPPH ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-5 mM แล้วหยดลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่เตรียมไว้ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ทำการถ่ายภาพ และนำภาพถ่ายที่ได้เข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มสีของ DPPH และความเข้มข้นของ DPPH จะได้กราฟดังที่แสดงในรูปที่ 4.1

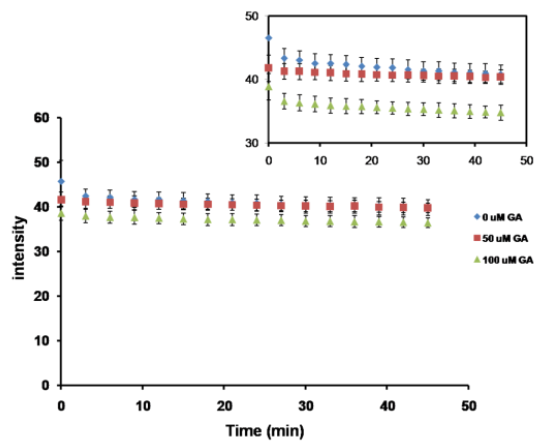


รูปที่ 4.1(A) รูปแสดงความเข้มสีของ DPPH (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ DPPH กับความเข้มสีที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (n=3)

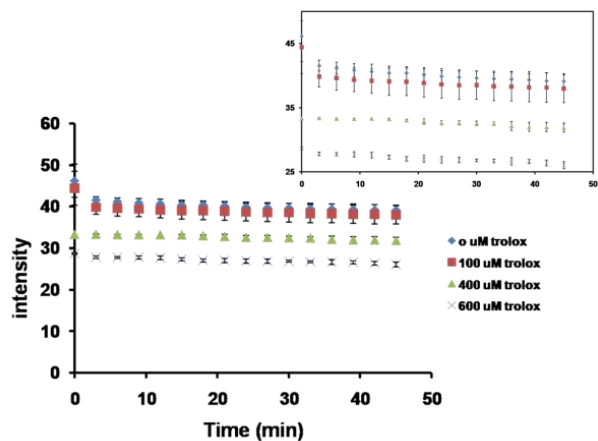
จากรูปที่ 4.1 (A) รูปแสดงความเข้มสีของ DPPH เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น DPPH ที่เพิ่มขึ้น (B) กราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและความเข้มสีของ DPPH พบว่าความเข้มสีของ DPPH เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ DPPH และสัญญาณเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ 2 mM ในการทดลองนี้จึงเลือก DPPH ที่มีความเข้มข้น 2000 μ M เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสามารถเห็นการลดลงของสัญญาณได้ชัดเจนเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปเพียงเล็กน้อย

4.2 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid, trolox, ascorbic acid และ caffeic acid

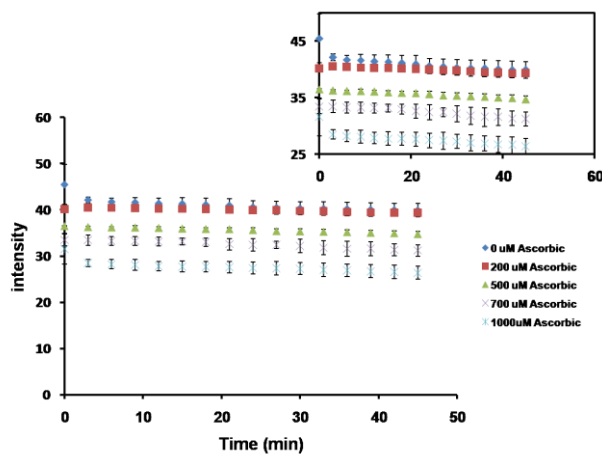
การศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid, trolox, ascorbic acid และ caffeic acid ทำได้โดยหยดสารตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ลงในอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษความเข้มข้นละ 1 μL หลังจากนั้นหยด DPPH ความเข้มข้น 2 μM ตามลงไป ปริมาณที่เท่ากันคือ 1 μL จากนั้นถ่ายภาพทุกๆ 3 นาที เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำภาพที่ได้มาเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อตรวจวัดความเข้มของสีจะได้กราฟดังแสดงในรูป 4.2 A ,B, C และ D



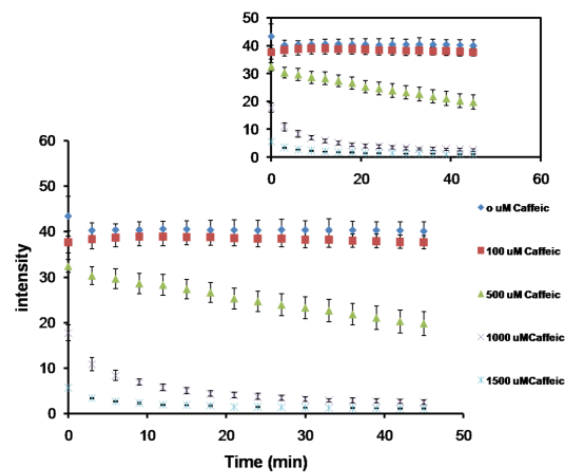
(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของ DPPH กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (A). gallic acid, (B) trolox, (C) ascorbic acid, (D) caffeic acid

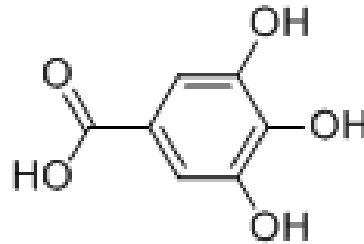
จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานมาตรฐาน gallic acid, trolox, ascorbic acid และ caffeic acid พบว่าความเข้มสีของ DPPH จะลดลงเมื่อเวลา

เพิ่มขึ้นจะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของ DPPH เริ่มมีค่าคงที่ที่เวลา 21 นาทีต่อเนื่องไปเรื่อยๆ แต่ในการทดลองนี้เลือกเวลาที่ 30 นาที มาใช้ในการทดลองเพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

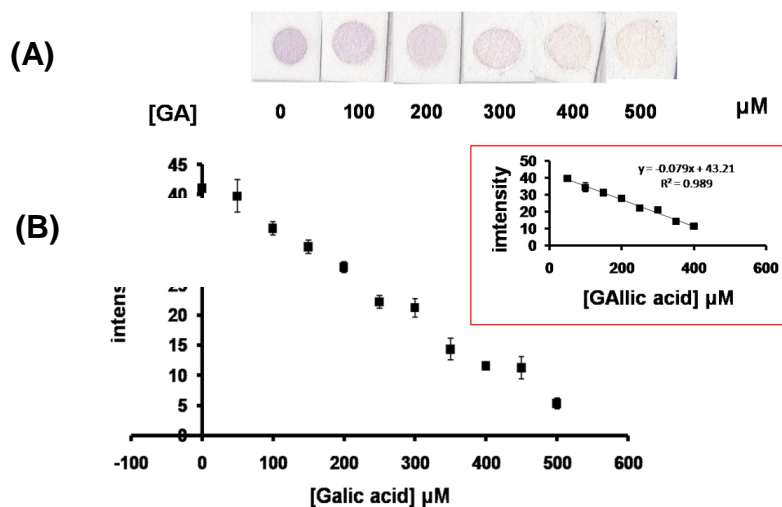
4.3.1. ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

gallic acid (3, 4, 5-hydroxybenzoic acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ โดย gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่น ๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี (Yen, Duh, & Tsai, 2002)



รูปที่ 4.3 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid (Li et al., 2005)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ gallic acid โดยเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 μM ทำปฏิกิริยากับ DPPH ความเข้มข้น 2 mM ได้ผลการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 4.4A แล้วสแกนภาพเพื่อนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวัดความเข้มสีที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิกและความเข้มสีดังแสดงในรูปที่ 4.4B พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ gallic acid เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ DPPH จะลดลงเรื่อยๆ จากกราฟดังกล่าวพบว่ามีความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50-400 μM , $R^2 = 0.989$

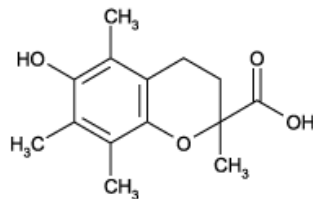


รูปที่ 4.4 (A) รูปแสดงการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก (B) กราฟพล็อตระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid (n=3)

ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของ gallic acid ในช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 100, 250, 400 μM พบว่า ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) เท่ากับ 6.74, 8.52 และ 16.76 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าดังกล่าวพบว่าการตรวจวัดสารมาตรฐาน gallic acid ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงและสามารถทำซ้ำได้ ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดของการวิเคราะห์ gallic acid โดยวัดค่าแบลงค์ของการวิเคราะห์ gallic acid จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของ gallic acid ที่ต่ำที่สุดที่ทำให้สัญญาณของแบลงค์ลดลงเป็นสามเท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์ ($n=3$) เท่ากับได้ค่า LOD เท่ากับ 37 μM

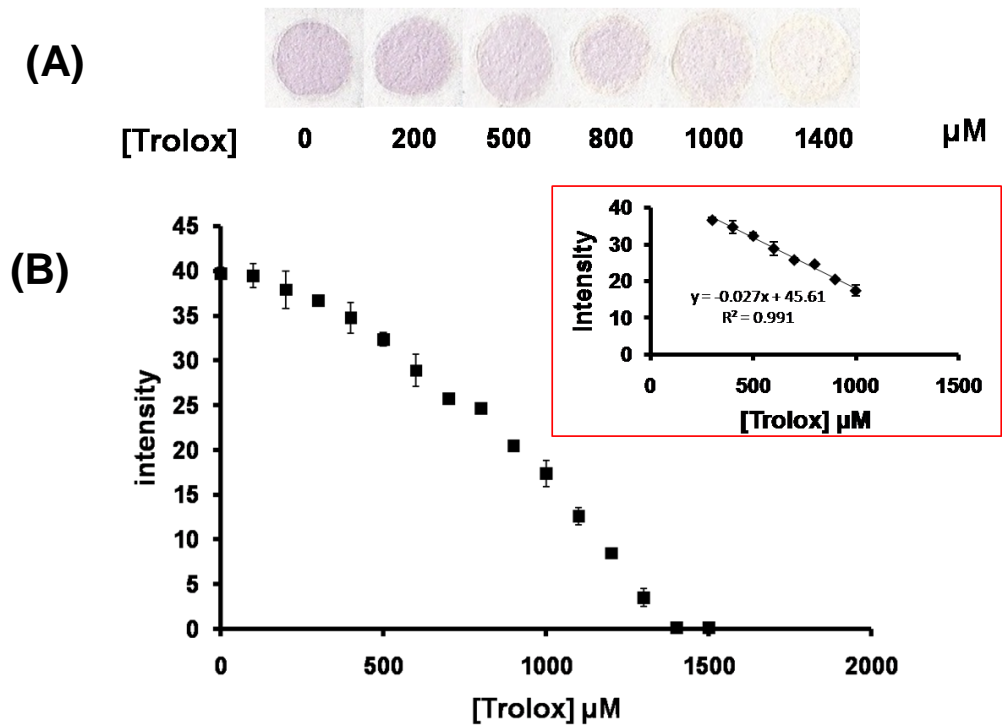
4.3.2. ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดีจึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินต้องใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบหลายวิธี ในการวิจัยนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบกิจกรรมต้านออกซิเดชัน (Huang, Hopia, Schwarz, Frankel, & German, 1996)



รูปที่ 4.5 โครงสร้างทางเคมีของ trolox (Huang et al., 1996)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ trolox โดยเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระ trolox ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 และ 1500 μM ปริมาตร 1 μL ทำปฏิกิริยากับ DPPH ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 1 μL ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.6A จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ trolox เพิ่มขึ้น ความเข้มสีของ DPPH มีค่าลดลงแสดงให้เห็นถึงการทำปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระจากนั้นแสกนภาพเพื่อวัดความเข้มสี นำมาใช้สำหรับสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox และความเข้มสีดังแสดงใน รูปที่ 4.6B ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 300-1000 μM , $R^2 = 0.991$

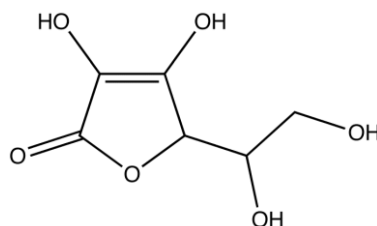
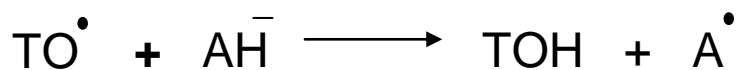


รูปที่ 4.6 (A) รูปแสดงผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ trolox (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลง กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ trolox (n=3)

ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้นในช่วงกราฟมาตรฐานคือ 300, 600, 900 μM ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์เท่ากับ 2.61, 3.51 และ 12.38 ตามลำดับ (n=10) จากการพิจารณาค่าดังกล่าวพบว่าในการตรวจวัดสารมาตรฐาน trolox ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงและสามารถทำซ้ำได้ดี จากนั้นหาขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ได้เท่ากับ 295 μM

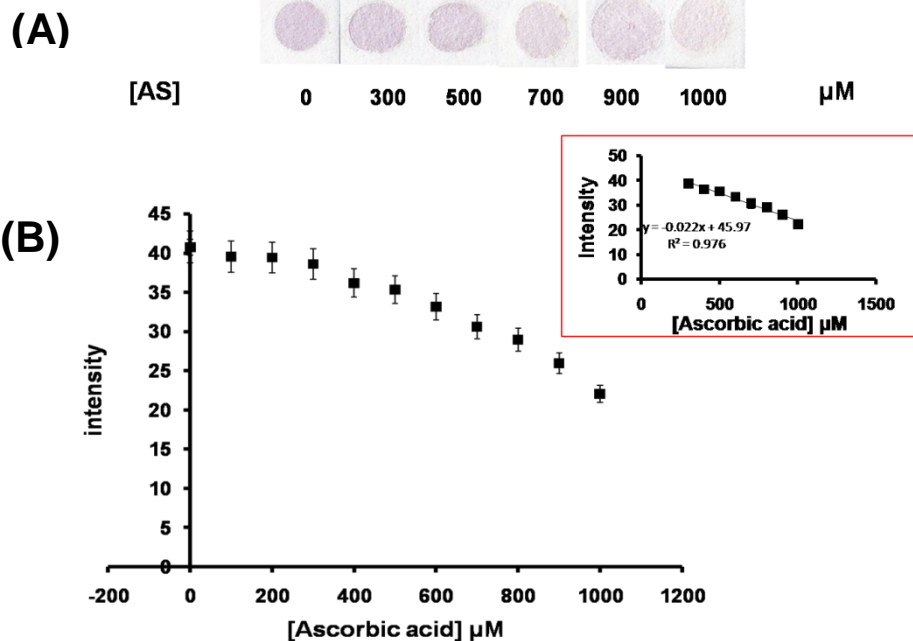
4.3.3. ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid

ascorbic acid หรือ วิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล α -tocopherol (TO) เปลี่ยนกลับไปเป็น α -tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ (Miller & Rice-Evans, 1997)



รูปที่ 4.7 โครงสร้างเคมีของ ascorbic acid (Miller & Rice-Evans, 1997)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงโดยเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 μM ปริมาตร 1 μL ทำปฏิกิริยากับ DPPH ความเข้มข้น 2000 μM ปริมาตร 1 μL ได้ผลดังรูปที่ 4.8A พบว่าความเข้มสีของ DPPH จางลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ascorbic acid จากนั้นนำมาแสกนภาพเพื่อวัดความเข้มสี สำหรับสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid และความเข้มสีที่ลดลง ได้ผลดังแสดงใน รูปที่ 4.8B และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 300-1000 μM , $R^2 = 0.976$

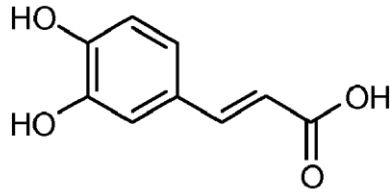


รูปที่ 4.8 (A) รูปแสดงผลความเข้มสีที่ลดลงในการทำปฏิกิริยาของ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid กับความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลง (n=3)

ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 300, 600, 900 μM มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.60, 5.54 และ 7.28 ตามลำดับ (n=10) จากการพิจารณาค่าดังกล่าวพบว่าในการตรวจวัดสารมาตรฐาน ascorbic acid ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงและสามารถทำซ้ำได้ดี สามารถหาขีดจำกัดการตรวจวัด จากการทดลองโดยค่อยๆ ลดความเข้มข้นของ ascorbic acid จนกระทั่งได้ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ให้สัญญาณแตกต่างจากสัญญาณของแบล็กซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากับ 300 μM (experimental LOD)

4.3.4 ศึกษาการวิเคราะห์ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน caffeic acid

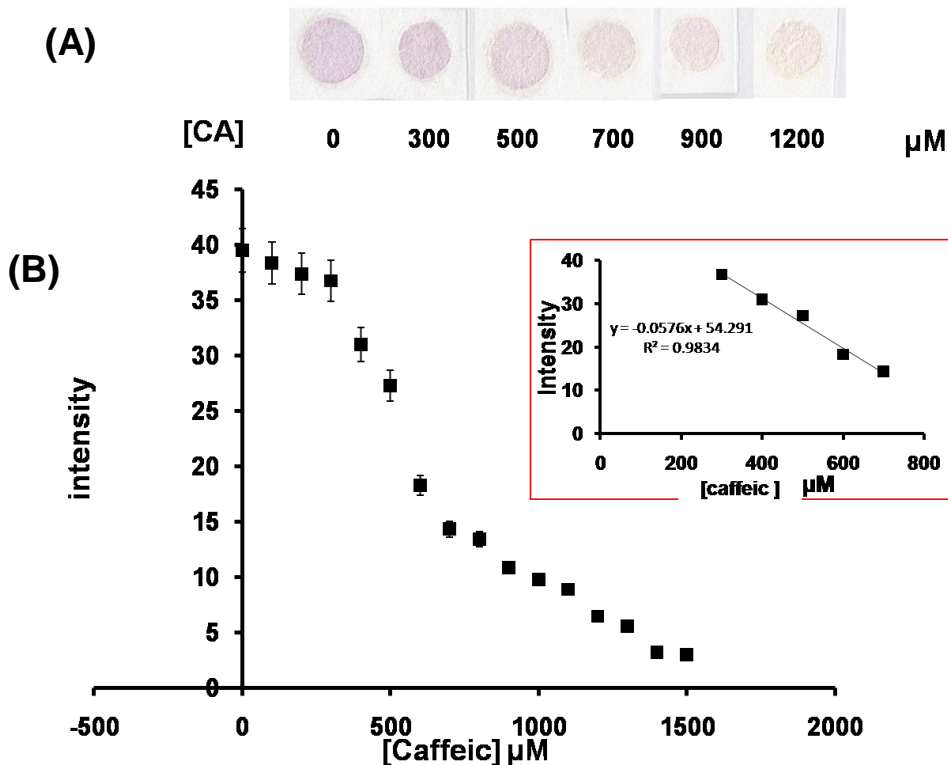
สาร caffeic acid (CA) เป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลพบมากในผลกาแฟ ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ป้องกันการเกิดโรคพาร์กินสัน (parkinsons disease) ปกป้องเซลล์ในภาวะ oxidative stress (Gülçin, 2006)



Caffeic Acid

รูปที่ 4.9 โครงสร้างทางเคมีของ caffeic acid (Gülçin, 2006)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ caffeic acid ทำได้โดยเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 และ 1500 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ DPPH ความเข้มข้น 2000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 4.10A นำมาแสดงภาพเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid และความเข้มสีที่ลดลงดังแสดงใน รูปที่ 4.10B ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 300-700 ไมโครโมลาร์, $R^2 = 0.983$

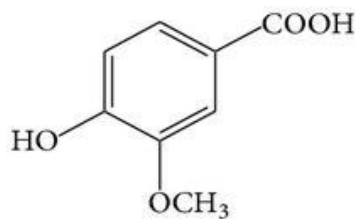


รูปที่ 4.10 (A) รูปแสดงผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid (B) กราฟแสดงความเข้มสี DPPH ที่ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid (n=3)

จากการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของ caffeic acid ที่ความเข้มข้น 300, 500, 700 μM พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์เท่ากับ 7.43, 4.67 และ 7.96 ตามลำดับที่ ($n=10$) จากการพิจารณาค่าดังกล่าวพบว่าในการตรวจวัดสารมาตรฐาน caffeic acid ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงและสามารถทำซ้ำได้ดี จากนั้นหาขีดจำกัดการตรวจวัด จากการทดลองโดยค่อยๆลดความเข้มข้นของ caffeic acid จนกระทั่งได้ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ให้สัญญาณแตกต่างจากสัญญาณของแบล็กซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากับ 300 μM (experimental LOD)

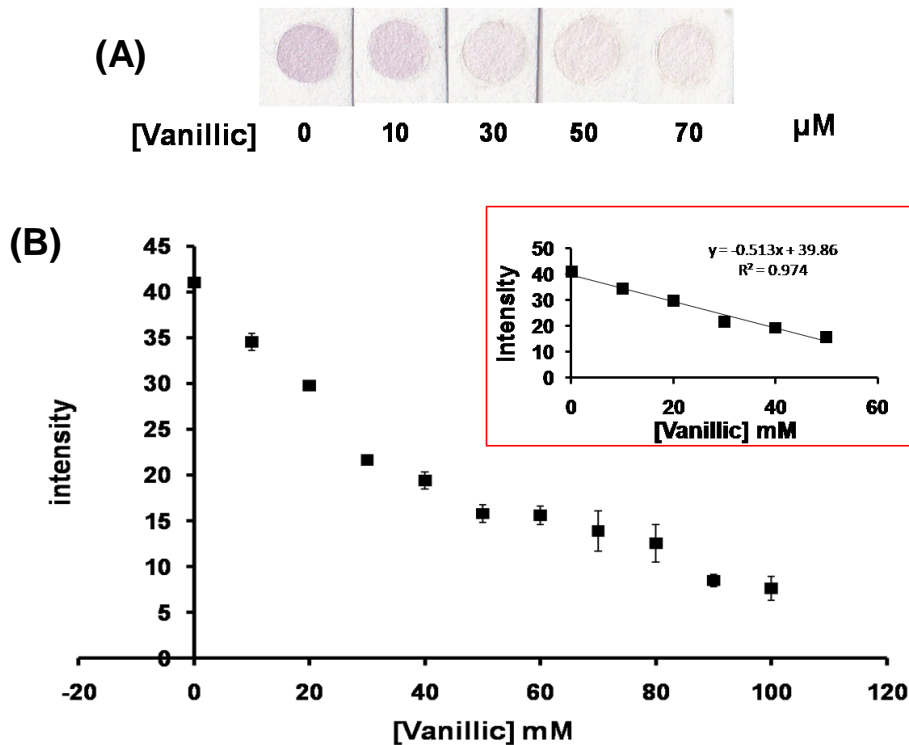
4.3.5. ศึกษาการวิเคราะห์ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน vanillic acid

Vanillic acid เป็นสารประกอบกลุ่ม phenolic มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้จะทำหน้าที่ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำๆ แต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นอาจกลายเป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้ (Itoh et al., 2009)



รูปที่ 4.11 แสดงโครงสร้างเคมีของ vanillic acid (Itoh et al., 2009)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงโดยเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระ vanillic acid ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 mM ปริมาตร 1 μL ทำปฏิกิริยากับ DPPH ความเข้มข้น 2000 μM ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 4.12A แล้วแสกนภาพเพื่อวัดความเข้มสี นำมาใช้สำหรับสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ vanillic acid และความเข้มสีที่ลดลงดังแสดงใน รูปที่ 4.12B และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10-50 มิลลิโมลาร์, $R^2 = 0.974$

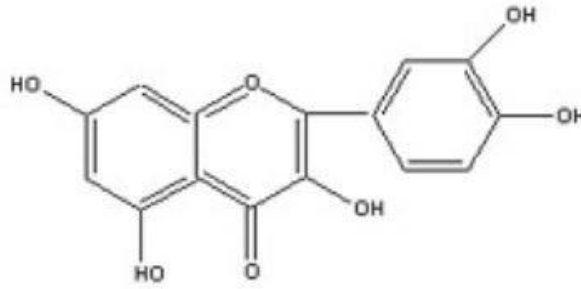


รูปที่ 4.12 (A) รูปแสดงความเข้มสีของ DPPH ลดลงด้วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ Vanillic acid กับความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลง (n=3)

ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของการวิเคราะห์ vanillic acid ที่ความเข้มข้น 10, 30, 50 mM พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์เท่ากับ 1.50, 7.24 และ 16.91 ตามลำดับ (n=10) จากการพิจารณาค่าดังกล่าวพบว่าในการตรวจวัดสารมาตรฐาน vanillic acid ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงและสามารถทำซ้ำได้ดี ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดพบว่าการทดลองวัดสัญญาณของแบลงค์ (n=3) ให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 10 mM

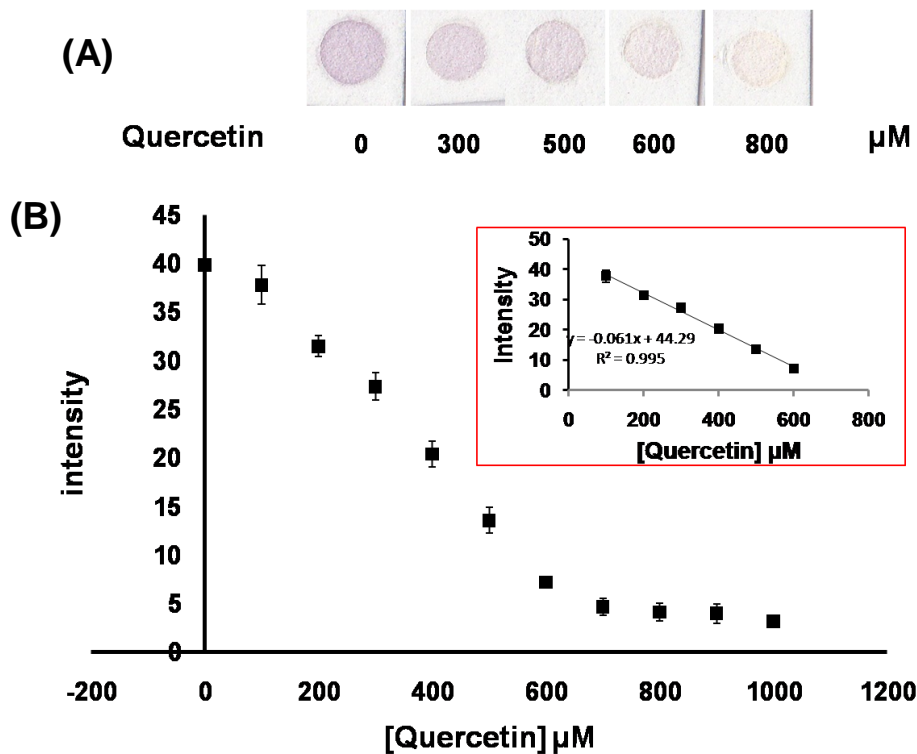
4.3.6. ศึกษาการวิเคราะห์ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin

quercetin เป็นสารพฤกษเคมีที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด มีมากในหัวหอม หอมแดง และพืชตระกูลถั่ว ให้ฤทธิ์ในการป้องกันการอักเสบ ป้องกันแบคทีเรีย และไวรัส ช่วยป้องกันอาการแพ้ ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ป้องกันการเกิดออกซิเดชันในหลอดเลือด และป้องกันหลอดเลือดเลี้ยงสมองอุดตันสามารถป้องกันโรคมองเสื่อม พาร์กินสันนอกจากนั้นยังมีรายงานว่าเคอร์ซิตินยังมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ทำให้แผลหายเร็ว (Gordon & Roedig-Penman, 1998)



รูปที่ 4.13 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ quercetin (Gordon & Roedig-Penman, 1998)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงโดยเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 μM ปริมาตร 1 μL ทำปฏิกิริยากับ DPPH ความเข้มข้น 2000 μM ปริมาตร 1 μL ได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 4.14A นำมาเสกนภาพเพื่อวัดความเข้มสีเพื่อใช้สำหรับสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin และความเข้มสีที่ลดลงดังแสดงในรูปที่ 4.14B และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100-600 μM , $R^2 = 0.995$



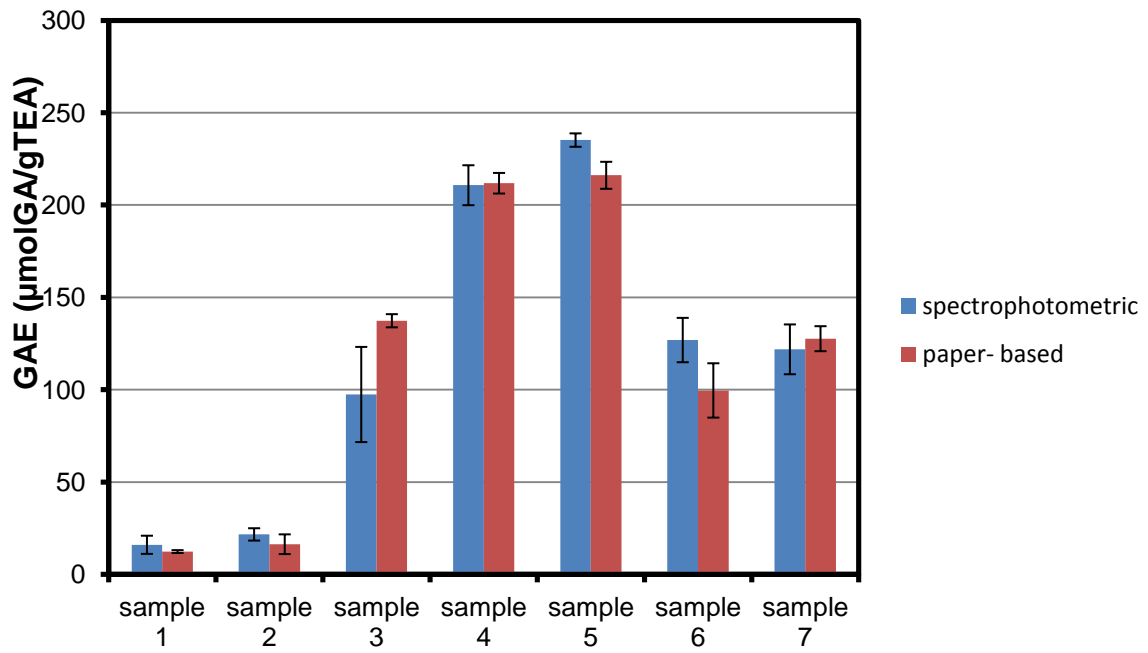
รูปที่ 4.14 (A) รูปแสดงความเข้มสี DPPHจากการทำปฏิกิริยากับ quercetin (B) กราฟแสดงความเข้มสีของ DPPH ที่ลดลงต่อความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin (n=3)

ความสามารถในการทำซ้ำของ quercetin ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600 μM มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ เท่ากับ 2.19, 5.17 และ 20.43 ตามลำดับ (n=10) จากการพิจารณาค่าดังกล่าวพบว่าในการตรวจวัดสารมาตรฐาน quercetin ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงและสามารถทำซ้ำได้ดี จากนั้นหา

ขีดจำกัดการตรวจวัด จากการทดลองวัดค่าแบลงค์ (n=3) พบว่าค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 93 μM

4.4 ผลการศึกษาตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและวิธี DPPH แบบดั้งเดิม

จากการทดลองนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้ง 6 ชนิดด้วยวิธี DPPH ซึ่งทำได้โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ 1 μL และ DPPH ความเข้มข้น 2000 μM ปริมาตร 1 μL ทำปฏิกิริยากัน จะเห็นว่าให้การวิเคราะห์ที่ดี สามารถทำซ้ำได้และมีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ การวิเคราะห์สารทั้งหกชนิดจะเห็นว่าในการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นจะใช้ปริมาณของรีเอเจนต์และสารมาตรฐานรวม 2 μL ต่อการวิเคราะห์หนึ่งซ้ำ และมีเวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที สามารถทำการวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างพร้อมๆกัน ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษร่วมกับวิธี DPPH มีความน่าสนใจที่จะนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจริง ดังนั้นขั้นตอนต่อไปได้ศึกษาประสิทธิภาพการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมเพื่อการศึกษาความแม่นยำของวิธีโดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาชง 7 ชนิด (sample 1-7) ด้วยวิธี DPPH แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) เทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาในค่า gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วย $\mu\text{mol gallic acid equivalent/g tea}$ ซึ่งหมายถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า $\mu\text{mol gallic acid}$ ต่อหนึ่งกรัมของชา จากการวิเคราะห์ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.15 ซึ่งเป็นกราฟพล็อตระหว่าง GAE ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชาทั้ง 7 ชนิด ที่ได้จากการวิธี spectrophotometric DPPH assay และวิธี paper-based DPPH assay จากการวิเคราะห์พบว่าค่า GAE ของตัวอย่างชาทั้ง 7 ชนิดที่วิเคราะห์ได้จากวิธีวิเคราะห์ทั้งสองมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (two tailed $P = 0.8114$) ชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างชาได้อย่างแม่นยำเทียบเท่ากับวิธีดั้งเดิม



รูปที่ 4.15 กราฟที่พลอตระหว่าง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g TEA}$ ของการวิเคราะห์ชา Sample 1-7 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธีดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระแบบกระดาษ (paper-based device) ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์แนวใหม่สร้างขึ้นมาทำงานร่วมกับวิธี DPPH อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนี้เป็นทางเลือกใหม่ของนักวิจัยที่ช่วยให้ลดต้นทุนในการทดลอง ใช้สารปริมาณน้อย วิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว อีกทั้งยังมีน้ำหนักเบา พกพาสะดวก ไม่จำเป็นต้องทดสอบแคในห้องปฏิบัติการเท่านั้น อุปกรณ์นี้นำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่ว่าจะเป็นอาหาร เครื่องดื่ม หรือ ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพผู้บริโภค รวมถึงเศรษฐกิจการส่งออกอาหารของประเทศ

จากงานวิจัยพบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid, trolox, ascorbic acid, caffeic acid, vanillic acid และ quercetin ได้ผลไปในทิศทางเดียวกันใช้สารตัวอย่างสารละลายชา และรีเอเจนต์ (DPPH) ปริมาตรรวม 2 μL ต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่างซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมาก ใช้เวลาวิเคราะห์ 30 นาทีสามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันหลายๆตัวอย่าง และได้ผลวิเคราะห์ค่อนข้างแม่นยำ จึงเหมาะกับการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระในเบื้องต้นได้ดี อุปกรณ์ตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ใช้พลาสติกเคลือบเป็นส่วนกัน (hydrophobic barrier) เพื่อป้องกันการถูกละลายด้วยเมทานอล เนื่องจากใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย DPPH การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ มีลักษณะเป็นหลุม หยดสารละลาย DPPH ลงบนกระดาษในบริเวณส่วนที่ขอบน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระลงไป จะทำให้สีม่วงของ DPPH radicals ลดลงความเข้มสีม่วงที่ลดลงสามารถวิเคราะห์โดยใช้เพียงเครื่องแสกนภาพและโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ จึงไม่จำเป็นต้องพึ่งพาเครื่องมือราคาแพง ก็สามารถหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างได้ จากวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวจะเห็นว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถใช้งานได้ ดังนั้นอุปกรณ์ชนิดนี้มีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ในตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการทดลองหยดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 μL จากนั้นหยด DPPH ที่ละลายใน เมทานอล ลงไปปริมาตร 1 μL ที่ความเข้มข้น 2 mM จากการใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นได้ดี เมื่อนำผลการทดลองไปเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี DPPH ดั้งเดิม

ผลผลิต (output)

บทความวิจัย

- วิมล แสงนาค และยุภาพร สมีน้อย. (๒๕๕๘). การพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์แบบกระดาษ เพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. ใน การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ ๗ (หน้า. ๑-๙), พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- Sirivibulkovit K., Nouanthavong S., Boonya K., Sameenoi Y. “A simple paper-based DPPH assay for high-throughput analysis of antioxidant activity”, manuscript in preparation.

รายงานสรุปการเงิน
 เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2558A10802351 สัญญาเลขที่ 72/2558
 โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
 มหาวิทยาลัยบูรพา

การพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์แบบรู้ผลรวดเร็วของความสามารถต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ
 (Development of paper-based DPPH assay for high throughput analysis of antioxidant activity in foods and natural products)

ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.ยุภาพร สมิน้อย

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2557 ถึงวันที่ 10 กุมภาพันธ์ 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 5 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2557

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 325,000 บาท เมื่อวันที่ 5 มกราคม 2558

งวดที่ 2 (40%) 260,000 บาท เมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2558

งวดที่ 3 (10%) 65,000 บาท เมื่อวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2560

รวม 650,000 บาท

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	180,000	180,000	-
2. ค่าจ้าง	84,000	84,000	-
3. ค่าวัสดุ	291,000	291,000	-
4. ค่าใช้สอย	30,000	30,000	--
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ ค่าธรรมเนียมอุดหนุน สถาบัน	65,000	65,000	-
	650,000	650,000	-

(.....)

ดร.ยุภาพร สมิน้อย

หัวหน้าโครงการ

บรรณานุกรม

- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” วารสาร
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 21(3) : 276 - 279, กรกฎาคม - กันยายน 2556
- พัชรีย์ พริบตีเวช. การสกัดและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากใบชา
อำเภอมือง จังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์สำนักวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, 2540
- ปรียนันท์ บัวสดี. การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิก
โวลแทมเมตรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. อำเภอมือง จังหวัดนครปฐม. มหาวิทยาลัย
ศิลปากร, 2549
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity
index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing
capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural
and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of
“antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A., & Callea, A. (2010). Formation of
dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and
eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food
chemistry*, 118(2), 256-265.
- Cao, G., Verdon, C. P., Wu, A., Wang, H., & Prior, R. L. (1995). Automated assay of oxygen
radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1738-
1744.
- Carrilho, E., Martinez, A. W., & Whitesides, G. M. (2009). Understanding wax printing: a simple
micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical chemistry*, 81(16),
7091-7095.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging
capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7429-7436.
- Chevion, S., Roberts, M. A., & Chevion, M. (2000). The use of cyclic voltammetry for the
evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(6), 860-870.
- 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(1), 77-
82.
- Fenton, E. M., Mascarenas, M. R., López, G. P., & Sibbett, S. S. (2008). Multiplex lateral-flow
test strips fabricated by two-dimensional shaping. *ACS applied materials & interfaces*,
1(1), 124-129.
- Gordon, M. H., & Roedig-Penman, A. (1998). Antioxidant activity of quercetin and myricetin in
liposomes. *Chemistry and physics of lipids*, 97(1), 79-85.

- Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2), 213-220.
- Huang, S.-W., Hopia, A., Schwarz, K., Frankel, E. N., & German, J. B. (1996). Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 444-452.
- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M., & Yagi, K. (2009). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(7), 1215-1219.
- Jokerst, J. C., Adkins, J. A., Bisha, B., Mentele, M. M., Goodridge, L. D., & Henry, C. S. (2012). Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens. *Analytical chemistry*, 84(6), 2900-2907.
- Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., & Yamane, Y. (2004). Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2391-2396.
- Kedare, S. B., & Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- Li, L., Ng, T., Gao, W., Li, W., Fu, M., Niu, S., Liu, F. (2005). Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. *Life sciences*, 77(2), 230-240.
- 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, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)*, 84(4), 407-412.
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food chemistry*, 60(3), 331-337.
- Mulholland, C. W., & Strain, J. J. (1991). Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clinical biochemistry*, 24(5), 437-441.
- Nie, J., Zhang, Y., Lin, L., Zhou, C., Li, S., Zhang, L., & Li, J. (2012). Low-cost fabrication of paper-based microfluidic devices by one-step plotting. *Analytical chemistry*, 84(15), 6331-6335.
- Piletska, E. V., Piletsky, S. S., Whitcombe, M. J., Chianella, I., & Piletsky, S. A. (2012). Development of a New Microtiter Plate Format for Clinically Relevant Assays. *Analytical chemistry*, 84(4), 2038-2043.

- Sharpe, E., Frasco, T., Andreescu, D., & Andreescu, S. (2013). Portable ceria nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (NanoCerac). *Analyst*, *138*(1), 249-262.
- Van Hung, P., Maeda, T., Miyatake, K., & Morita, N. (2009). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*, *42*(1), 185-190.
- Yen, G.-C., Duh, P.-D., & Tsai, H.-L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry*, *79*(3), 307-313.

ผลงานวิจัยที่ได้เผยแพร่

การพัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Development of Paper Based DPPH Assay for the Analysis of Antioxidant Activity

วิมล แสงนาค และ ยูภาพร สมีน้อย*

Wimon Sangnak and Yupaporn Sameenoi*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาวิธีดีพีพีเอชบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เบื้องต้นได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ได้แก่ ความเข้มข้นของดีพีพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม และเวลาในการเกิดปฏิกิริยาบนอุปกรณ์ตรวจวัด โดยใช้สารมาตรฐานสองชนิดคือ กรดแกลลิก และ โทร็อกซ์ จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของดีพีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ และเวลาที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างดีพีพีเอชและสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้งสองชนิดบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเท่ากับ 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่า การวิเคราะห์กรดแกลลิกพบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0 – 600 ไมโครโมลาร์ ค่าการทำซ้ำที่ดีโดยมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในช่วง 5.88-17.30 (ซ้ำ 10 ครั้ง) มีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 2.90 ไมโครโมลาร์ และจากการวิเคราะห์โทร็อกซ์พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0 - 1000 ไมโครโมลาร์ มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ในช่วง 2.22 - 7.64 (ซ้ำ 10 ครั้ง) มีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 67.56 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นร่วมกับวิธีดีพีพีเอชมีแนวโน้มสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบรวดเร็วในตัวอย่างจริงได้

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ / ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ / วิธีดีพีพีเอช / อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

Abstract

A paper-based DPPH assay has been developed for determination of antioxidant activity. Preliminary study focused on the optimization of the assay for the DPPH analysis on a paper-based device including starting concentration of DPPH and reaction time using gallic acid and Trolox as model standard antioxidants. From the analysis of both antioxidant standards, the results showed that optimal starting concentration of DPPH was 1.5 mM and optimal reaction time was 30 min. The paper-based DPPH assay was applied for the analysis of gallic acid where the linear range was found in the concentration of 0-600 μ M with good reproducibility at the relative standard deviation in the range of 5.88-17.30% (n=10) and the limit of detection was 2.90 μ M. The results from the analysis of trolox showed that the linearity of calibration curve was found in the range of 0-1000 μ M with relative standard deviation in the range of 2.22 - 7.64 (n=10) and the

limit of detection was 67.56 μM . These results indicated that the developed paper-based DPPH assay is promising method for high throughput analysis of antioxidant activity in real samples.

Keywords : Antioxidants / Antioxidant activity / DPPH assay / Paper-based device

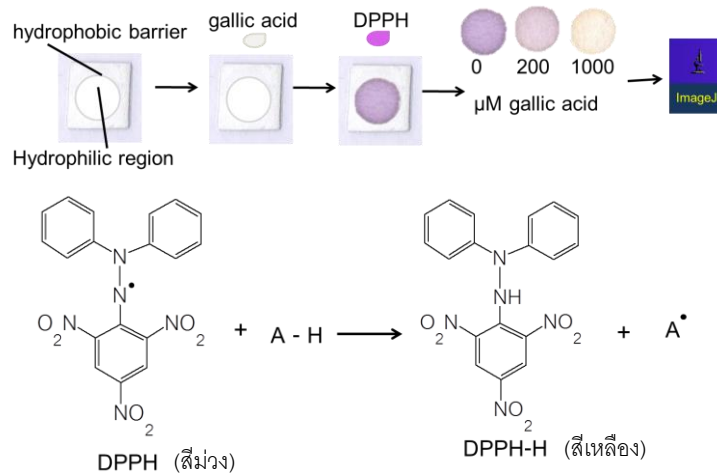
*Corresponding author. E-mail : yupaporn@buu.ac.th

1. บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาสูง สามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการหายใจเอาฝุ่นละอองหรือจากการรับประทานอาหารที่มีอนุมูลอิสระอยู่ เมื่อเข้าสู่ร่างกาย อนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลได้เกือบทุกประเภท ทำให้เกิดความเสียหายแก่โมเลกุลที่ได้รับผลกระทบ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์แปรสภาพ เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่างๆตามมาในที่สุด (บุหรัน พันธุ์สุวรรณ และคณะ, 2553) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารพวกเอนไซม์หรือสารอื่นที่สามารถชะลอหรือทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาจากใช้ไม่ได้ดำเนินต่อไป สามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระได้ในอาหารจำพวกพืช ผลไม้ และสมุนไพรส่วนใหญ่ (บุหรัน พันธุ์สุวรรณ และคณะ, 2553) ปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติกันอย่างกว้างขวางเพื่อเป็นข้อมูลแก่ผู้บริโภค อุตสาหกรรมเกี่ยวกับการผลิตยารักษาโรคและธุรกิจส่งออกอาหาร การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ โดยการทำให้เกิดสีบนโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography ส่วนวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณที่นิยม ได้แก่ วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, วิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical cation decolorization assay และวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay เป็นต้น (Molyneux et al., 2004) ซึ่งในบรรดาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณเหล่านี้ วิธี DPPH เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สามารถวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเกี่ยวข้องกับ DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเท่านั้น โดยมีหลักการการวิเคราะห์คือ อนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสีม่วง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สีม่วงของ DPPH จะจางลงเป็นสีเหลืองซึ่งเป็นสีของ DPPH ที่เสถียร ในการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมจะวัดสีที่จางลงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยค่าการดูดกลืนแสงของสีม่วงที่ลดลงจะแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (Piletska et al., 2012) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH แบบดั้งเดิมต้องใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ปริมาณมากในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง และใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ทำให้การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความล่าช้า ต่อมาได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระแบบรั้วผลรวดเร็ว (high throughput analysis) ด้วยการวิเคราะห์บนถาดหลุม (microtiter plate) วิธีดังกล่าวสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างได้ ครั้งละหลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน สามารถอ่านผลได้พร้อมกัน ทำให้เพิ่มขีดความสามารถในการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระได้รวดเร็วขึ้นมาก อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่เนื่องจากจำเป็นต้องใช้เครื่อง microplate reader spectrophotometer ที่มีราคาแพงและเป็นเครื่องมือเฉพาะที่ไม่ได้มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป ผู้ใช้จำเป็นต้องมีความรู้เกี่ยวกับการใช้เครื่องมือและซอฟต์แวร์การใช้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถทดสอบตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ปริมาณน้อยในการวิเคราะห์ มีเวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องพึ่งพาเครื่องมือราคาแพงในการตรวจวัดสัญญาณ

เพื่อให้บรรลุเป้าหมายดังกล่าวงานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ทำงานร่วมกับวิธี DPPH ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบรั้วผลรวดเร็ว โดยที่อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษถูกเริ่มคิดค้นโดยกลุ่มวิจัยของ Whitesides ในปี คศ 2007 (Martinez et al., 2007) สามารถสร้างอุปกรณ์ได้ง่ายโดยการสร้างส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) บนกระดาษด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิคโฟโตลิโทกราฟี (Martinez et al., 2007) การพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์ (Sameenoi et al., 2014) บริเวณที่ยังเป็นกระดาษก็จะมีคุณสมบัติชอบน้ำ เป็นบริเวณที่ทำปฏิกิริยาและทดสอบได้ โดยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีคุณสมบัติในการทดสอบตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือการตรวจวัดสัญญาณราคาถูก อีกทั้งให้ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สามารถทำได้ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยหยดสารตัวอย่างที่ต้องการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลงบนกระดาษที่ได้สร้างส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำให้มีลักษณะเป็นหลุมดังแสดงในรูป จากนั้นหยดสารละลาย DPPH ลงไป จะทำให้สีม่วงของ DPPH radicals ลดลง ความเข้มสีม่วงที่ลดลงสามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมประมวลผลภาพ จากวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว จะเห็นว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถงานได้อย่างง่าย ผู้ใช้งานไม่จำเป็นต้องเป็นผู้ชำนาญการ สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง และไม่จำเป็นต้องใช้ปริมาตรของรีเอเจนท์และสารตัวอย่างเป็นปริมาณมาก

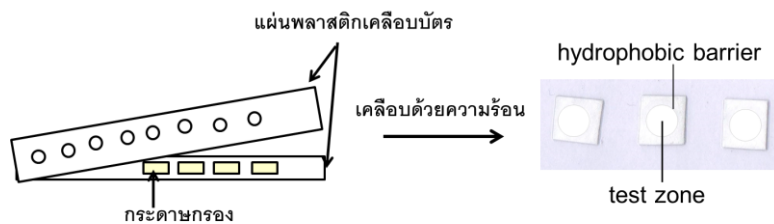


รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์และปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (A-H คือสารต้านอนุมูลอิสระ)

2. วิธีการ

2.1 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยสร้างส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ด้วยวิธีการตัดและเคลือบด้วยพลาสติก (Cassano *et al.*, 2013) มีขั้นตอนการสร้างดังแสดงในรูปที่ 2 โดยเตรียมกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1(Whatman International Ltd.Maidstone, England) ตัดให้มีขนาด 1 cm x 1 cm และเตรียมพลาสติกเคลือบบัตรโดยใช้ที่เจาะกระดาษเจาะแผ่นพลาสติกด้านบนมีลักษณะเป็นวงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่เตรียมไว้ มาจัดเรียงบริเวณพลาสติกที่เป็นรูแล้วเข้าเครื่องเคลือบบัตรดังแสดง บริเวณที่เป็นหลุมจะทำหน้าที่เป็นบริเวณตรวจวัด (test zone) ส่วนบริเวณที่เคลือบด้วยพลาสติก จะทำหน้าที่เป็นส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำ



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

2.2 การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย DPPH (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) ให้มีความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 0.1 - 4.0 mM ในตัวทำละลาย ethanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) จากนั้นหยดสารละลาย DPPH แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.5 µL ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (n=3) ปล่อยให้มันต์เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำอุปกรณ์ที่ได้ไปสแกนแล้วนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ (National Institute of Health, USA) เพื่อตรวจวัดความเข้มของสีม่วงที่เกิดขึ้น นำค่าความเข้มสีม่วงมาสร้างกราฟโดยพลอตแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น DPPH และค่าความเข้มสีที่อ่านได้ แล้วเลือกความเข้มข้น DPPH ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

2.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างสมบูรณ์ บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 2 ชนิด คือ gallic acid (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) และ trolox (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) เป็นสารมาตรฐานในการศึกษา ในการทดสอบนั้นสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ถูกเตรียมโดยละลายในเอทานอล ให้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ gallic acid ความเข้มข้น 0, 40, 100, 150 และ 200 μM และ trolox ความเข้มข้น 0, 25, 100, 400 และ 625 μM ถูกหยดลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหุ้มละ 0.5 μL ตามด้วยสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1.5 mM ในเอทานอลหุ้มละ 0.5 μL จากนั้นสแกนภาพทุกๆ 3 นาทีเป็นเวลา 39 นาที นำภาพที่ได้ไปเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ เพื่อตรวจวัดค่าความเข้มสี แล้วพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาและค่าความเข้มสี แล้วเลือกเวลา ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจตามขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 1 โดยหยดตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระปริมาตร 0.5 μL ลงบนอุปกรณ์ จากนั้นหยดสารละลาย DPPH เข้มข้น 1.5 mM หุ้มละ 0.5 μL ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปสแกนเพื่อถ่ายรูป นำรูปที่ได้วัดความเข้มสีของ DPPH ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาด้วยโปรแกรม ImageJ

2.5 การศึกษาค่าทางการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid และ trolox ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

2.5.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ gallic acid และ trolox โดยวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามขั้นตอนที่ได้กล่าวในหัวข้อ 2.4 ทำการวิเคราะห์ gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 0-1000 μM และวิเคราะห์ trolox ที่ช่วงความเข้มข้น 0-1500 μM ภายหลังจากวิเคราะห์ความเข้มสีแล้ว นำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสองและค่าความเข้มสีเพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรงการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้งสองชนิด

2.5.2 ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ gallic acid และ Trolox ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 μM จากนั้นหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage of relative standard deviation, %RSD) ของสัญญาณความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์

2.5.3 ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection)

ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการวิเคราะห์ด้วย DPPH คือความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้สัญญาณของ DPPH ต่ำกว่าสัญญาณแบล็คเป็นสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบล็ค นำค่าความเข้มสีของของการวิเคราะห์แบล็ค (ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นศูนย์) ด้วยวิธี DPPH มาคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารต้านอนุมูลอิสระ (gallic acid หรือ trolox) จากความสัมพันธ์ (Arinbruster และคณะ, 1994)

$$I_{\text{LOD}} = I_0 - 3SD_{\text{blank}} \quad (1)$$

เมื่อ I_{LOD} คือค่าความเข้มสีของ DPPH เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นระดับขีดจำกัดการตรวจวัด

I_0 คือค่าความเข้มสีของ DPPH ที่ไม่ได้เติมสารต้านอนุมูลอิสระ (แบล็ค)

SD_{blank} คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความเข้มสีของแบล็ค ($n=10$)

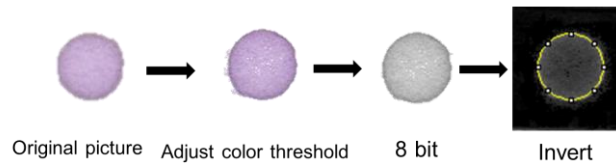
นำ I_{LOD} ไปคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (X_{LOD}) ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานดังสมการ

$$\text{จาก } I_{\text{Lod}} = -mX_{\text{Lod}} + c \quad (2)$$

เมื่อ m และ c คือ ความชันและจุดตัดแกนในกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ตามลำดับ

2.6 การวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ

สแกนภาพอุปกรณ์ที่ได้ทำการทดลองเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี นำรูปที่ได้จากการสแกนเข้าโปรแกรม ImageJ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังรูปที่ 3 จากซ้ายไปขวา เริ่มต้นจากรูปที่ได้แต่ละหลุม ทำการปรับสี เพื่อคัดให้ได้สีที่ต้องการซึ่งในที่นี้คือสีม่วงด้วยการปรับ color threshold ของ ImageJ จากนั้นเปลี่ยนรูปเป็นไฟล์ 8 bit gray scale และปรับ invert จะสามารถวัดความเข้มสีเทา (gray scale intensity) ซึ่งเป็นระดับความเข้มสีในแอดสีเทาที่มีค่าแปรผันตรงกับความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งในที่นี้คือความเข้มของสีม่วง

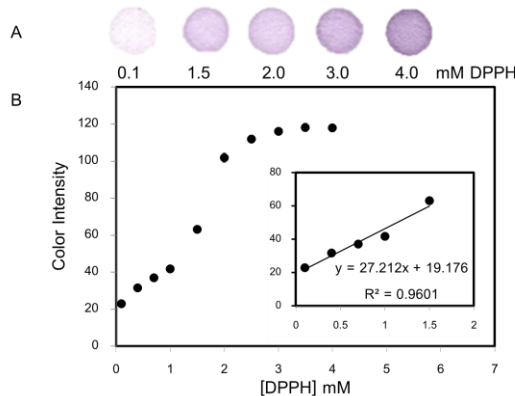


รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการประมวลผลภาพด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี

3. ผลและอภิปราย

3.1 การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสม

เนื่องด้วยการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการวัดการลดลงของสัญญาณของ DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ในการนำไปวิเคราะห์ จึงเป็นปัจจัยสำคัญ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจะต้องเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นที่ให้สัญญาณที่สูงและนอกจากนั้นยังต้องสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่ลดลงได้อย่างรวดเร็วเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปเพียงเล็กน้อย งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ศึกษา DPPH เริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-4 mM กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของ DPPH และความเข้มสีของ DPPH แสดงในรูปที่ 4

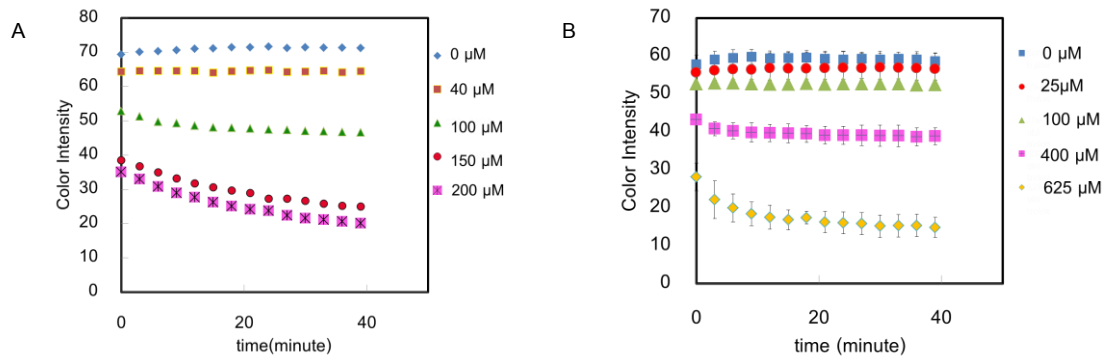


รูปที่ 4 (A) แสดงสีของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ (B) แสดงค่าความเข้มสีของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n=3)

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

3.2. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้งสองชนิดคือ gallic acid และ trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในกราฟที่พล็อตระหว่างความเข้มข้นของ DPPH กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 5A และ 5B สำหรับการวิเคราะห์ gallic acid และ Trolox ตามลำดับ



รูปที่ 5 การศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษระหว่าง DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

(A) gallic acid (n=3) (B) trolox (n=3)

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH 1.5 mM กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid และ trolox ที่มีความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การศึกษาในสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสองให้ผลคล้ายคลึงกันกล่าวคือสัญญาณของ DPPH จะค่อยๆลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสองกับ DPPH และค่าความเข้มข้นที่เมื่อเกิดปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 30 นาที เป็นต้นไปในทุกๆความเข้มข้นที่ศึกษา แสดงว่าระยะเวลา 30 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้นซึ่งสอดคล้องกับวิธี DPPH ที่มีระบบตรวจวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (Cheng et al., 2006; Mishra et al., 2012 ; Noipa et al., 2011)

3.3 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

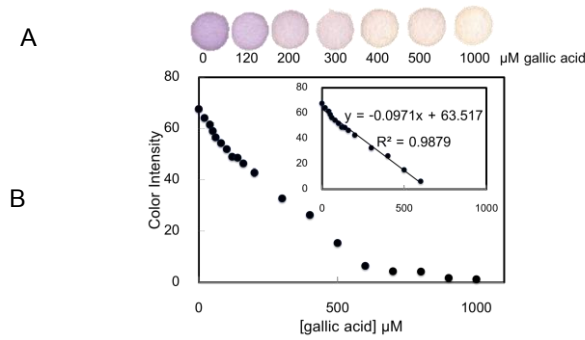
เมื่อทราบความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH และเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแล้ว ได้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานสองชนิดที่เป็นที่นิยมศึกษาคือ gallic acid และ trolox โดยได้ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์หของสารมาตรฐานทั้งสองเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น

3.3.1 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ gallic acid ด้วยวิธี DPPH ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 6 จะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ gallic acid เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของ DPPH มีค่าลดลง เนื่องจากอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วง ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid ส่งผลให้สีจางลงเมื่อความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูป 6A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ gallic acid กับความเข้มข้นของ DPPH พบว่าสัญญาณมีค่าลดลงเมื่อ gallic acid เพิ่มขึ้นดังรูป 6B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ gallic acid เท่ากับ 0-600 µM $R^2 = 0.9879$

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ gallic acid ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 5.88-17.30 (n=10) แสดงให้เห็นว่าวิธี DPPH บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน gallic acid

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้สมการที่ 1 และ 2 พบว่าความเข้มข้นของ gallic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 2.90 µM ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Piletska et al., 2012)



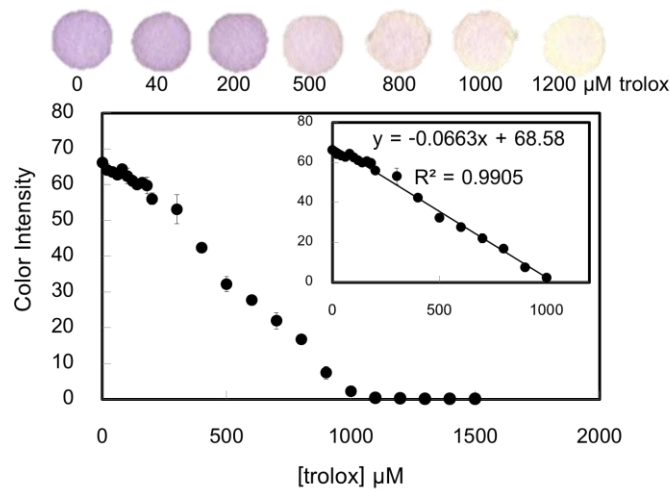
รูปที่ 6 (A) แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ gallic acid ความเข้มข้นต่างๆระยะเวลา 30 นาที (B) แสดงค่าความเข้มสี (color intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับ gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 30 นาที (n=3)

3.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ trolox ด้วยวิธี DPPH (รูปที่ 7) จะเห็นว่า ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ trolox จะพบว่า ความเข้มสีของ DPPH มีค่าลดลง ดังแสดงในรูป 7A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ trolox พบว่าสัญญาณมีค่าลดลงเมื่อ trolox เพิ่มขึ้นดังรูป 7B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ trolox เท่ากับ 0-1000 µM $R^2 = 0.9905$

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ จากการศึกษาศักยภาพในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ trolox ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.22 – 7.64 (n=10) แสดงให้เห็นว่าวิธี DPPH บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน trolox

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้สมการที่ 1 และ 2 พบว่าความเข้มข้นของ trolox ที่ต่ำที่สุดที่วิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 67.56 µM ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าที่เคยได้รายงานก่อนหน้านี้ (Cheng *et al.*, 2006)



รูปที่ 7 (A) แสดงลักษณะสีของ DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับ trolox ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 30 นาที (B) แสดงค่าความเข้มสี (Color Intensity) หลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับ trolox ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 30 นาที (n=3)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ gallic acid และ trolox ด้วยวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นพบว่า สามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทั้งสองได้เป็นอย่างดี และจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจริงซึ่งอยู่ในขั้นตอนที่กำลังศึกษาพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มสามารถนำไปวิเคราะห์ในตัวอย่างจริงได้ ซึ่งจะได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น โดยการวิเคราะห์ความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างต่างๆ เทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน จะเห็นได้ว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถผลิตได้ในราคาถูก ไม่จำเป็นต้องพึ่งพาเครื่องมือราคาแพงในการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างในครั้งเดียว ให้

การวิเคราะห์แบบรวดเร็ว สามารถทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่สนใจแบบคัดกรองได้ (high throughput screening) ทำให้การศึกษาวิจัยด้านการค้นคว้าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก้าวหน้าได้รวดเร็วขึ้น

4. บทสรุป

การพัฒนาวิธี DPPH บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารมาตรฐาน gallic acid และ trolox ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี มีความสามารถในการทำซ้ำได้ดี และมีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ (gallic acid 2.90 µM และ trolox 67.56 µM) ใช้ปริมาตรสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ปริมาตรรวมเพียง 1 µL สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันที่ละหลายๆ ตัวอย่าง (>20 ตัวอย่างต่อครั้ง) ใช้อุปกรณ์แบบกระดาษที่มีราคาถูกในการวิเคราะห์และใช้สแกนเนอร์ร่วมกับโปรแกรมประมวลผลภาพเป็นระบบตรวจวัดสัญญาณ ทำให้การวิเคราะห์สามารถทำได้ในสถานที่ที่ไม่มีเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์มีแนวโน้มสามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่างที่สนใจได้เป็นอย่างดีในอนาคต ช่วยส่งเสริมการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในอาหารและสมุนไพรให้ก้าวหน้าอย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2558 และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัยนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- บุหรัน พันธุ์สวรรค์, ไมตรี สุทธิจิตต์ และสุพักตร์ พ่วงบางโพ, (2553) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่าเพกา และมะระขี้เิก ในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา, รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา.
- ปรียพันธ์ บัวสด,(2549). การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; & Karademir, S. E.(2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, (26), 7970-7981.
- Bortolomeazzi, R.; Verardo, G.; Liessi, A.; & Callea, A.(2010). Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chemistry* 2010, 118, (2), 256- 265.
- Cassano, C. L., & Fan, Z. H. (2013). Laminated paper-based analytical devices (LPAD): fabrication, characterization, and assays. *Microfluidics and nanofluidics*, 15(2), 173-181.
- Cao, G.; Verdon, C. P.; Wu, A.; Wang, H.; & Prior, R. L.(1995). Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clinical Chemistry*, 41, (12), 1738-1744.
- Cheng, Z.; Moore, J.; & Yu, L.(2006) High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, (20), 7429-7436.
- 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
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Molyneux, P.(2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* , 26, (2), 211-219.
- Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T., & Ngeontae, W. (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, 44(3), 798-806.
- Piletska, E. V., Piletsky, S. S., Whitcombe, M. J., Chianella, I., & Piletsky, S. A. (2012). Development of a new microtiter plate format for clinically relevant assays. *Analytical chemistry*, 84(4), 2038-2043.

Sameenoi Y, Nongkai PN, Nouanthavong S, Henry CS, &Nacapricha D. One-step polymer screen-printing for microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) fabrication. *Analyst*. 2014;139(24):6580-6588.