



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์แบบหลายวิธีเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบรู้ผลรวดเร็วในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ  
(Development of multi-assay paper-based devices for high throughput analysis of antioxidant activity in foods and natural products)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุภาพร สมีน้อย

หัวหน้าโครงการ

ดร.อนันต์ อธิพรชัย

ผู้ร่วมโครงการ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล

(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙

รหัสโครงการ 2559A10802147

สัญญาเลขที่ 93/2559

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์แบบหลายวิธีเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบรู้ผลรวดเร็วในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ  
(Development of multi-assay paper-based devices for high throughput analysis of antioxidant activity in foods and natural products)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุภาพร สมีน้อย

หัวหน้าโครงการ

ดร.อนันต์ อธิพรชัย

ผู้ร่วมโครงการ

คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณ

แผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 93/2559

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบหลายวิธีพร้อมๆกัน เบื้องต้นได้ทำการศึกษาการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบการวิเคราะห์เดี่ยวด้วยวิธี CUPRAC และวิธี FRAP บนอุปกรณ์แบบกระดาษ ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของทั้งสองวิธีซึ่งได้ศึกษา ความเข้มข้นของรีเอเจนท์ และเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม จากนั้นทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน พบว่าทั้งสองวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างหลากหลายชนิด เช่น กรดแอสคอร์บิก กรดแกลลิก และโทรลอกซ์ ได้ โดยให้ช่วงความเป็นเส้นตรง ชัดจำกัดการตรวจวัด และความสามารถในการทำซ้ำที่มีค่าเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน หลังจากนั้นทำการทดสอบความแม่นยำโดยการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาเทียบกับวิธีดั้งเดิม พบว่าค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธี CUPRAC และวิธี FRAP มีความแม่นยำสูง ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการพัฒนาอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายวิธีพร้อมกันมีความเป็นไปได้สูง

## Abstract

This work presents the development of paper-based devices for simultaneous analysis of antioxidant activity obtained from multiple antioxidant assays. Single assay analysis using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays was preliminarily studied on the paper-based devices. Optimization of various parameters associated with the two assays was carried out including concentration of key reagent and reaction time. The optimal condition was then applied for analysis of antioxidant standards. The results showed that the developed paper-based antioxidant assay was able to analyze various antioxidant such as ascorbic acid, gallic acid as well as Trolox. The linear range, limit of detection and repeatability obtained from the developed assays were comparable with those obtained from the traditional assays. The accuracy of the developed paper-based assays was then studied by measuring antioxidant activity of tea samples and validating against traditional assays. The results showed that the antioxidant activity obtained from the developed assays were not significant difference to those obtained from the traditional assays at 95% confident interval indicating that the developed paper-based assays gave high accuracy. These results indicated that the development of paper-based devices for simultaneous analysis of antioxidant activity is promising to be success in the future.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อ	iv
Abstract	v
สารบัญเรื่อง	vi
สารบัญตาราง	viii
สารบัญภาพ	ix
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2	3
2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC	3
2.1.1 การสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษ	3
2.1.2 การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์แบบกระดาษ	3
2.1.3 ศึกษาความแม่นยำของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีดั้งเดิม	4
2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์แบบกระดาษ	4
2.2.1 การสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษ	4
2.2.2 การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์แบบกระดาษ	5
2.2.3 การศึกษาความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น	5
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปราย	7
3.1 อุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC	7
3.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น	7
3.1.1.1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย $\text{CuCl}_2$	7
3.1.1.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย ammonium acetate	9
3.1.1.3 ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา	10
3.1.2 ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน	11
3.1.2.1 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid	11
3.1.2.2 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid	12
3.1.2.3 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG	13
3.1.2.4 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin	14
3.1.2.5 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox	15
3.1.3 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม	17

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
3.2 อุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	17
3.2.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น	17
3.2.1.1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย Iron (III) chloride	17
3.2.1.2 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย FRAP และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน	20
3.2.2 ผลการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน	22
3.2.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid	22
3.2.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox	24
3.2.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์	25
3.2.3.1 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม	25
3.2.3.2 ผลการศึกษาความเสถียรของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น	27
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	29
4.1 สรุปผลการวิจัย	29
4.2 ข้อเสนอแนะ	30
บทที่ 5 ผลผลิต	31
บรรณานุกรม	32
ประวัตินักวิจัยและคณะ	33

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	ค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธี CUPRAC	16
ตารางที่ 3-2	อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้จากการวิเคราะห์ gallic acid ที่ความเข้มข้น 200-20 $\mu$ g/ml เมื่อใช้ FeCl <sub>3</sub> ความเข้มข้นต่างกันในการเตรียมสารละลาย FRAP reagent	19
ตารางที่ 3-3	สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธี FRAP	22
ตารางที่ 3-4	ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ gallic acid ด้วยวิธี FRAP	23
ตารางที่ 3-5	ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ trolox ด้วยวิธี FRAP	24



## สารบัญภาพ

	หน้า	
รูปที่ 2-1	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC	3
รูปที่ 2-2	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	5
รูปที่ 3-1	การศึกษาความเข้มข้นของ $\text{CuCl}_2$ ที่เหมาะสมใน CUPRAC reagent สำหรับการวิเคราะห์ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM (A) แสดงสี CUPRAC reagent บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ $\text{CuCl}_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid กับ $\text{CuCl}_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)	8
รูปที่ 3-2	การศึกษาความเข้มข้นของ ammonium acetate ที่เหมาะสมใน CUPRAC reagent สำหรับการวิเคราะห์ ascorbic acid เข้มข้น 5mM (A) แสดงสี CUPRAC reagent บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ ammonium acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid กับ ammonium acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)	9
รูปที่ 3-3	(A) แสดงสีของสารละลาย CUPRAC reagent ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (n=3)	10
รูปที่ 3-4	(A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ ascorbic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)	12
รูปที่ 3-5	(A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)	13
รูปที่ 3- 6	(A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ EGCG ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ EGCG ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)	14
รูปที่ 3- 7	(A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)	15

## สารบัญภาพ

	หน้า	
รูปที่ 3- 8	(A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)	16
รูปที่ 3-9	แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา sample 1-5 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)	17
รูปที่ 3-10	กราฟพล็อตระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid เมื่อใช้ $\text{FeCl}_3$ ความเข้มข้นต่างกัน (n = 4)	20
รูปที่ 3-11	แสดงผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง FRAP reagent กับ gallic acid 50 $\mu\text{g/ml}$ (n = 4)	21
รูปที่ 3-12	(A) แสดงการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อสารละลาย gallic acid ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent (B) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid (n = 8)	23
รูปที่ 3-13	(A) แสดงการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อสารละลาย Trolox ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent (B) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย trolox (n = 8)	24
รูปที่ 3-14	แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย $\mu\text{mol GA/g tea}$ ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา ตัวอย่างที่ 1-14 ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) (n = 3)	26
รูปที่ 3-15	แสดงผลการวิเคราะห์ความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสง (n = 3)	27
รูปที่ 3-16	แสดงผลการวิเคราะห์ความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 2 ที่เก็บในตู้เย็น (n = 3)	28

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นสารที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูงเกิดได้จากทั้งกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและมลพิษต่างๆ เช่น โอโซน โลหะหนัก คาร์บอนหรี เมื่ออยู่ในร่างกายสามารถทำลายชีวโมเลกุลที่เข้าอย่างต่อเนืองกันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดความเสียหายแก่โมเลกุลที่ได้รับผลกระทบ เช่น ความเสียหายของ DNA ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ ตีบตัน โรคความจำเสื่อม เป็นต้น นอกจากนี้เมื่ออยู่ในอาหาร อนุมูลอิสระสามารถ เข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันที่อยู่ในอาหารเป็นสาเหตุหลักให้อาหารเน่าเสียได้ง่าย สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) มีความสำคัญต่อการยับยั้งการปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ โดยเข้าทำปฏิกิริยากับ อนุมูลอิสระทำให้ลดความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากลายเป็นโมเลกุลที่เสถียรในที่สุด สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพร นอกจากนี้จะช่วยยับยั้ง การเกิดโรคในคนแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระยังมีส่วนสำคัญในด้านเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย กล่าวคือ สามารถนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหารเพื่อให้อาหารส่งออก ไม่เน่าเสีย ก่อนถึงมือผู้บริโภคทั้งที่อยู่ในที่ห่างไกลทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพิ่มความเชื่อมั่นแก่ผู้บริโภคเกี่ยวกับ ผลิตภัณฑ์อาหารที่มาจากประเทศไทย

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดที่สนใจสามารถทำได้โดยนำพืชตัวอย่างมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยหลากหลายวิธี เช่น วิธี Total radical trapping (TRAP), วิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS<sup>•+</sup>), วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) , วิธี oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC), วิธี cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), วิธี electrochemical estimation of total reducing capacity, และวิธีดีพีพีเอช 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) assay เนื่องจากแต่ละวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีข้อดีข้อเสียและมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระต่างกันไป ทำให้ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีใดวิธีหนึ่งที่เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นในการคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหรือตัวอย่างที่สนใจหนึ่งๆ จำเป็นต้องแบ่งตัวอย่างที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยหลายๆวิธีเพื่อเป็นข้อมูลรายงานเสริมกันในหลายๆด้าน วิธีการศึกษาดังกล่าวทำให้นักวิจัยหรือผู้ที่สนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างหนึ่งๆต้องสิ้นเปลืองเวลาในการวิเคราะห์ด้วยหลายวิธี วิธีวิเคราะห์ส่วนใหญ่ต้องใช้รีเอเจนท์ ปริมาตรระดับ 2-20 mL ต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่าง ทำให้เปลืองตัวอย่างและรีเอเจนท์ในการวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังต้องใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างด้วยแต่ละวิธียิ่งทำให้การวิเคราะห์ล่าช้าไปยิ่งขึ้น ภายหลังจึงมีการคิดค้นการวิเคราะห์แบบ รู้อผล

รวดเร็ว (high throughput analysis) โดยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนภาตหลุม ( 96-well microtiter plate) และวัดค่าการดูดกลืนแสงของหลายตัวอย่างที่ทำการศึกษา ทำให้สามารถศึกษา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลายตัวอย่างพร้อมกันได้ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่เนื่องจากจำเป็นต้องใช้เครื่อง microplate reader spectrophotometer ที่มีราคาแพง เป็นเครื่องมือเฉพาะที่ไม่ได้มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป ผู้ใช้จำเป็นต้องมี ความรู้เกี่ยวกับการใช้เครื่องและซอฟต์แวร์การใช้

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper based device) เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลายวิธีพร้อมๆกันในหนึ่งตัวอย่างในการวิเคราะห์ตัวอย่างส่วนสกัดจากพืช สมุนไพรที่สนใจเพียงหนึ่งครั้ง โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ที่ได้พัฒนาขึ้นมีข้อดีกว่าวิธีวิเคราะห์ที่ละวิธีในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบเดิมดังนี้ ซึ่งทำได้โดย หยดรีเอเจนท์ของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีลงบนบริเวณตรวจวัดบนอุปกรณ์แบบกระดาษที่ได้สร้าง ส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำให้มีรูปร่างเป็นหลายๆแฉก ปลายแฉกเรียกว่าบริเวณตรวจวัด ตรงกลางของอุปกรณ์ เป็นบริเวณใส่ตัวอย่างที่เชื่อมต่อกับแฉกทุกแฉก จากนั้นหยดตัวอย่าง สารต้านอนุมูลอิสระลงไปยังบริเวณใส่ตัวอย่าง สารตัวอย่าง จะไหลซึมไปยังแต่ละแฉกของกระดาษเท่าๆกัน ด้วยแรงแคปิลลารีจนถึงบริเวณตรวจวัดและทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์ เกิดการเปลี่ยนแปลงสีขึ้นซึ่งจะ สัมพันธ์กับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง ความเข้มสีที่บริเวณตรวจวัดสามารถวิเคราะห์ได้ โดยใช้โปรแกรมประมวลผลภาพ จากวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวจะเห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สามารถใช้ง่ายประหยัดเวลาและต้นทุนในการวิเคราะห์ มีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการวิเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระ ในตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในรายงานวิจัยนี้จะได้แสดงผลการทดลองเบื้องต้นเพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์แบบกระดาษแบบวิธีเดี่ยว เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาสามารถเกิดขึ้นได้บนอุปกรณ์จริง จึงจะได้นำวิธีที่ศึกษาไปทำการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ที่มีรูปแบบสำหรับการวิเคราะห์หลายวิธีพร้อมๆกัน โดยวิธีที่ทำการศึกษาเบื้องต้นได้แก่วิธี CUPRAC และวิธี FRAP

## 1.2 วัตถุประสงค์

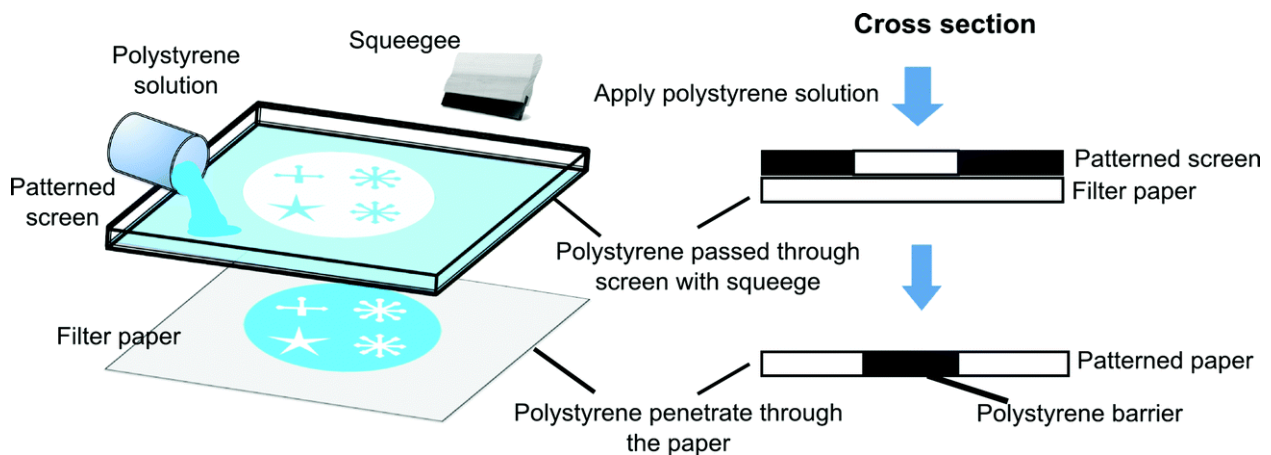
เพื่อพัฒนาอุปกรณ์แบบกระดาษเบื้องต้นสำหรับตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในแต่ละวิธีเพื่อนำไปต่อยอดในการสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษแบบหลายวิธีพร้อมๆกัน ทำให้ได้อุปกรณ์พร้อมใช้งาน ที่สามารถใช้งานได้อย่างสะดวก รวดเร็ว ราคาในการวิเคราะห์ต่ำ ไม่สิ้นเปลืองสารเคมีและรีเอเจนท์ในการวิเคราะห์

## บทที่ 2 วิธีการทดลอง

### 2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC

#### 2.1.1 การสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษ

สร้างอุปกรณ์ด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์ (polymer screen-printing method) (Sameenoi, Nongkai, Nouanthavong, Henry, & Nacapricha, 2014) เตรียมโดยการชั่ง polystyrene ละลายด้วย toluene ในอัตราส่วน 1.25g 5 : mL จากนั้นนำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator เพื่อไล่ฟองอากาศ ประมาณ 5- นาที 10 แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเทบนบล็อคสกรีนที่อยู่บนกระดาษกรอง ปาดสารละลายให้ซึมผ่านสกรีนไปยังกระดาษรองให้แห้ง ติดด้านหลังด้วยสก็อตเทปก่อนนำไปใช้ ในการทดสอบเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารละลายที่นำมาทดสอบจะเห็นได้ว่ารูปร่างของอุปกรณ์ขึ้นอยู่กับแบบบนบล็อคสกรีน ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอุปกรณ์แบบกระดาษที่มีรูปร่างแบบหลุม) well format ทำได้โดยสกรีนให้มีลักษณะเป็นหลุมดังรูปที่ 1 โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ มิลลิเมตร 5



รูปที่ 2-1 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC

#### 2.1.2 การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์แบบกระดาษ

หยดสารละลาย  $\text{CuCl}_2$  เข้มข้น 4 mM จำนวน 2  $\mu\text{L}$  รอให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย ammonium acetate เข้มข้น 10 mM จำนวน 2  $\mu\text{L}$  รอให้แห้ง แล้วหยดสารละลาย neocuproine เข้มข้น 12 mM จำนวน 2  $\mu\text{L}$  รอให้แห้ง สุดท้ายหยดสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานชนิดต่างๆหรือตัวอย่างที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 2  $\mu\text{L}$  ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา นาที สแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ

เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นด้วยโปรแกรม imageJ แล้วผลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ทำการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ เช่น ความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{CuCl}_2$  เวลาในการเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธีการทดลองคล้ายกัน

### 2.1.3 ศึกษาความแม่นยำของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีดั้งเดิม

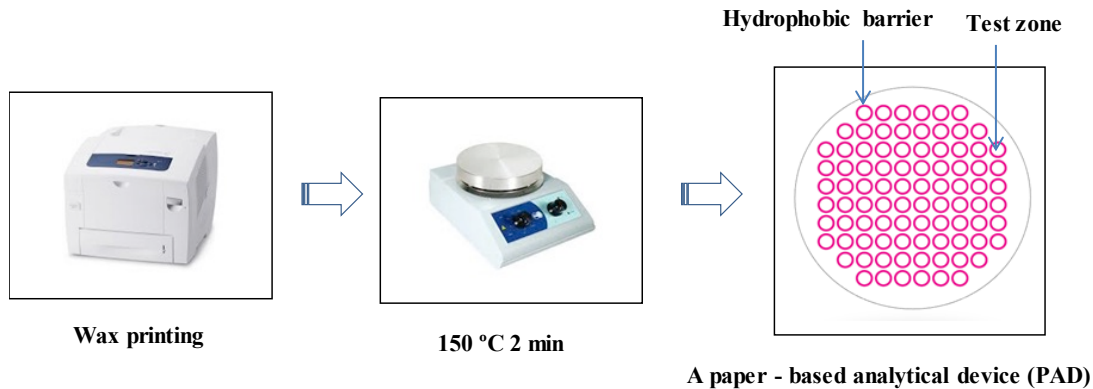
ศึกษาความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างชา เตรียมตัวอย่างโดย ชั่งตัวอย่างชา 2 กรัม ละลายในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ  $80^\circ\text{C}$  ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองตะกอนชาออก นำน้ำชาที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นตามที่ได้กล่าวในหัวข้อ 2.1.2 โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ epigallocatechin gallate เป็นสารมาตรฐานจากนั้นรายงานค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย  $\mu\text{mol gallic acid/g tea}$

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาที่เตรียมได้ด้วยวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม โดย นำสารละลายมาตรฐาน gallic acid 0–2 mM และสารตัวอย่างชา เดิมสารละลายรีเอเจนท์ CUPRAC (สารละลาย  $\text{CuCl}_2$  เข้มข้น 1M สารละลาย + ammonium acetate เข้มข้น 1 M สารละลาย + neocuproine 7.5 mM อย่างละ 1 mL) แล้วเติมน้ำ DI ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 4.1mL ตั้งให้เกิดปฏิกิริยา นาที แล้ว 30 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น นาโนเมตร ด้วยเครื่อง 455spectrophotometer นำผลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา โดยแสดงในหน่วย gallic acid equivalent (GAE)  $\mu\text{mol/g tea}$  นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

## 2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์แบบกระดาษ

### 2.2.1 การสร้างอุปกรณ์แบบกระดาษ

สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีพิมพ์ด้วยไข (wax printing method) (Carrilho, Martinez, & Whitesides, 2009) โดยสร้างบริเวณ ส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) ด้วยการพิมพ์หลุม (well) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm บนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ด้วยเครื่องพิมพ์ Fuji Xerox รุ่น ColorQube 8870 ไว้สำหรับเป็นบริเวณวิเคราะห์สาร (test zone) ดังรูปที่ 1 จากนั้นให้ความร้อนด้วย Hotplate ยี่ห้อ FALC รุ่น F series อุณหภูมิ  $150^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้หมึกซึมผ่านกระดาษกรองจากด้านบนจนถึงด้านล่าง และติดเทปใสด้านล่างของกระดาษกรอง เพื่อป้องกันการรั่วซึมระหว่างการวิเคราะห์



รูปที่ 2-2 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

### 2.2.2 การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์แบบกระดาษ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สามารถทำได้โดยปเปตสารละลาย FRAP ซึ่งเตรียมได้จากการผสมสารละลาย 300 mM sodium acetate buffer pH 3.6 ร่วมกับสารละลาย 4.0 mM iron (III) chloride และสารละลาย 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ในอัตราส่วน 10:1:1 ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่มีบริเวณตรวจวัด เป็นแบบหลุม หลุมละ 5  $\mu\text{L}$  จากนั้นปเปตสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหลุมละ 5  $\mu\text{L}$  ปล่อยให้สารทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที ใช้โดรเป่าลม เป่าให้แห้ง แล้วนำไปสแกนภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์ canon LiDE 110 ตรวจวัดค่าความเข้มสีด้วย โปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ

### 2.2.3 การศึกษาความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

ศึกษาความแม่นยำของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างชา เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างชา 2 กรัม ละลายในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองตะกอนชาออก นำน้ำชาที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นตามที่ได้กล่าวในหัวข้อ 2.1.2 โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ epigallocatechin gallate เป็นสารมาตรฐานจากนั้นรายงานค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย  $\mu\text{mol}$  gallic acid/g tea

จากนั้นนำชาตัวอย่างเดียวกันไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP แบบดั้งเดิม โดยเริ่มต้น สร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ gallic acid โดยปเปตสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 ml ใส่ในขวด vial จากนั้นปเปตสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 mM ปริมาตร 0.1

ml ปิดเต้าน้ำกลั่นปริมาตร 0.3 ml เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้สารทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm นำค่าการดูดกลืนแสงไปทำการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้น gallic acid และค่าการดูดกลืนแสงเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงของ gallic acid

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

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



## บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปราย

### 3.1 อุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC

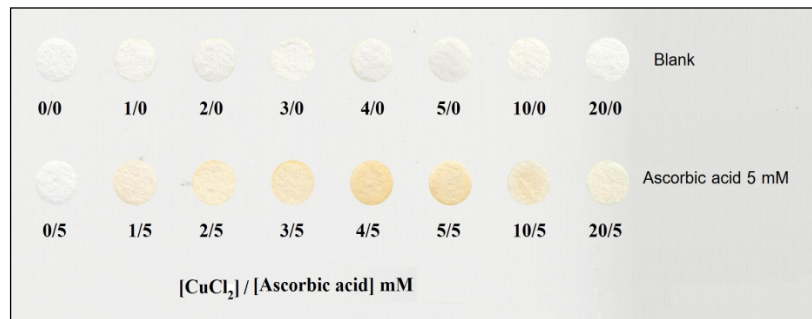
#### 3.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี CUPRAC ได้แก่

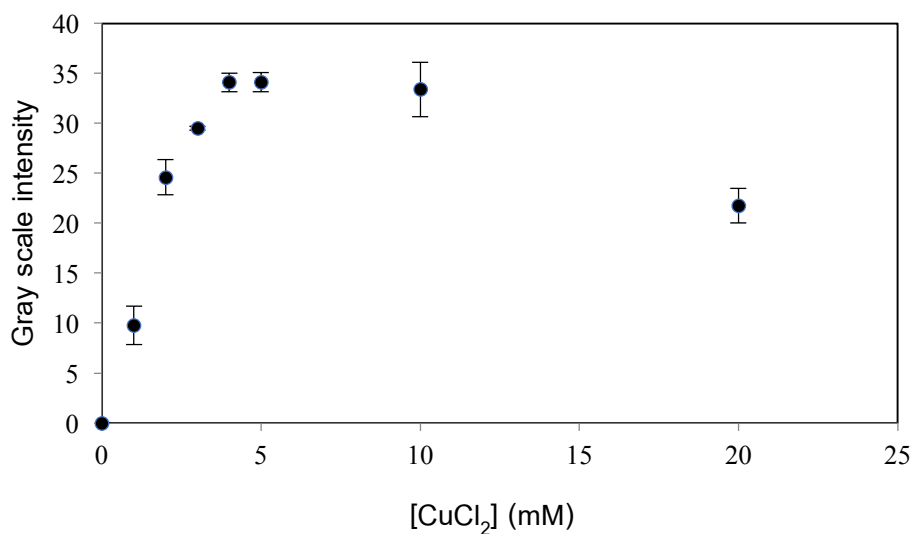
##### 3.1.1.1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย $\text{CuCl}_2$

เนื่องด้วยการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC เป็นการวัดการเพิ่มขึ้นของสัญญาณของ CUPRAC reagent เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ  $\text{CuCl}_2$  ในการนำไปวิเคราะห์จึงเป็นปัจจัยสำคัญ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจะต้องเป็นความเข้มข้นที่ให้สัญญาณที่สูงเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปเพียงเล็กน้อย งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ  $\text{CuCl}_2$  ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน โดยการ ศึกษาความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  ตั้งแต่ 1–20 mM โดยหยดสารละลาย  $\text{CuCl}_2$  จำนวน 2  $\mu\text{L}$  ลงบนอุปกรณ์แบบกระดาษ ( $n=3$ ) ซึ่งมีการทำ blank ควบคู่กับทุกความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  รอให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย ammonium acetate เข้มข้น 100mM จำนวน 2  $\mu\text{L}$  รอให้แห้ง แล้วหยดสารละลาย neocuproine เข้มข้น 12 mM จำนวน 2  $\mu\text{L}$  รอให้แห้ง สุดท้ายหยดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid เข้มข้น 5 mM จำนวน 2  $\mu\text{L}$  ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนสแกนภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี นำค่าความเข้มสี มาสร้างกราฟ โดยพลอตระหว่างความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  และความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM แสดงในรูปที่ 3-1

A



B

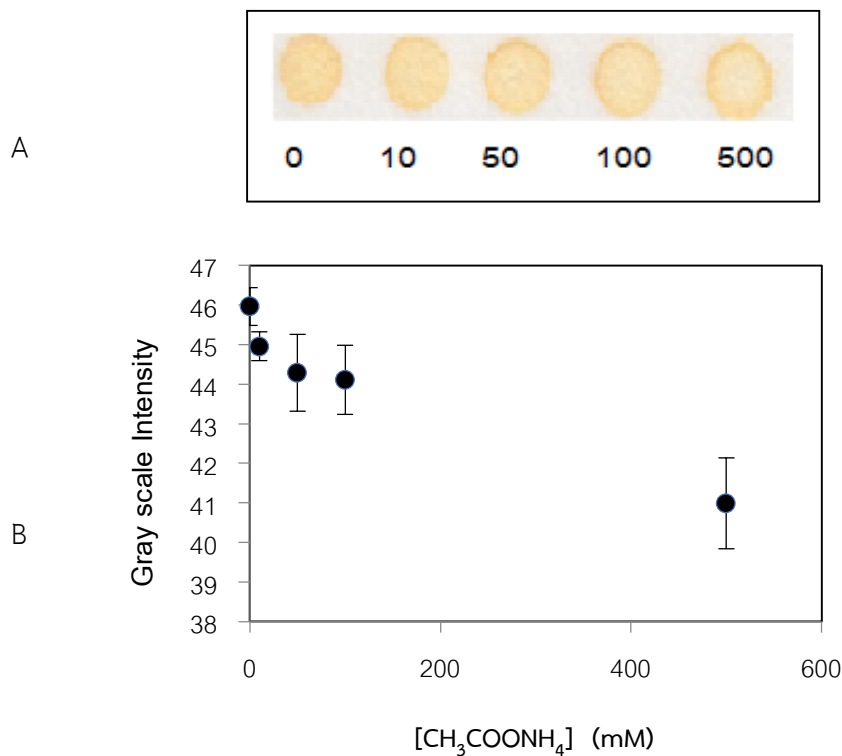


รูปที่ 3-1 การศึกษาความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  ที่เหมาะสมใน CUPRAC reagent สำหรับการวิเคราะห์ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM (A) แสดงสี CUPRAC reagent บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่  $\text{CuCl}_2$  ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid กับ  $\text{CuCl}_2$  ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ( $n=3$ )

จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  และความเข้มสี CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid เข้มข้น 5 mM พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent ก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วยและคงที่ที่ความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  เท่ากับ 4 mM ขึ้นไปในการทดลองนี้จึงเลือก  $\text{CuCl}_2$  ที่มีความเข้มข้น 4 mM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากให้สัญญาณที่สูงภายหลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

### 3.1.1.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย ammonium acetate

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

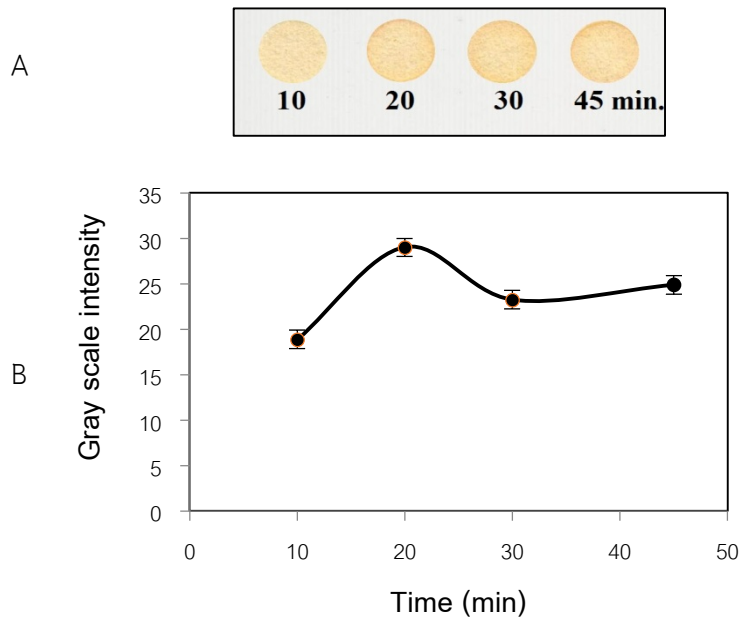


รูปที่ 3-2 การศึกษาความเข้มข้นของ ammonium acetate ที่เหมาะสมใน CUPRAC reagent สำหรับการวิเคราะห์ ascorbic acid เข้มข้น 5mM (A) แสดงสี CUPRAC reagent บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ ammonium acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) กราฟพลอตระหว่างความเข้มสีของ CUPRAC reagent ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid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

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

### 3.1.1.3 ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

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



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

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

### 3.1.2 คีตกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบ กระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

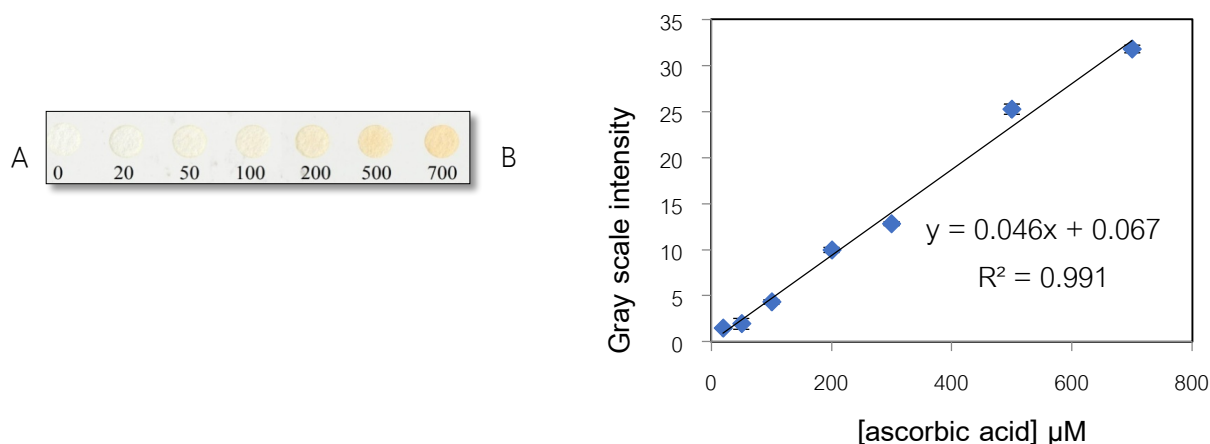
#### 3.1.2.1 คีตกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid

ascorbic acid เป็นรูปที่ออกฤทธิ์ ของวิตามินซี วิตามินซีมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ที่สามารถละลายน้ำได้ดีมาก คงตัวในอากาศเมื่ออยู่ในสภาวะบริสุทธิ์ และแห้ง แต่สลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อโดนความชื้นและแสง ascorbic acid แสดงสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น บริเวณพันธะคู่ของกรดไขมัน โดยทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นด้วยการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันไปเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น และจับกับโลหะไอออนที่เป็นสารเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ascorbic acid ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-4 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ ascorbic acid เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากสารเชิงซ้อน Cu(II)-neocuproine complex ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid ส่งผลให้ไอออน Cu(II) ถูกรีดิวซ์กลายเป็น Cu (I) เกิดสารเชิงซ้อน Cu(I)- neocuproine complex ที่มีสีเหลืองส้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3-4 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ ascorbic acid พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ ascorbic acid เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 3-4 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ ascorbic acid เท่ากับ 20-700  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.991$ )

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ ascorbic acid ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง ความเข้มข้นละ 10  $\mu\text{M}$  พบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 13.3-17.7 (n=10) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน ascorbic acid

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด(LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ ascorbic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 13  $\mu\text{M}$



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

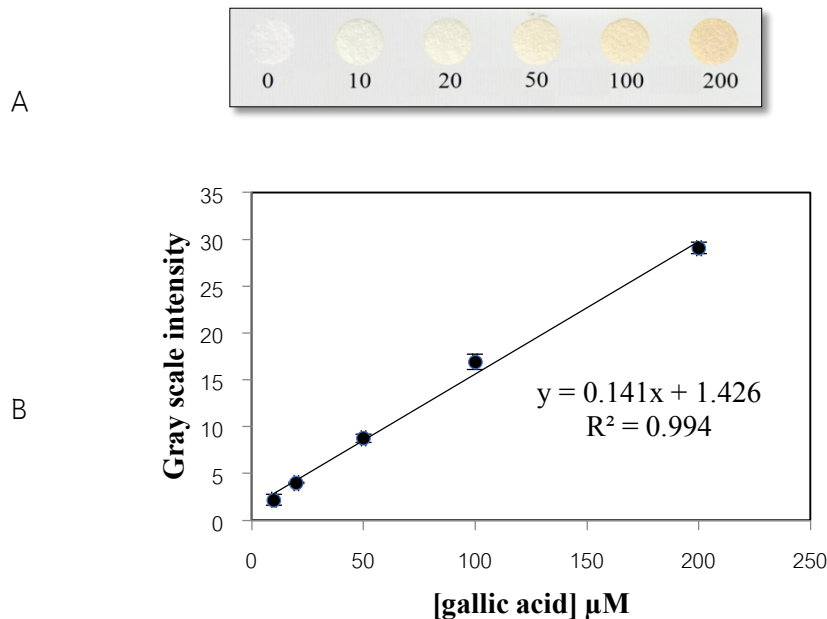
### 3.1.2.2 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

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

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ gallic acid ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-5 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ gallic acid เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3-5 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ gallic acid เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 3-5 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ gallic acid เท่ากับ 10–200 μM ( $R^2 = 0.994$ )

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ gallic acid ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 7.3 –15.1 (n=10) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน gallic acid

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ gallic acid ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 5.7 μM



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

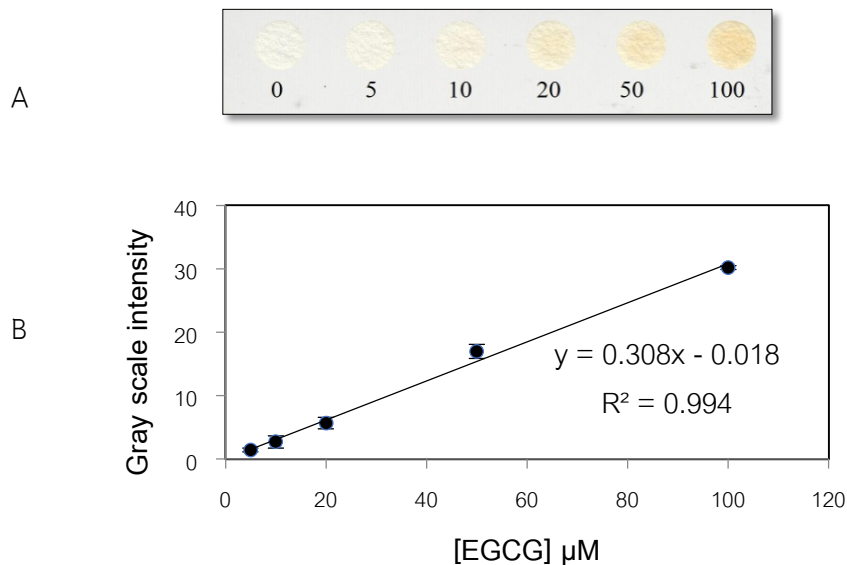
### 3.1.2.3 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน EGCG

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

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ EGCG ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-6 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ EGCG เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3-6 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ EGCG พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ EGCG เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 3-6 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ EGCG เท่ากับ 5-100  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.994$ )

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ EGCG พบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.93-14.4 (n=10) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน EGCG

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ EGCG ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 1.2  $\mu\text{M}$



รูปที่ 3- 6 (A) แสดงลักษณะสีของ CUPRAC reagent หลังจากทำปฏิกิริยากับ EGCG ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดงค่าความเข้มสี (gray scale intensity) หลังทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย CUPRAC reagent กับ EGCG ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)

### 3.1.2.4 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน quercetin

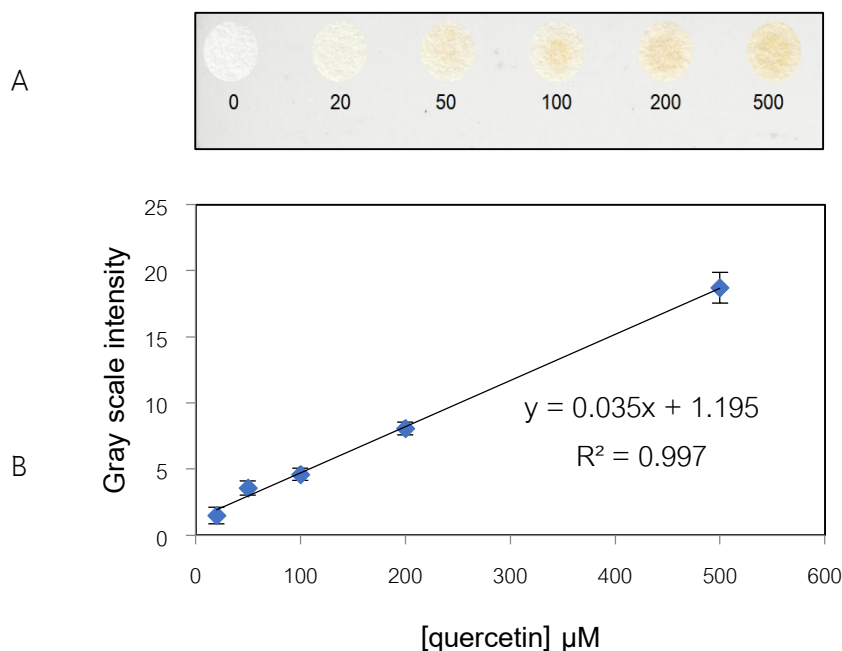
quercetin เป็นสารพฤกษเคมีที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด มักจะอยู่ตามเปลือกไม้และผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล, ชา, หัวหอม และไวน์แดง เป็นไบโอฟลาโวนอยด์ที่มีประสิทธิภาพต่อต้านอนุมูลอิสระและลดอาการอักเสบ (Boots, Haenen, & Bast, 2008)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ quercetin ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-7 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ quercetin เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3-7 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ quercetin พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ quercetin เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 3-7 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ quercetin เท่ากับ 20-500  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.997$ )

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ quercetin ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 4.70-9.80 (n=10) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน quercetin

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด(LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ quercetin ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 21  $\mu\text{M}$





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

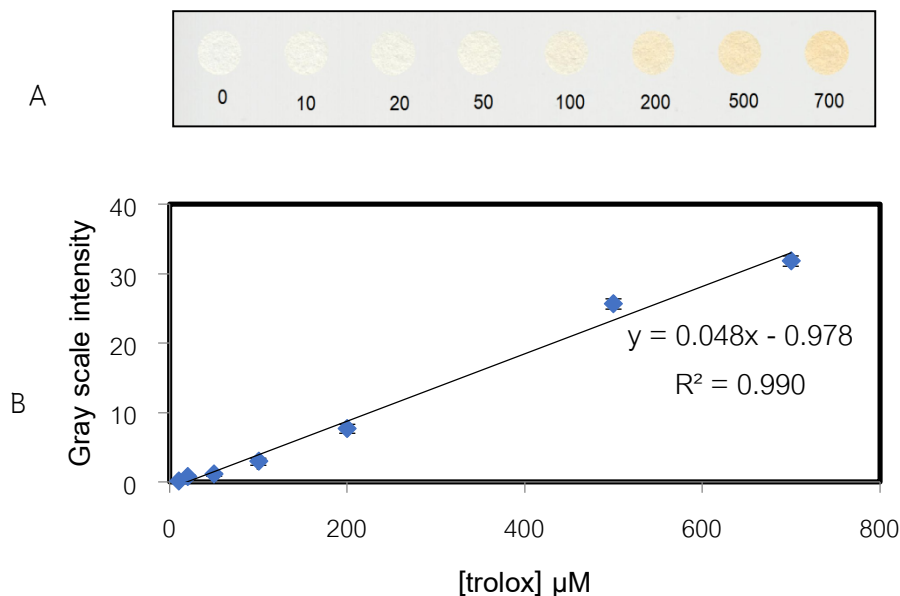
### 3.1.2.5 ศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

trolox เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคน เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างที่ทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบหลายวิธี ในการวิจัยนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (van den Berg, Haenen, van den Berg, & Bast, 1999)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ trolox ด้วยวิธี CUPRAC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-8 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ trolox เพิ่มขึ้นความเข้มสีของ CUPRAC reagent มีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3-8 A จากนั้นพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ trolox พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ trolox เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 3-8 B และกราฟดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ trolox เท่ากับ 10-700 μM ( $R^2 = 0.990$ )

จากนั้นศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ trolox ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 10 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 3.95-22.8 (n=10) แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน trolox

วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าความเข้มข้นของ trolox ที่ต่ำที่สุดที่วิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 6.4 μM



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

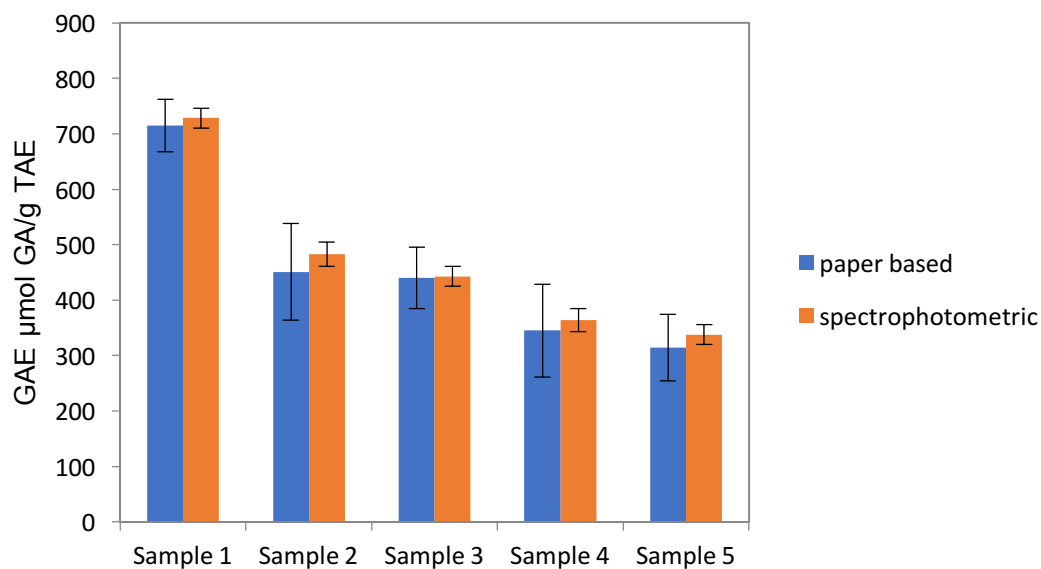
จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถสรุปค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ได้ดังนี้

ตารางที่ 3-1 ค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยวิธี CUPRAC

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

### 3.1.3 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid, gallic acid, EGCG, quercetin และ trolox พบว่าสามารถทำได้โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ปริมาตร 2  $\mu\text{L}$  และ CUPRAC reagent ปริมาตรรวม 6  $\mu\text{L}$  สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกันและใช้สารในการวิเคราะห์เพียง 8  $\mu\text{L}$  ให้ค่าการวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงสูง แสดงให้เห็นว่าวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์ได้จริง ขั้นตอนต่อไปจึงทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในใบชาแห้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธีแบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วย  $\mu\text{mol}$  gallic acid equivalent/g tea ซึ่งหมายถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบ  $\mu\text{mol}$  gallic acid ต่อหนึ่งกรัมของชา ซึ่งมีการทำ sample blank ควบคู่กับทุกตัวอย่างชาจากการวิเคราะห์ได้ผลการทดลองดังแสดงรูปที่ 3-9



รูปที่ 3-9 แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย  $\mu\text{mol}$  GA/g tea ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชา sample 1-5 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างชาทั้ง 5 ชนิดนำค่าจากการทดลองไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติโดยใช้ linear regression ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธีแบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) หากผลการวิเคราะห์

ตัวอย่างทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันจะได้ค่า slope และ intercept ของกราฟ ใกล้เคียง 1 และ 0 ตามลำดับ (Miller et al., 2000)

### 3.2 อุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

#### 3.2.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

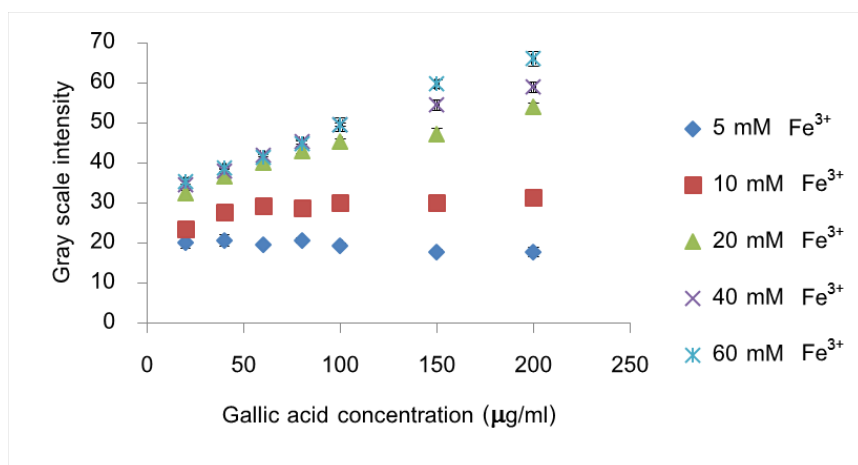
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีFRAP ได้แก่

##### 3.2.1.1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย Iron (III) chloride

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP นั้นอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสีของ FRAP reagent ของสารประกอบเชิงซ้อนของ  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{3+}$  ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ  $^{+3}\text{Fe}$  จะถูกรีดิวซ์กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{2+}$  ซึ่งมีสีน้ำเงิน ความเข้มสีที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง เริ่มต้นทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  จะต้องให้สัญญาณที่สูงสามารถตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ที่ความเข้มข้นที่ต่ำ ๆ ศึกษาสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5–60 mM เริ่มจากทำการเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 mM sodium acetate buffer pH 3.6 รวมกับสารละลาย  $\text{FeCl}_3$  ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ 10 mM TPTZ ในอัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นนำ FRAP reagent ที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 150 และ 200  $\mu\text{g/ml}$  ทำ blank เปรียบเทียบใน ทุกความเข้มข้นของ  $^{+3}\text{FeCl}$  ที่ศึกษา ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 5 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-2 ซึ่ง แสดงความเข้มสีในการวิเคราะห์ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้  $^{+3}\text{Fe}$  ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า สำหรับทุก ๆ ความเข้มข้นของ  $^{+3}\text{Fe}$  เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ gallic acid จะทำให้ความเข้มสีเพิ่มขึ้น นำค่าความเข้มสีมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid สำหรับทุก ๆ ความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{3+}$  ที่ศึกษาดังแสดงในรูปที่ 3-10

ตารางที่ 3-2 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้จากการวิเคราะห์ gallic acid ที่ความเข้มข้น 200-20  $\mu$  g/ml เมื่อใช้  $FeCl_3$  ความเข้มข้นต่างกันในการเตรียมสารละลาย FRAP reagent

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

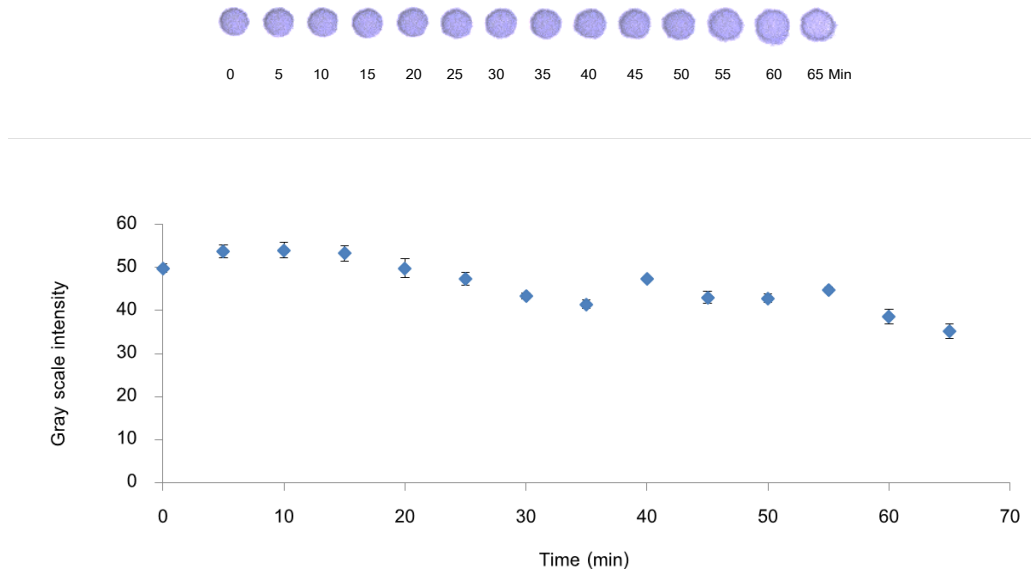


รูปที่ 3-10 กราฟพล็อตระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid เมื่อใช้  $\text{FeCl}_3$  ความเข้มข้นต่างกัน (n = 4)

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

### 3.2.1.2 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย FRAP และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง FRAP reagent และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml โดยการหยดสารละลาย FRAP รีเอเจนต์ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษแล้วจึงหยดสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ลงไป ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ก่อนที่จะเป่าให้แห้งด้วยไดร์เป่าผมแล้วถ่ายภาพ ทำการพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสี กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาได้ผลการทดลองดังแสดงดังรูปที่ 3-11



รูปที่ 3-11 แสดงผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง FRAP reagent กับ gallic acid 50  $\mu\text{g/ml}$  (n = 4)

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง FRAP รีเอเจนต์ กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ที่มีความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  พบว่า ที่เวลา 5 นาที ความเข้มสีจะมีค่ามากที่สุดและจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเมื่อเวลาผ่านไประยะเวลาหนึ่งที่หยดลงไปบน FRAP reagent อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนั้นเกิดการระเหยแห้งไป ทำให้โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนของ  $\text{Fe}^{+3}$  ]Fe(TPTZ)] ทำให้การเกิดปฏิกิริยา เปลี่ยนแปลงไป ( $^{+3}$  กับ ได้น้อยลง ส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์ gallic acid intensity ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าระยะเวลา 5 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้น

ดังนั้น การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ดังตาราง 3-3

ตารางที่ 3-3 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธี FRAP

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

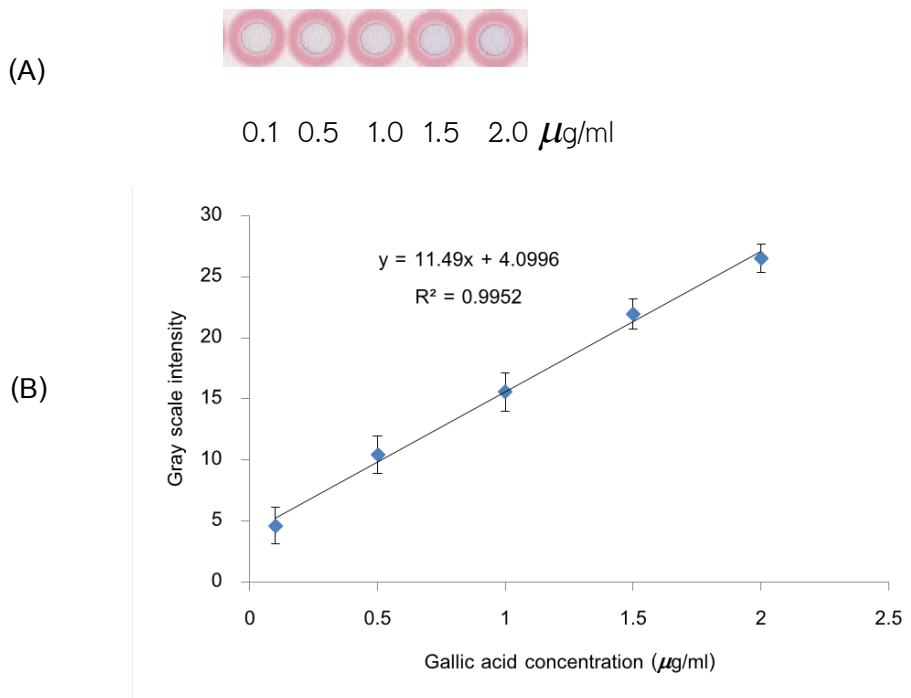
### 3.2.2 ผลการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

#### 3.2.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid

gallic acid หรือชื่อในระบบ IUPAC คือ 3,4,5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ  $C_7H_6O_5$  gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกต้นไผ่ และพืชอื่น ๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยาง gallic acid สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี นอกจากนี้ gallic acid ยังช่วยป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียดเมื่ออายุมากขึ้นซึ่งช่วยลดอัตราการป่วยโรคหัวใจ และโรคมะเร็งในผู้สูงอายุ (Phakthong et al., 2014)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ gallic acid ด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-12 (A) ซึ่งจะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ gallic acid เพิ่มขึ้น ความเข้มสีจะมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนของ  $Fe^{+3}([Fe(TPTZ)^{+3}]_2)$  ที่มีสีน้ำตาลอ่อน จะทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid แล้วถูกรีดิวซ์ไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ  $Fe^{2+}([Fe(TPTZ)_2]^{2+})$  ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงินที่เข้มขึ้น เมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ gallic acid จะได้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1–2.0  $\mu\text{g/ml}$  โดยมีค่า  $R^2 = 0.9952$  ดังแสดงในรูปที่ 3-12 (B)





รูปที่ 3-12 (A) แสดงการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อสารละลาย gallic acid ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent (B) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid (n = 8)

ตารางที่ 3-4 ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ gallic acid ด้วยวิธี FRAP

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

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

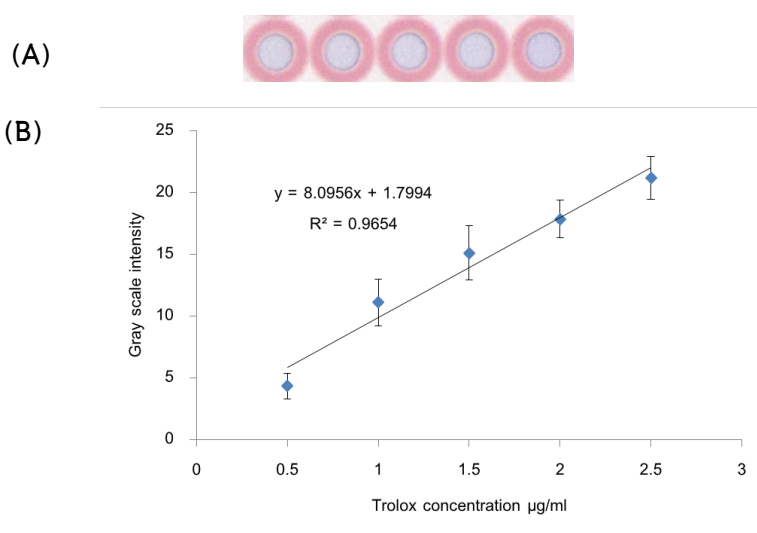
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน gallic acid

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

### 3.2.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

trolox หรือชื่อในระบบ IUPAC คือ 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid มีสูตรโมเลกุลคือ  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$  เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายแอลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิกมีทำให้สามารถละลายได้ดีในน้ำ จึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันที นักวิจัยนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (van den Berg et al., 1999)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-13 (A) ซึ่งจะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของ Trolox เพิ่มขึ้น ความเข้มสีจะมีค่าเพิ่มขึ้นคล้ายกับผลที่ปรากฏเมื่อวิเคราะห์ เมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสี gallic acid กับความเข้มข้นของ trolox จะได้กราฟมาตรฐานที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของ trolox เท่ากับ 0.5-2.5  $\mu\text{g/ml}$  โดยมีค่า  $R^2 = 0.9654$  ดังแสดงในรูปที่ 3-13 (B)



รูปที่ 3-13 (A) แสดงการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อสารละลาย Trolox ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP reagent

(B) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย trolox (n = 8)

ตารางที่ 3-5 ผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ trolox ด้วยวิธี FRAP

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

จากผลการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์ Trolox ที่มีความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงความเข้มข้นละ 8 ซ้ำพบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 8.26-17.05 (n = 8) แสดงให้เห็นว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน trolox

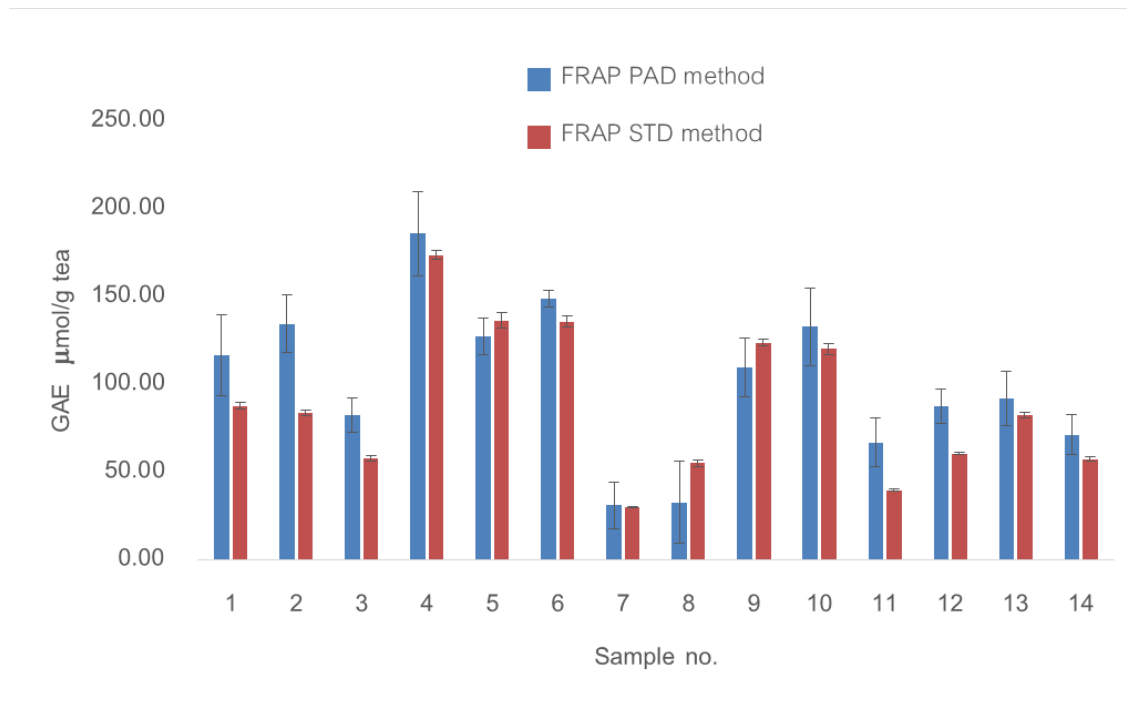
การวิเคราะห์ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น พบว่าความเข้มข้นของ gallic acid ที่ต่ำที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.30  $\mu\text{g/ml}$

### 3.2.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์

#### 3.2.3.1 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม

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

หมายถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบ  $\mu\text{mol gallic acid}$  ต่อหนึ่งกรัมของชา ซึ่งมีการทำ sample blank ควบคู่กับทุกตัวอย่างชา จากการวิเคราะห์ได้ผลการทดลองดังแสดงรูปที่ 3-14

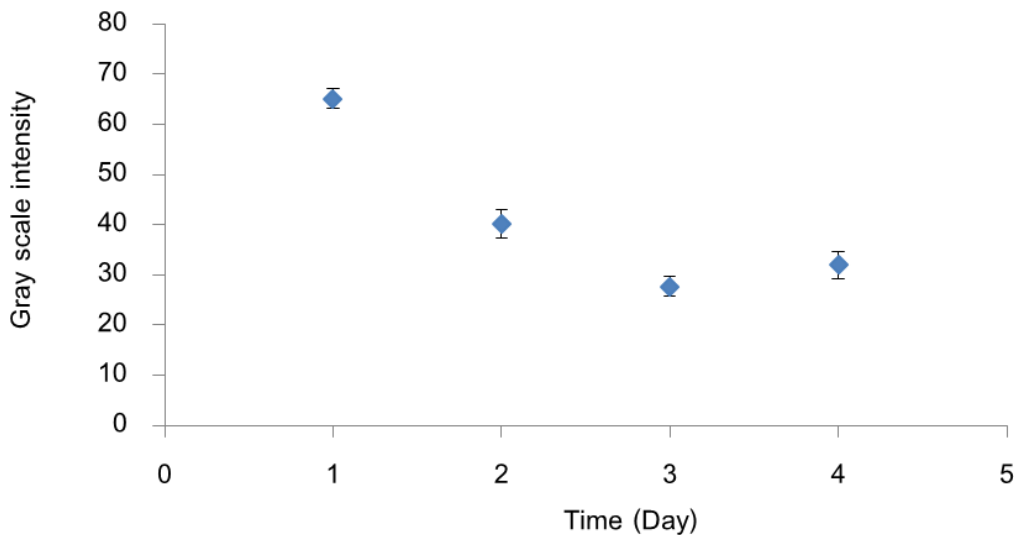


รูปที่ 3-14 แผนภูมิแท่งแสดง GAE ในหน่วย  $\mu\text{mol GA/g tea}$  ของการวิเคราะห์ตัวอย่างชาตัวอย่างที่ 1-14 ด้วยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based assay) และวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) ( $n = 3$ )

จากการทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีดั้งเดิมด้วย t-test: paired two sample for means (two-tail test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ค่า  $t_{\text{stat}}$  มีค่าเท่ากับ 2.09 และค่า t Critical two-tail มีค่าเท่ากับ ซึ่งค่า 2.18  $t_{\text{critical}}$  two-tail มีค่ามากกว่า  $t_{\text{stat}}$  แสดงให้เห็นว่าค่า GAE ที่วิเคราะห์ได้ระหว่างวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น และวิธีแบบดั้งเดิม มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เป็นการยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แม่นยำเทียบเท่ากับวิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม โดยวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น เป็นวิธีที่ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในปริมาณน้อย สามารถช่วยลดของเสียที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ได้มาก สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้พร้อมกันหลายตัวอย่าง

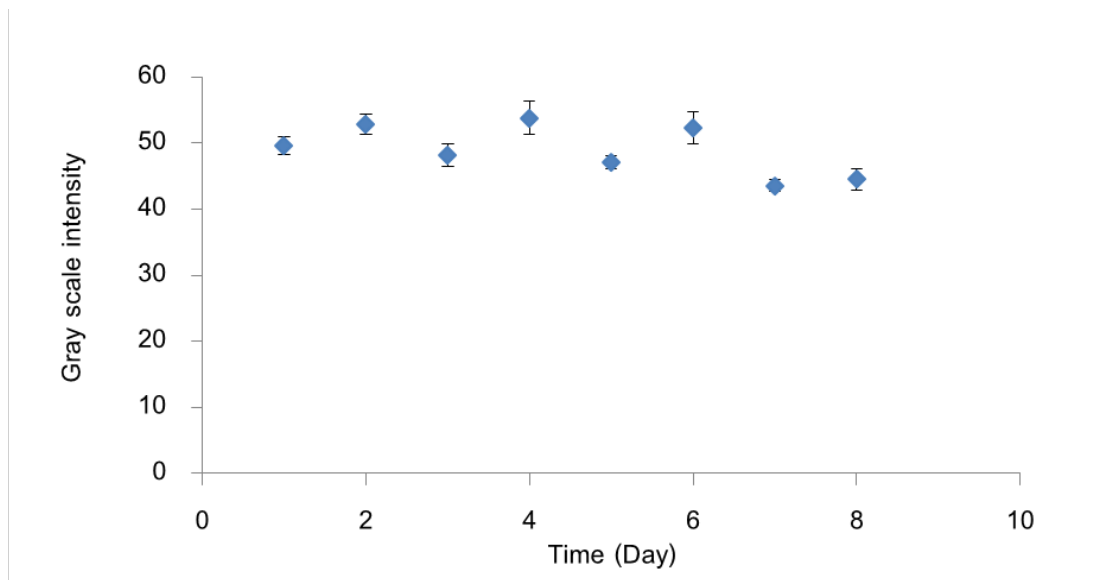
### 3.2.3.2 ผลการศึกษาความเสถียรของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

เมื่อนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสงแดด และกลุ่มที่ 2 ที่นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น มาทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน 50  $\mu\text{g/ml}$  gallic acid ทำการวิเคราะห์ความเข้มสี เป็นระยะเวลาต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการพล็อตค่าความเข้มสีของแต่ละวันเปรียบเทียบกันได้ พบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 มีผลการวิเคราะห์ความเข้มสีที่ลดต่ำลงในแต่ละวัน 1 รักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากแสดงว่าอุปกรณ์กระดาษที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่เสถียรเมื่อเก็บเมื่ออุปกรณ์ตรวจวัดที่หยดรีเอเจนต์ลงไปได้รับความร้อนแล้วเกิดการสลายตัวไป ทำให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ทำให้ผลการวิเคราะห์ความเข้มสีมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงในรูปที่ 3-15



รูปที่ 3-15 แสดงผลการวิเคราะห์ความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 1 ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้ถูกแสง (n = 3)

สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 2 ที่ถูกเก็บไว้ในตู้เย็นจะมีผลการวิเคราะห์ความเข้มสีที่ค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเสถียรเมื่อทำการเก็บรักษาไว้โดยการแช่เย็น ซึ่งสาเหตุที่อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนี้สามารถที่จะให้ผลการวิเคราะห์ความเข้มสีที่คงที่ น่าจะมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิที่เย็น และความชื้นจะช่วยให้รีเอเจนต์มีความเสถียรทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีแม้จะเก็บไว้เป็นเวลานานมากกว่าหนึ่งสัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 3-16



รูปที่ 3-16 แสดงผลการวิเคราะห์ความคงทนของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกลุ่มที่ 2 ที่เก็บในตู้เย็น (n = 3)

## บทที่ 4

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

#### 4.1 สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based device) โดยวิธี CUPRAC และ FRAP โดยวิธี CUPRAC อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเชิงซ้อนที่ไม่มีสีของ Cu(II)-neocuproine complex กับสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่รีดิวซ์ Cu(II) กลายเป็นสารเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproine complex ที่มีสีเหลืองส้ม ความเข้มสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง โดยเบื้องต้นได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CuCl<sub>2</sub> ความเข้มข้นของ ammonium acetate และ ระยะเวลาที่เหมาะสม โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระคือ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CuCl<sub>2</sub> เท่ากับ 4 mM ความเข้มข้นของ ammonium acetate เท่ากับ 10 mM และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 20 นาที จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมไปศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) คือ ช่วงความเป็นเส้นตรง ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ค่าขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) และค่าความสามารถในการทำซ้ำ (%RSD) โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ คือ ascorbic acid, trolox, EGCG, gallic acid และ quercetin และศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี CUPRAC แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยใช้ตัวอย่างชาชนิดชง 5 ยี่ห้อ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างชารายงานเป็นค่า gallic acid equivalent (GAE)  $\mu\text{mol/g tea}$  พบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษร่วมกับวิธี CUPRAC ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ สามารถวิเคราะห์ได้ทีละหลายๆ ตัวอย่าง ใช้ในการคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงในการตรวจวัด ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์น้อย มีราคาถูก น้ำหนักเบาและสามารถนำไปตรวจภาคสนามได้อย่างแม่นยำ

สำหรับอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP นั้น อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเชิงซ้อน  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  (Ferric-tripyridyltriazine complex) กับสารต้านอนุมูลอิสระ แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากน้ำตาล เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินม่วง ของสารเชิงซ้อน  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  (Ferrous-tripyridyltriazine complex) โดยความเข้มของสีน้ำเงินม่วงจะแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง โดยในการวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย iron(III)chloride ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารละลาย FRAP reagent ที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีน้ำเงินที่ชัดเจนที่สุด คือความเข้มข้น 60 mM และได้ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการปล่อยให้สารละลาย FRAP

reagent ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง ก่อนที่จะทำการเป่าแห้ง พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 5 นาที ผลการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ (analytical features) ได้แก่ช่วงความเป็นเส้นตรง พบว่าสำหรับสารต้านอนุมูลอิสระ gallic acid มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในความเข้มข้นที่ต่ำคือ 0.1–2.0  $\mu\text{g/ml}$  ส่วน trolox อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.5–2.5  $\mu\text{g/ml}$  ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัด gallic acid มีค่าเท่ากับ 0.07  $\mu\text{g/ml}$  ส่วน trolox มีค่าเท่ากับ 0.30  $\mu\text{g/ml}$  ค่าความสามารถในการทำซ้ำ (%RSD) พบว่าการวิเคราะห์ซ้ำของ gallic acid มีค่าอยู่ระหว่าง 4.45 – 14.75 (n = 8) ส่วน trolox มีค่าอยู่ระหว่าง 8.26 – 17.05 (n = 8) และศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิธี FRAP ที่พัฒนาขึ้น (paper-based device) เทียบกับวิธี FRAP แบบดั้งเดิม (spectrophotometric assay) โดยได้วิเคราะห์ตัวอย่างชาชนิดชงจำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองข้างต้นจึงทำให้สามารถสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่าง (มากกว่า 50 ตัวอย่าง) สามารถใช้เป็นวิธีในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ หรือเทคโนโลยีราคาแพงในการวิเคราะห์ มีความสะดวกเหมาะสมสำหรับใช้งานในภาคสนาม เนื่องจากมีน้ำหนักเบาใช้งานได้ง่าย มีราคาถูก และใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในปริมาณน้อย

โดยผลการทดลองจากการศึกษาข้างต้นจะได้นำไปประยุกต์เพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบหลายวิธีต่อไป

#### 4.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีอื่นๆ
2. ควรทำการศึกษาทดลองคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอื่น ๆ เช่น ในน้ำผลไม้ หรือพืชชนิดต่าง ๆ



## บทที่ 5

### ผลผลิต

#### 5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1. Punthong, P., Nouanthavong, S., and Sameenoi, Y. (2016). Paper-based CUPRAC assay for antioxidant activity analysis, In *Proceedings of Pure and Applied Chemistry International Conferences 2016 (PACCON2016)*, Bangkok: Thailand.
2. ภคพล จุ่มใหญ่ และยุภาพร สมีน้อย. (๒๕๕๙). การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ใน *การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ ๖*, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

## บรรณานุกรม

- Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, (3-2)585, .337-325
- Carrilho, E., Martinez, A. W., & Whitesides, G. M. (2009) Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, (16)81, -7091 .7095doi:/10.1021ac901071p
- Nagle, D. G., Ferreira, D., & Zhou, Y.-D. (2006) Epigallocatechin--3gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*, (17)67, .1855-1849
- Phakthong, W., Liawruangrath, B., & Liawruangrath, S. (2014) Determination of gallic acid with rhodanine by reverse flow injection analysis using simplex optimization. *Talanta*, 130, .584-577
- Sameenoi, Y., Nongkai, P. N., Nouanthavong, S., Henry, C. S., & Nacapricha, D. (2014) One-step polymer screen-printing for microfluidic paper-based analytical device ( $\mu$  PAD) fabrication. *Analyst*, (24)139, .6588-6580doi:/10.1039C4AN01624F
- van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H., & Bast, A. (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, (4)66, .517-511