



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. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802108

สัญญาเลขที่ 6/2560

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. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 6/2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการรายงานการใช้อุปกรณ์แบบกระดาษเป็นแพลตฟอร์มอย่างง่าย ราคาถูก และให้การตรวจวัดที่รวดเร็ว สำหรับการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดพร้อมกันในตัวอย่างอาหาร นำวิธี ABTS และ CUPRAC และวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดด้วยวิธี FC มาทดสอบพร้อมกันเพื่อเป็นการพิสูจน์แนวคิดดังกล่าว อุปกรณ์ประกอบด้วยบริเวณใส่ตัวอย่างตรงกลางเชื่อมต่อกับบริเวณตรวจวัดทั้งสองโดยมีสามบริเวณสำหรับตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามวิธีและอีกหนึ่งบริเวณเป็นการตรวจวัดแบบดั้งเดิม ตัวอย่าง การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำโดยหดยดสารละลายตัวอย่างบริเวณใส่ตัวอย่างเพื่อให้ไหลไปทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์ของแต่ละวิธีซึ่งได้มีการบรรจุไว้แล้วบนบริเวณตรวจวัดทำให้มีสีที่เปลี่ยนไปซึ่งสามารถวัดได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจเจ ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ความเข้มข้นของรีเอเจนท์ เวลาในการเกิดปฏิกิริยาและปรับปรุงพื้นผิว เพื่อให้ได้การวิเคราะห์ที่มีความไวสูง และช่วงความเป็นเส้นตรงกว้าง จากนั้นศึกษาการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหลากหลายชนิด เพื่อตรวจสอบคุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้น นำอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นไปตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดในตัวอย่างเครื่องดื่ม 10 ชนิดพบว่า ได้ค่าสมมูลกรดแกลลิกที่ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการตรวจวัดด้วยวิธีตรวจวัดแบบดั้งเดิมที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ยิ่งไปกว่านั้น ค่าสมมูลกรดแกลลิกที่ได้จากวิธีวิเคราะห์ทั้งสามบนอุปกรณ์แบบกระดาษยังมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกันโดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สันที่สูง ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้การวิเคราะห์ที่แม่นยำและเหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมพร้อมกันได้

Abstract

The first use of a paper-based device as a simple, low-cost and rapid detection platform for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples has been reported in this work. Two antioxidant activity assays including 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS) assay and cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay and one total phenolic content assay, Folin Ciocaltue reagent (FC) assay were simultaneously employed as a proof-of-concept. The device composed of a central sample zone connected to four pretreatment zones and consecutive detection zones to accommodate all three assays and a sample blank measurement. The analysis was achieved by dropping the samples onto the sample zone to flow to the pretreatment and detection zones containing the stored reagents for each antioxidant assay making the color change that was measured using imageJ software. Assay optimization including key reagent concentrations, reaction time, and surface modification were carried out to obtain sensitive and wide linear range analyses. Various antioxidant standards were then evaluated to determine the analytical features of the method. The paper-based assays were successfully applied to detect antioxidant activity and total phenolic content in 10 beverage samples with similar gallic acid equivalent (GAE) values to those obtained from traditional assays at a 95% confidence interval. Moreover, the GAE values of the samples obtained from three assay analyses were well correlated to each other with relatively high Pearson's correlation coefficients. These results indicated that the assays gave accurate results and are suitable for simultaneous analysis of antioxidant activity and total phenolic content in real samples.

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 วิธีการทดลอง	3
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี	3
2.2 วิธีการออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	3
2.3 การเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	4
2.3.1 วิธี CUPRAC	4
2.3.2 วิธี ABTS	4
2.3.3 วิธี FC	4
2.3.4 การวิเคราะห์สารมาตรฐานและตัวอย่าง	4
2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีดั้งเดิม	5
2.4.1 วิธี CUPRAC	5
2.4.2 วิธี ABTS	5
2.4.3 วิธี FC	5
2.5 การเตรียมตัวอย่าง	6
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปราย	7
3.1 หลักการของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น	7
3.2 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	8
3.2.1 วิธี CUPRAC	8
3.2.1.1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของ CuCl_2	8
3.2.1.2 เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	9
3.2.2 วิธี ABTS	10
3.2.2.1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของ ABTS และการปรับสภาพพื้นผิวของกระดาษ	10
3.2.2.2 เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	11
3.2.3 วิธี FC	12

สารบัญเรื่อง

	หน้า
3.2.3.1 การปรับสภาพพื้นผิวของกระดาษ	12
3.2.3.2 เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	13
3.3 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้วิธี CUPRAC ABTS และ FC	13
3.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง	14
3.3.2 ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility)	17
3.3.3 ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD)	17
3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง	18
3.4.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิม	18
3.4.2 ความสัมพันธ์ของทั้ง 3 วิธีบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	21
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	23
4.1 สรุปผลการทดลอง	23
4.2 ข้อเสนอแนะ	23
บทที่ 5 ผลผลิต	24
เอกสารอ้างอิง	25
ประวัตินักวิจัยและคณะ	28

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยวิธี CUPRAC FC และ ABTS บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น	18
ตารางที่ 3-2	ค่า GAE จากการวิเคราะห์ตัวอย่างของทั้ง 3 วิธีด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นกับวิธีทางสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบดั้งเดิม	20

สารบัญญภาพ

		หน้า
รูปที่ 2-1	อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบหลายวิธี (A) บริเวณต่างๆของอุปกรณ์ (B) บริเวณทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีบนอุปกรณ์	4
รูปที่ 3-1	อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น)A) การออกแบบอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ วิธี ABTS วิธี CUPRAC และวิธี FC สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวม)B) บริเวณต่างๆบนอุปกรณ์ สำหรับการหยดรีเอเจนต์ (บริเวณตรวจวัดและบริเวณปรับสภาพ) และการเติมสารละลายตัวอย่าง (บริเวณหยดสารตัวอย่าง)	7
รูปที่ 3-2	การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	8
รูปที่ 3-3	(A) รูปแสดงความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin ที่มีความเข้มชั้น $CuCl_2$ แตกต่างกัน (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มชั้นของ $CuCl_2$ กับความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin ที่วัดได้บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัด gallic acid 3 mM (Blank (แกน y) เป็นสัญญาณการตรวจวัดน้ำปราศจากไอออน)	9
รูปที่ 3-4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin กับ เวลาในการทำปฏิกิริยา	9
รูปที่ 3-5	ภาพแสดงความเข้มสีที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษวัดสีของวิธี ABTS (A) ปราศจาก APTES (B) มี APTES	10
รูปที่ 3- 6	(A) รูปแสดงความเข้มสีของ $ABTS^{+}$ ที่มีความเข้มชั้น ABTS ที่แตกต่างกัน (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มชั้นของ ABTS	11
รูปที่ 3- 7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของ $ABTS^{+}$ กับเวลาที่ใช้ในการปฏิกิริยาระหว่าง $ABTS^{+}$ กับ gallic acid	12
รูปที่ 3- 8	ภาพแสดงความเข้มสีที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษวัดสีของวิธี FC (A) ไม่มี PEG (B) มี PEG	13
รูปที่ 3-9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Mo(V) กับ เวลาที่ใช้ในการปฏิกิริยาระหว่าง FC reagent กับ gallic acid	13
รูปที่ 3-10	แสดงรูปและกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน)A) GA (B) CA (C) VA และ(D) AA ด้วยวิธี ABTS บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	15
รูปที่ 3-11	แสดงรูปและกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน)A) GA (B) CA (C) VA (D) AA และ)E) TO ด้วยวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (n=5)	16
รูปที่ 3-12	แสดงรูปและกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน)A) GA (B) CA และ (C) VA ด้วยวิธี FC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	17

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 3-13	อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่าง (ชาอู่หลง ชาดำ และไวท์แดง) เทียบกับตัวควบคุม	19
รูปที่ 3-14	การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่าง 10 ชนิด (รายงานในรูปแบบ GAE ด้วย)A) วิธี ABTS (B) วิธี CUPRAC และ)C) วิธี FC โดยใช้ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นและเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	21
รูปที่ 3-15	ความสัมพันธ์ของทั้ง 3 วิธีบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษระหว่าง (A) วิธี ABTS และ CUPRAC (B) วิธี FC และ ABTS (C) วิธี FC และ CUPRAC	22

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ซึ่งมีความไม่เสถียรสูงและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เกิดได้จากทั้งกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและมลพิษต่างๆ เช่น โอโซน โลหะหนัก คาร์บอนหรือ และเมื่อในภาวะที่ร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไปจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆได้แก่ โรคหลอดเลือดในหัวใจตีบตัน โรคความจำเสื่อม โรคมะเร็ง (Lobo *et al.*, 2010) นอกจากนี้ เมื่ออยู่ในอาหารก็จะทำให้อาหารเน่าเสียก่อนถึงมือผู้บริโภค

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารสำคัญที่ช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ โดยเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ทำให้ลดความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากลายเป็นโมเลกุลที่เสถียรในที่สุด โดยผ่านกลไกต่างๆได้แก่ การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation) การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (free radical chain breaking) การเสริมฤทธิ์ (synergism) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) (Lobo *et al.*, 2010) ซึ่งโดยปกติแล้วในร่างกายจะมีระบบต้านอนุมูลอิสระอยู่ อย่างไรก็ตาม สำหรับผู้ที่อยู่ในภาวะเสี่ยงที่ต้องได้รับอนุมูลอิสระมากกว่าปกติ เช่น ผู้ปฏิบัติงานในโรงงานถลุงเหล็ก ผู้ที่ได้รับควันหรือมลพิษทางอากาศอยู่ตลอดเวลา จำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกเข้าไปด้วยเป็นประจำ สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพร นอกจากนี้จะช่วยยับยั้งการเกิดโรคในคนแล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร เพื่อให้อาหารที่ส่งออกสามารถเก็บได้นานยิ่งขึ้น

วิธีวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น วิธี Total radical trapping (TRAP) (Ghiselli *et al.*, 1995) วิธี 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS) (Re *et al.*, 1999) วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie & Strain, 1999) วิธี oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) (Wang *et al.*, 1996) วิธี cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) (Apak *et al.*, 2004) และ วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) (Cuendet *et al.*, 1997) นอกจากนี้ ยังสามารถวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี folin-Ciocalteu (FC) assay (Prior, Wu, & Schaich, 2005) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มหนึ่งที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธีเหล่านี้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่แตกต่างกัน เช่น วิธี ABTS มีกลไกเป็นแบบการดักจับอนุมูลอิสระโดยสาร ABTS จะถูกออกซิไดซ์ ให้กลายเป็น $ABTS^{+}$ วิธี CUPRAC เป็นกลไกเกี่ยวกับความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (reducing power) (Bener *et al.*, 2013) และ วิธี folin-Ciocalteu หาปริมาณฟีนอลิกในตัวอย่าง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างจำเป็นต้องมีการตรวจวัดหลาย

วิธีเพื่อให้ได้ข้อมูลครบทุกกลไกในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง ทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์และสิ้นเปลืองตัวอย่างและรีเอเจนท์จำนวนมาก เนื่องจากต้องตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ซึ่งใช้สารปริมาณมาก

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based analytical device) คืออุปกรณ์ที่สร้างขึ้นโดยใช้กระดาษเป็นวัสดุหลัก ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic barrier) ซึ่งใช้เป็นบริเวณทดสอบ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) สำหรับกำหนดขอบเขตสำหรับการตรวจวัดซึ่งสามารถสร้างด้วยการฝังวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic material) ลงบนเนื้อกระดาษด้วยวิธีต่างๆ เช่น การพิมพ์ด้วยแสง (photolithography) (Martinez *et al.*, 2008) การพิมพ์ด้วยเครื่องพล็อต (plotting) (Bruzewicz *et al.*, 2008) การพิมพ์ด้วยหมึก (inkjet printing) (Abe *et al.*, 2008) การตัด (cutting) (Fenton *et al.*, 2009) และการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) (Lu *et al.*, 2009) เป็นต้น การเคลื่อนที่ของสารละลายบนอุปกรณ์แบบกระดาษเกิดขึ้นได้ด้วยแรงคาпилลารี (capillary force) บนเส้นใยเซลลูโลสทำให้ปราศจากการใช้ปั๊มภายนอก อุปกรณ์ที่ได้มีขนาดเล็กและใช้สารน้อย (Martinez *et al.*, 2010) ที่ผ่านมาได้มีการประยุกต์ใช้อุปกรณ์ดังกล่าวในด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ (Vella *et al.*, 2012) ด้านสิ่งแวดล้อม (Sameenoi *et al.*, 2012) และด้านอาหาร (Cardoso *et al.*, 2015) เนื่องจากอุปกรณ์มีราคาถูก วัสดุหาซื้อได้ง่าย ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนท์ปริมาณน้อย สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดพร้อมกันโดยการปรับลดลายของอุปกรณ์ให้เหมาะสม

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดพร้อมกัน การพัฒนาอุปกรณ์นี้จะทำให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดที่สามารถวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลายวิธีพร้อม ๆ กันทำให้ได้ข้อมูลกลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระหลายกลไกพร้อมกันในการทำarviเคราะห์เพียงครั้งเดียว ซึ่งทำให้ประหยัดเวลา ประหยัดสารตัวอย่าง และรีเอเจนท์ในการวิเคราะห์หาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกในตัวอย่างอาหารและสารสกัดธรรมชาติ มีราคาถูก น้ำหนักเบา สามารถพกพาไปตรวจวัดยังภาคสนามได้ โดยสร้างอุปกรณ์ดังกล่าวด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax-printing) โดยออกแบบให้อุปกรณ์มีหนึ่งบริเวณใส่ตัวอย่างเชื่อมต่อกับสี่บริเวณตรวจวัดซึ่งสามบริเวณตรวจวัด ได้แก่ วิธี ABTS วิธี CUPRAC และวิธี FC และอีกหนึ่งบริเวณตรวจวัดสำหรับการตรวจวัดแปลงค่าตัวอย่าง โดยวิธี FC เป็นการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และวิธี ABTS และวิธี CUPRAC เป็นการหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้ด้วยการตรวจวัดสี (colorimetric detection) ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อรีเอเจนท์ของแต่ละวิธีทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระบนบริเวณตรวจวัดของอุปกรณ์ด้วยเครื่องสแกนและประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจ (Image J)

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างที่สนใจได้หลายวิธีพร้อมกันในการวิเคราะห์หนึ่งครั้ง

บทที่ 2

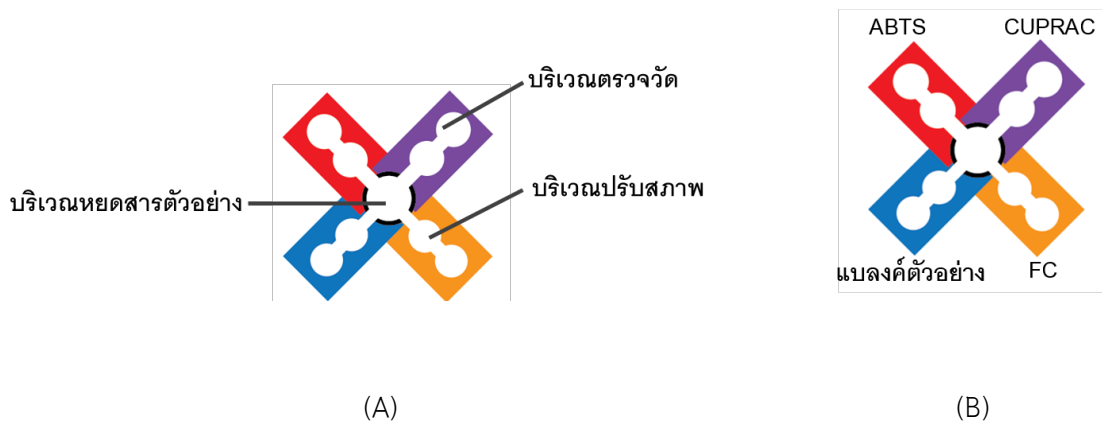
วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้แก่ กระดาษกรอง เบอร์ 4 จาก Whatmen, GE Healthcare company, China เครื่องพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printer) รุ่น Xerox ColorQube 8870-1 จาก Flextronics Technology, Malaysia เครื่องสแกน Canon รุ่น CanoScan LiDE110, จาก Canon Inc., Vietnam เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) รุ่น SPECORD[®] 210 PLUS, จาก Analytikjena, Germany สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FCR); Sodium carbonate; Hydrogen peroxide จาก Merck, USA Copper (II) chloride และ Ammonium acetate จาก Ajax Finechem, Australia 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS); (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES); Potassium persulfate; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); Gallic acid (GA); Trolox (TO); Caffeic acid (CA); Vanillic acid (VA); Ascorbic acid (AA); Neocuproine (Nc); Polyethylene glycol (PEG) จาก Sigma Aldrich, Singapore

2.2 วิธีการออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้โปรแกรมอะโดบี อิลลัสเตรเตอร์ ซีซี (Adobe Illustrator CC) ซึ่งประกอบไปด้วย 3 บริเวณหลัก ได้แก่ บริเวณหยดสารตัวอย่าง (sample zone) (ขนาด 7 mm) เชื่อมต่อกับบริเวณปรับสภาพ (pretreatment zone) (ขนาด 5 mm) 4 บริเวณและต่อไปยังบริเวณตรวจวัด (detection zone) (ขนาด 5 mm) อีก 4 บริเวณ (ดังรูปที่ 1A) ซึ่งการออกแบบดังกล่าวจะทำให้สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้พร้อมกัน 3 วิธี ได้แก่ วิธี ABTS วิธี CUPRAC และวิธี FC (ดังรูปที่ 1B) ส่วนที่เหลืออีก 1 แฉกจะเป็นตัวควบคุมหรือสารละลายตัวอย่าง โดยอุปกรณ์ที่ได้จะมีขนาด 3.4x3.4 cm หลังจากออกแบบแล้วสามารถสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษได้โดยเทคนิคการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง โดยการพิมพ์ภาพอุปกรณ์ลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ด้วยเครื่องพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง นำกระดาษกรองที่มีลวดลายแล้วไปให้ความร้อนโดยใช้เตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150°C เป็นเวลา 90 วินาที จะทำให้ขี้ผึ้งซึมผ่านกระดาษกรองลงมาเกิดเป็นส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ ติดด้านหลังอุปกรณ์ตรวจวัดด้วยเทปกาวใสก่อนนำไปใช้ในการทดลองเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารละลาย



รูปที่ 2-1 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบหลายวิธี (A) บริเวณต่างๆของอุปกรณ์ (B) บริเวณทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีบนอุปกรณ์

2.3 การเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

2.3.1 วิธี CUPRAC

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์แบบกระดาษ เตรียมอุปกรณ์โดยหยดสารละลายลงบนบริเวณสีม่วงของอุปกรณ์ ชั้นแรกหยด CuCl_2 150 mM ปริมาตร 0.5 μL ลงบนบริเวณตรวจวัดรอกจนแห้ง และหยดสารละลาย ammonium acetate buffer pH เข้มข้น 710 mM ปริมาตร 0.5 μL ลงบนบริเวณตรวจวัดรอกจนแห้ง ตามด้วยสารละลาย neocuproine 600 mM ปริมาตร 0.5 μL ลงบนบริเวณปรับสภาพ รอกจนแห้ง

2.3.2 วิธี ABTS

เตรียมอุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ทำโดยการหยดสารละลายลงบนบริเวณสีแดงของอุปกรณ์ เริ่มต้นหยด APTES 5% (v/v) ปริมาตร 0.5 μL ลงบนบริเวณตรวจวัดเพื่อเตรียมบริเวณตรวจวัด รอกจนแห้ง หยดสารละลาย ABTS 40 mM ปริมาตร 0.5 μL ลงบนบริเวณตรวจวัดรอกจนแห้ง ตามด้วยหยดสารละลาย K_2SO_8 70 mM ปริมาตร 0.5 μL ลงบนบริเวณปรับสภาพ รอกจนแห้ง

2.3.3 วิธี FC

อุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FC เตรียมได้โดยหยดสารละลายลงบนบริเวณสีเหลืองของอุปกรณ์ ชั้นแรกหยด PEG 40 mg/mL ปริมาตร 0.5 μL ลงบนบริเวณตรวจวัด รอกจนแห้ง จากนั้นหยดสารละลาย FCR 2N และ Na_2CO_3 20% (w/v) ปริมาตร 0.5 μL ลงบนบริเวณตรวจวัดรอกจนแห้ง ตามด้วย H_2O_2 2 M ปริมาตร 0.5 μL รอกจนแห้ง

2.3.4 การวิเคราะห์สารมาตรฐานและตัวอย่าง

การวิเคราะห์สารมาตรฐานและตัวอย่างทำโดยการหยดสารมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างลงบนบริเวณหยดสารตัวอย่างและชะด้วยน้ำอีก 20 μL ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที

เป้าให้แห้ง จากนั้นสแกนอุปกรณ์เพื่อนำรูปที่ได้ไปวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจเจ (Image J) เป็นการวิเคราะห์ความเข้มสีของสีม่วงโดยหาจากการวัดค่าเฉลี่ยของความเข้มสีต่อพื้นที่บริเวณตรวจวัด (mean intensity)

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีดั้งเดิม

สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีนี้ในกลุ่มตัวอย่างจะได้รับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (วิธี CUPRAC และวิธี ABTS) และหาปริมาณฟีนอลิกรวม (วิธี FC) โดยใช้วิธีดั้งเดิม ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ gallic acid เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่าง ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมแสดงเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย $\mu\text{molGA/g}$ หรือ $\mu\text{molGA/mL}$ ค่า GAE ของตัวอย่างที่ได้รับจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

2.4.1 วิธี CUPRAC

เติมสารละลาย CuCl_2 เข้มข้น 150 mM สารละลาย ammonium acetate buffer pH 7 เข้มข้น 10 mM และสารละลาย neocuproine 600 mM อย่างละ 5 μL ลงในขวดสีชา ตามด้วยเติมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 25 μL จากนั้นเติมน้ำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 mL พล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.4.2 วิธี ABTS

ผสมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 mM กับสารละลาย $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2.45 mM ในอัตราส่วน 1:1 แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นเวลา 16–20 ชั่วโมง เพื่อสร้าง $\text{ABTS}^{+\cdot}$ นำสารละลาย $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนได้ working solutions ของ $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ไปใช้ในการทดสอบ ทำการทดสอบโดยการใส่สารมาตรฐาน gallic acid หรือสารละลายตัวอย่างปริมาตร 25 μL ผสมกับ working solutions ของ $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 1425 μL จากนั้นพล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในที่มีด 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.4.3 วิธี FC

เติมสารละลายมาตรฐาน gallic acid หรือสารละลายตัวอย่าง น้ำกลั่นและ Folin-Ciocalteu reagent อย่างละ 250 μL ลงในขวดสีชา ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 10% (w/v) ปริมาตร 1 mL ลงในขวดสีชา และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 10 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.5 การเตรียมตัวอย่าง

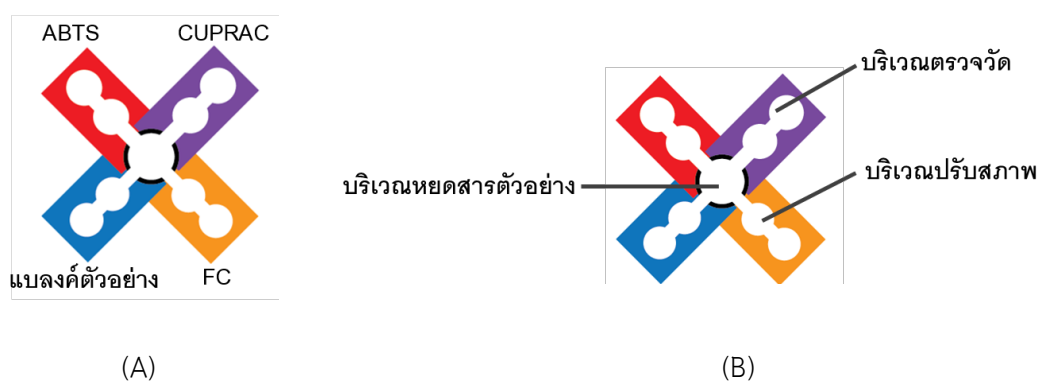
ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ ชา ไวน์ และน้ำผลไม้ การเตรียมตัวอย่างชา เตรียมโดยชั่งตัวอย่างชา 2 g ต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ปริมาตร 200 mL เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และกรองตะกอนชาออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 สำหรับการเตรียมตัวอย่างไวน์ เตรียมโดยการนำตัวอย่างไป de-gasing เป็นเวลา 15 นาที เพื่อไล่ฟองอากาศออกจากตัวอย่าง สุดท้ายทำการเตรียมน้ำผลไม้ เตรียมโดยการนำน้ำผลไม้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกกากใยอาหารออกจากสารละลาย หลังจากเตรียมตัวอย่างแล้วจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หรือเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 หลักการของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น

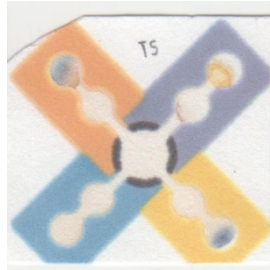
งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมพร้อมๆกันและเพื่อให้ได้อุปกรณ์ที่มีราคาถูก ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนต์น้อย สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว โดยอุปกรณ์ตรวจวัดมีการออกแบบให้สามารถตรวจวัดได้ 3 วิธีพร้อมๆกันในอุปกรณ์เพียงอันเดียว ดังรูปที่ 3-1 วิธี FC ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม วิธี ABTS และวิธี CUPRAC ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สำหรับการวิเคราะห์ FC การวิเคราะห์จะอาศัยหลักการของ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Mo (VI) ที่มีสีเหลือง เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระสารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์ เกิดเป็น สารประกอบเชิงซ้อน Mo (V) ที่มีสีน้ำเงิน วิธี ABTS มีหลักการการตรวจวัดที่เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging) ของสารต้านอนุมูลอิสระต่อ $ABTS^{•+}$ ที่มีสีเขียว เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างมาก สีเขียวของ $ABTS^{•+}$ จะลดลงมาก และวิธี CUPRAC การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาศัยหลักการที่สารประกอบเชิงซ้อน Cu(II) ถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I) ที่มีสีเหลืองส้ม



รูปที่ 3-1 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น)A) การออกแบบอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ วิธี ABTS วิธี CUPRAC และวิธี FC สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวม)B) บริเวณต่างๆบนอุปกรณ์ สำหรับการหยดรีเอเจนต์ (บริเวณตรวจวัดและบริเวณปรับสภาพ) และการเติมสารละลายตัวอย่าง (บริเวณหยดสารตัวอย่าง)

เมื่อได้อุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นแล้ว จะทำการหยดรีเอเจนต์ของแต่ละวิธีลงบนบริเวณตรวจวัดและบริเวณปรับสภาพของอุปกรณ์ ซึ่งอุปกรณ์นี้สร้างโดยใช้วิธีการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing method) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมสามารถทำได้โดยการหยดสารละลายตัวอย่างลงบนบริเวณหยดสารตัวอย่าง จากนั้นชะด้วยน้ำเพื่อให้รีเอเจนต์ที่หยดไว้ในบริเวณต่างๆ ไหลเข้าไปปฏิกิริยากันที่บริเวณตรวจวัดและเกิดการเปลี่ยนแปลงสีขึ้นบนดังรูปที่ 3-2

การเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นบนบริเวณตรวจวัดจะถูกตรวจวัดด้วยโปรแกรม imageJ เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมที่มีอยู่ในตัวอย่าง ความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์จะขึ้นกับปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่าง สำหรับความเข้มสีที่เกิดบริเวณแปลงค์ตั้งอย่างจะถูกนำมาหักลบกับสัญญาณที่ได้จากแต่ละวิธี



รูปที่ 3-2 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาด

3.2 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาด

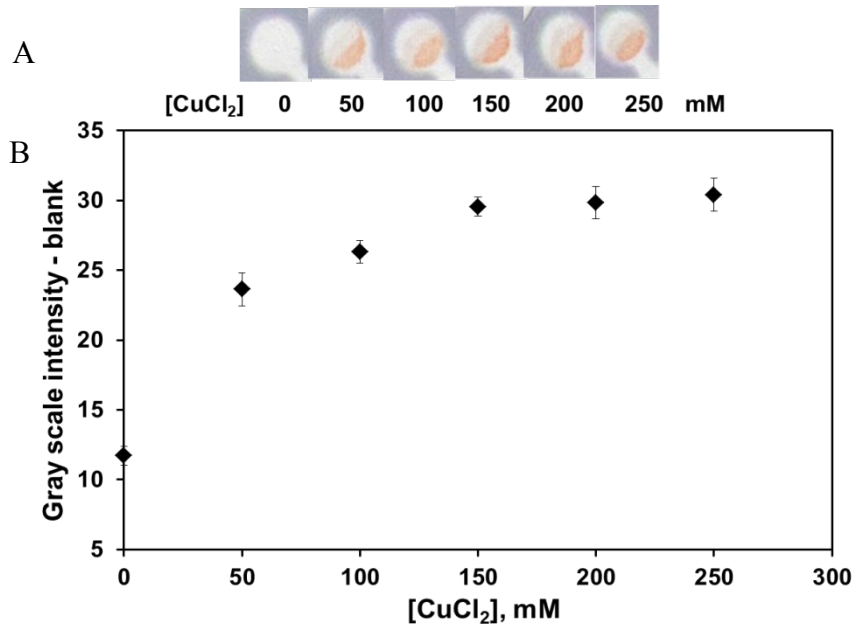
การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC ABTS และ FC ในงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ได้นำวิธีเหล่านี้มาวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาด ดังนั้นจึงได้มีการปรับและหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของรีเอเจนต์หลักและเวลาปฏิกิริยาของแต่ละวิธี นอกจากนี้ยังมีการ modification พื้นผิว เพื่อให้เหมาะสมกับการทดสอบอีกด้วย

3.2.1 วิธี CUPRAC

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาด พารามิเตอร์ที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของ CuCl_2 และเวลาในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง

3.2.1.1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของ CuCl_2

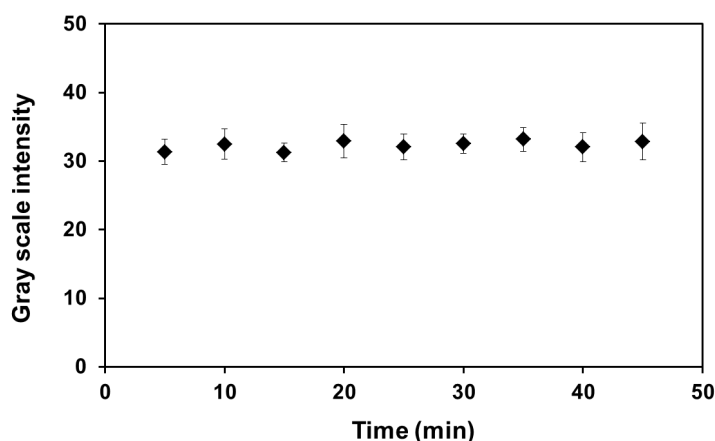
ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CuCl_2 เป็นปัจจัยสำคัญเนื่องจากวิธี CUPRAC เป็นการวัดการเพิ่มขึ้นของสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อสารประกอบเชิงซ้อน Cu(II)-neocuproin รีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ โดยความเข้มข้นของ CuCl_2 ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์จะต้องเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้สัญญาณการวิเคราะห์ที่สูงที่สุดเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปเพียงเล็กน้อย เพื่อให้ได้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดี ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ CuCl_2 ที่เหมาะสมในช่วง 0-250 mM จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 3 mM ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3-3 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ CuCl_2 เพิ่มขึ้น ความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin ก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วยและมีค่าคงที่ ที่ความเข้มข้นของ CuCl_2 เท่ากับ 150 mM ขึ้นไป ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ CuCl_2 150 mM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการทดลอง เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ให้ความเข้มสีสูงที่สุด



รูปที่ 3-3 (A) รูปแสดงความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin ที่มีความเข้มข้น CuCl₂ แตกต่างกัน (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CuCl₂ กับความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin ที่วัดได้บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัด gallic acid 3 mM (Blank (แกน y) เป็นสัญญาณการตรวจวัดน้ำปราศจากไอออน (

3.2.1.2 เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

การศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 3 mM บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นเวลา 5-45 นาที หลังจากครบเวลาที่กำหนด นำอุปกรณ์ไปเป่าให้แห้งและวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น จากทดลองผลได้แสดงดังรูปที่ 3-4 พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเริ่มคงที่ตั้งแต่ 5 นาที ขึ้นไป ในการทดลองนี้จะเลือกเวลาในการทำปฏิกิริยา 5 นาที มาใช้ในการทดลองเพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสมบูรณ์



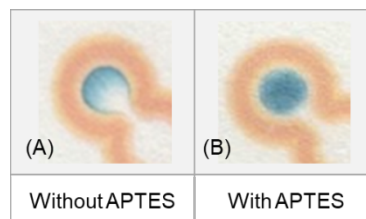
รูปที่ 3-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I)-neocuproin กับ เวลาในการทำปฏิกิริยา

3.2.2 วิธี ABTS

วิธี ABTS ได้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของ ABTS การปรับสภาพพื้นผิวให้ความเข้มข้นของ ABTS^{•+} กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบริเวณตรวจวัด และเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.2.2.1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของ ABTS และการปรับสภาพพื้นผิวของกระดาษ

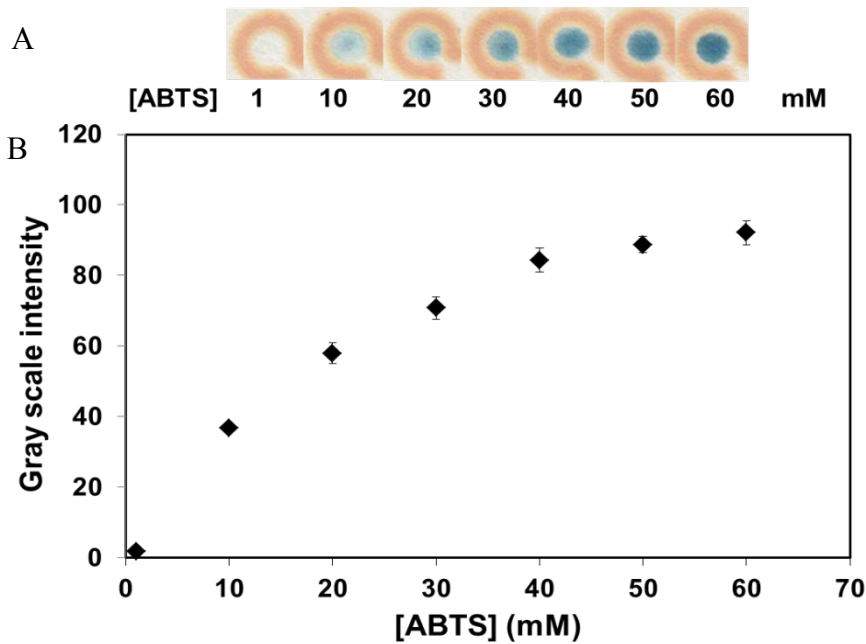
การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS อาศัยหลักการการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging) ของสารต้านอนุมูลอิสระต่อ ABTS^{•+} ซึ่ง ABTS^{•+} สามารถสร้างได้จาก ABTS กับ potassium persulfate ขึ้นแรกได้ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ ABTS ที่เหมาะสม โดยการศึกษาเปรียบเทียบจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ เริ่มด้วยการหยด ABTS กับ potassium persulfate ลงบนบริเวณตรวจวัดและบริเวณปรับสภาพตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนลงบริเวณหยดสารตัวอย่าง เพื่อชะ potassium persulfate ให้ไหลไปทำปฏิกิริยากับ ABTS ที่บริเวณตรวจวัดและเกิดสีเขียวของ ABTS^{•+} ขึ้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นเขียวที่เกิดขึ้นของ ABTS^{•+} มีการกระจายตัวของสีไม่สม่ำเสมอบริเวณตรวจวัด ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวัดความเข้มข้นได้ (รูปที่ 3-5A) ปัญหานี้อาจเป็นเพราะสมบัติการเคลื่อนที่ได้เร็ว (high mobility) ของ ABTS^{•+} ที่ไหลบนพื้นผิวเซลลูโลส เนื่องจากในสภาวะที่ค่า pH เท่ากับ 7 ทั้ง ABTS (pKa < 0) และเซลลูโลส (IEP < 2.8) มีประจุเป็นลบ ทำให้ (สารทั้งสองชนิดเกิดการผลักกัน) electrostatic repulsion ทำให้ ABTS^{•+} เคลื่อนที่บนพื้นผิวของเซลลูโลสได้อย่างรวดเร็ว เพื่อลดผลกระทบนี้จึงใช้ APTES ในการปรับสภาพพื้นผิวบริเวณตรวจวัดเนื่องจาก หมู่เอมีนจะถูกโปรโทเนตอย่างเต็มที่ ที่ pH < 9.6 ทำให้พื้นผิวมีประจุเป็นบวกเพิ่มมากขึ้น และพื้นผิวของเซลลูโลสเป็นกลาง ดังนั้นจะทำให้การดูดซับของ ABTS บนพื้นผิวของเซลลูโลสดียิ่งขึ้น เนื่องจากไม่มีแรงผลักทางไฟฟ้า ซึ่งส่งผลให้การกระจายสีสม่ำเสมอบริเวณตรวจวัด (รูปที่ 3-5B)



รูปที่ 3-5 ภาพแสดงความเข้มข้นที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษวัดสีของวิธี ABTS (A) ปราศจาก APTES (B) มี APTES

หลังจากการแก้ปัญหาการกระจายตัวของสีไม่สม่ำเสมอด้วย APTES แล้ว จากนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ ABTS ตั้งแต่ 1-60 mM โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์จะต้องเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้สัญญาณสูงและให้การลดลงของสัญญาณอย่างชัดเจนเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระไปเพียงเล็กน้อย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 3-6 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ ABTS

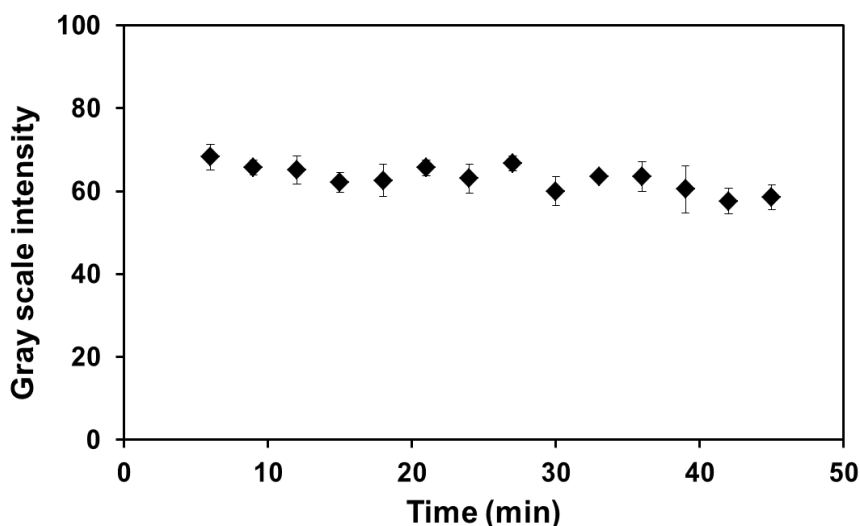
เพิ่มขึ้น ความเข้มสีที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วยโดยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณความเข้มสีจะเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ ABTS เท่ากับ 50 mM ขึ้นไป แต่ความเข้มข้นของ ABTS ที่อยู่ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความเข้มสีมากที่สุดคือ 40 mM ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้น ABTS ที่ 40 mM เป็นสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ให้ความเข้มสีที่ชัดเจนและอยู่ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความเข้มสีที่สูงทำให้เมื่อนำไปวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจะสังเกตเห็นการลดลงของสัญญาณอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ



รูปที่ 3-6 (A) รูปแสดงความเข้มสีของ $ABTS^{+}$ ที่มีความเข้มข้น ABTS ที่แตกต่างกัน (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ ABTS

3.2.2.2 เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

จากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ABTS กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 3mM บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นเวลา 5-45 นาที ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3-7 พบว่าปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ 5 นาทีแรก ในการทดลองนี้จะเลือกเวลาในการทำปฏิกิริยา 5 นาที มาใช้ในการทดลองเพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ และสอดคล้องกับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของวิธี CUPRAC ด้วย



รูปที่ 3-7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของ $ABTS^{+}$ กับเวลาที่ใช้ในการปฏิกิริยาระหว่าง $ABTS^{+}$ กับ gallic acid

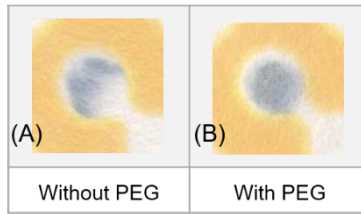
3.2.3 วิธี FC

วิธีนี้ได้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ การปรับสภาพพื้นผิวของบริเวณตรวจวัดเพื่อแก้ปัญหาการกระจายตัวของสีที่ไม่สม่ำเสมอบริเวณตรวจวัด และศึกษาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาอุปกรณ์

3.2.3.1 การปรับสภาพพื้นผิวของกระดาษ

ในการศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกรวมด้วยวิธี FC เป็นการตรวจวัดโดยจะใช้ FC reagent ที่มีองค์ประกอบของ Mo (VI) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก Mo (VI) ที่มีสีเหลืองจะถูกรีดิวซ์และเปลี่ยนเป็น Mo (V) ที่มีสีเป็นสีน้ำเงิน โดย FC reagent (2N) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้โดยปราศจากการเจือจาง

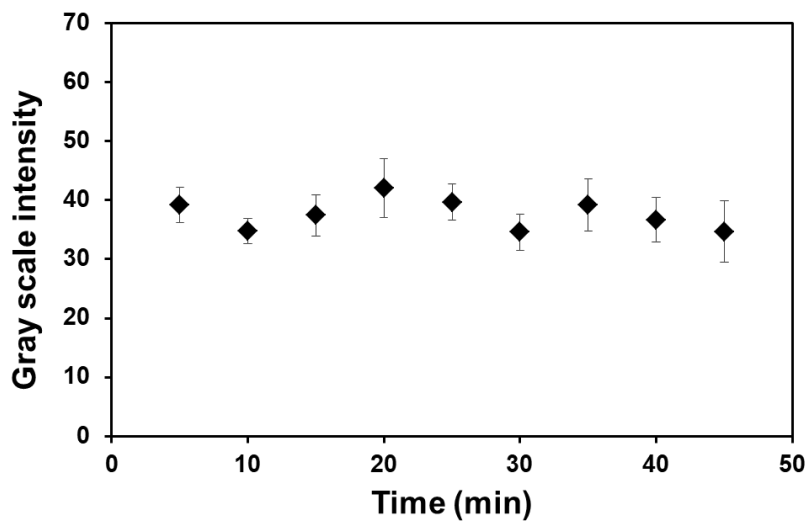
จากผลการศึกษาเบื้องต้นของวิธีนี้บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 3 mM พบว่าเกิดการกระจายตัวของสีที่ไม่สม่ำเสมอบริเวณตรวจวัด (รูปที่ 3-8A) ซึ่งอาจมีผลต่อการวิเคราะห์ สีที่ไม่สม่ำเสมออาจเป็นผลจากความคล่องตัวสูงในการเคลื่อนที่ของสารประกอบเชิงซ้อน Mo (V) บนพื้นผิวของกระดาษ เพื่อลดความคล่องตัวหรืออัตราการไหลที่รวดเร็วของสาร จะได้มีการนำสารที่มีความคล่องตัวต่ำ และมีมวลโมเลกุลสูงอย่าง PEG (PEG, MW= 6000g/mol) มาใช้ในการปรับสภาพพื้นผิวบริเวณตรวจวัด ซึ่งจะช่วยให้การกระจายตัวของสีดีขึ้น (รูปที่ 3-8B) ทำให้เพิ่มสภาพไวและความถูกต้องในการวิเคราะห์ได้อีกด้วย



รูปที่ 3-8 ภาพแสดงความเข้มสีที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษวัดสีของวิธี FC (A) ไม่มี PEG (B) มี PEG

3.2.3.2 เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

การศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง FC reagent กับสารต้านอนุมูลอิสระ (gallic acid เข้มข้น 3 mM) บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นเวลา 5-45 นาที จากการศึกษาโดยพลอตระหว่างความเข้มสีกับเวลาในการทำปฏิกิริยาผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3-9 พบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่าง FC reagent กับสารต้านอนุมูลอิสระตั้งแต่ 5 นาทีแรกและจะคงที่ แต่ในการทดลองนี้จะเลือกเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 5 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเกิดอย่างสมบูรณ์ และให้สอดคล้องกับวิธี CUPRAC และ ABTS เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี บนอุปกรณ์ตรวจวัดเพียงอันเดียว



รูปที่ 3-9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน (MoV) กับเวลาที่ใช้ในการปฏิกิริยาระหว่าง FC reagent กับ gallic acid

3.3 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้วิธี CUPRAC ABTS และ FC

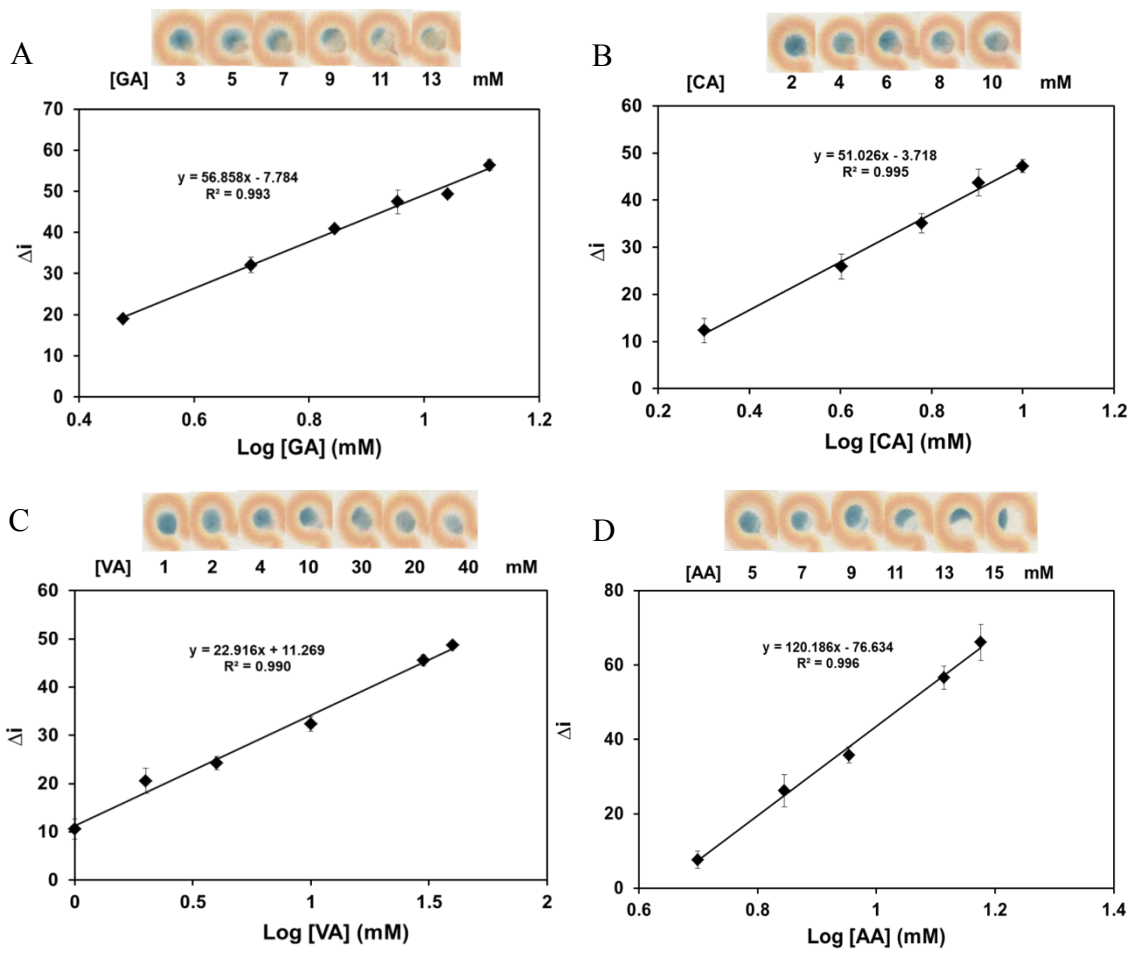
การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เป็นการทดสอบที่จะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ได้บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ได้แก่ การวิเคราะห์ช่วง

ความเป็นเส้นตรง ความสามารถในการทำซ้ำและขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน โดยใช้สภาวะที่ได้มีการศึกษาไปแล้วในข้างต้น วิธี CUPRAC ทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ AA GA CA VA และ TO วิธี ABTS ทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ AA, GA, CA และ VA และวิธี FC ทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ GA CA และ VA

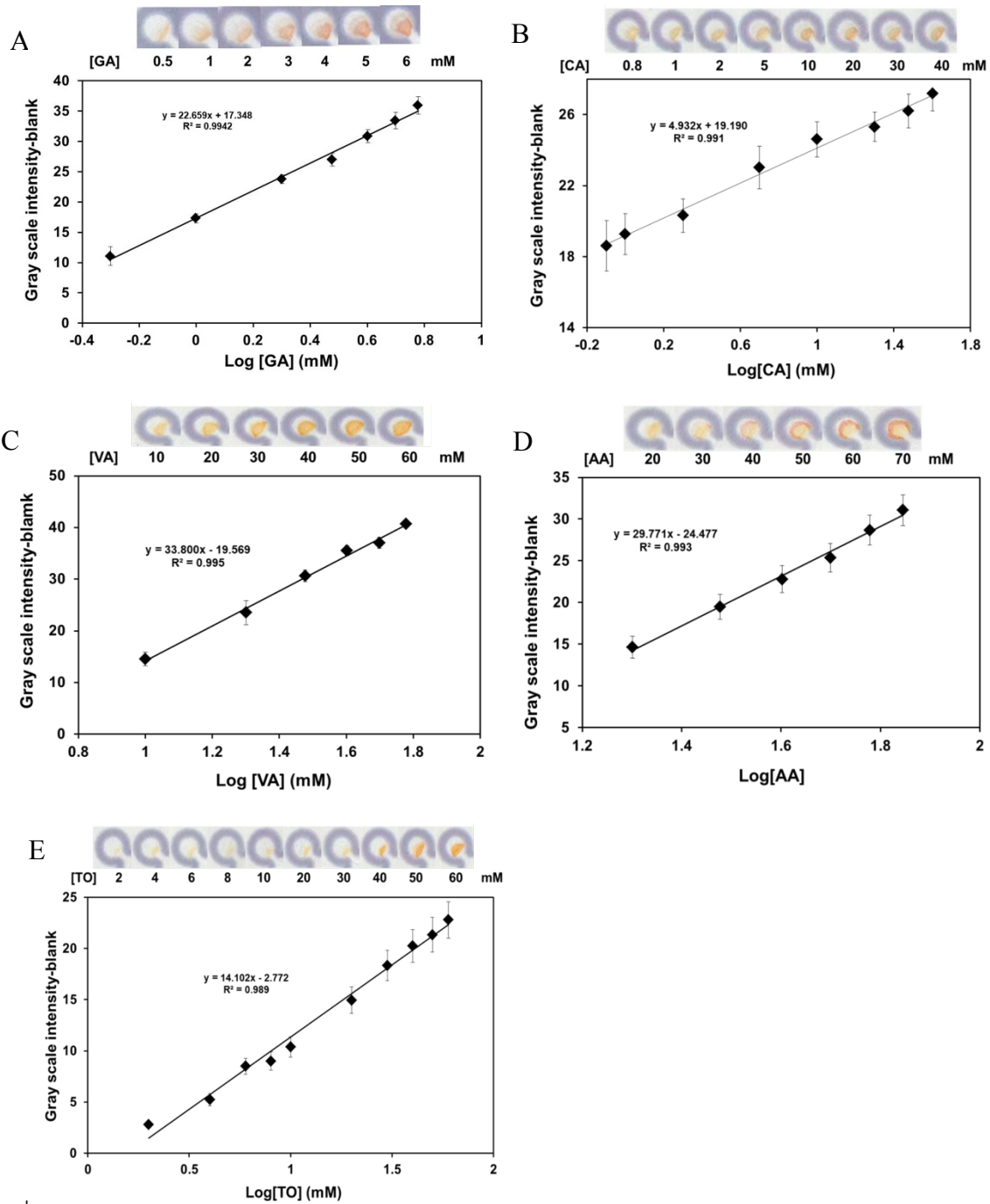
3.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

การวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานได้ทำการวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น มิลลิโมลาร์และไมโครโมลาร์ โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ จากการวิเคราะห์เมื่อพิจารณาถึงวิธี ABTS พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ความเข้มสีของ ABTS⁺ จะลดลง เมื่อนำค่าความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน กับค่าผลต่างของความเข้มสี $\Delta i = i_{\text{control}} - i_x$ เมื่อ i_{control} และ i_x คือความเข้มสีที่การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เข้มข้น จะให้ (และ ที่สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ 0 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธี ABTS ดังรูปที่ 3-10 เมื่อพิจารณาถึงวิธี CUPRAC และ FC พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I) และสารประกอบเชิงซ้อน Mo(V) จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธี วิธี CUPRAC และ FC ดังรูปที่ 3-11 และ 3-12 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์พบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดีและผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธีสรุปอยู่ในตารางที่ 3-

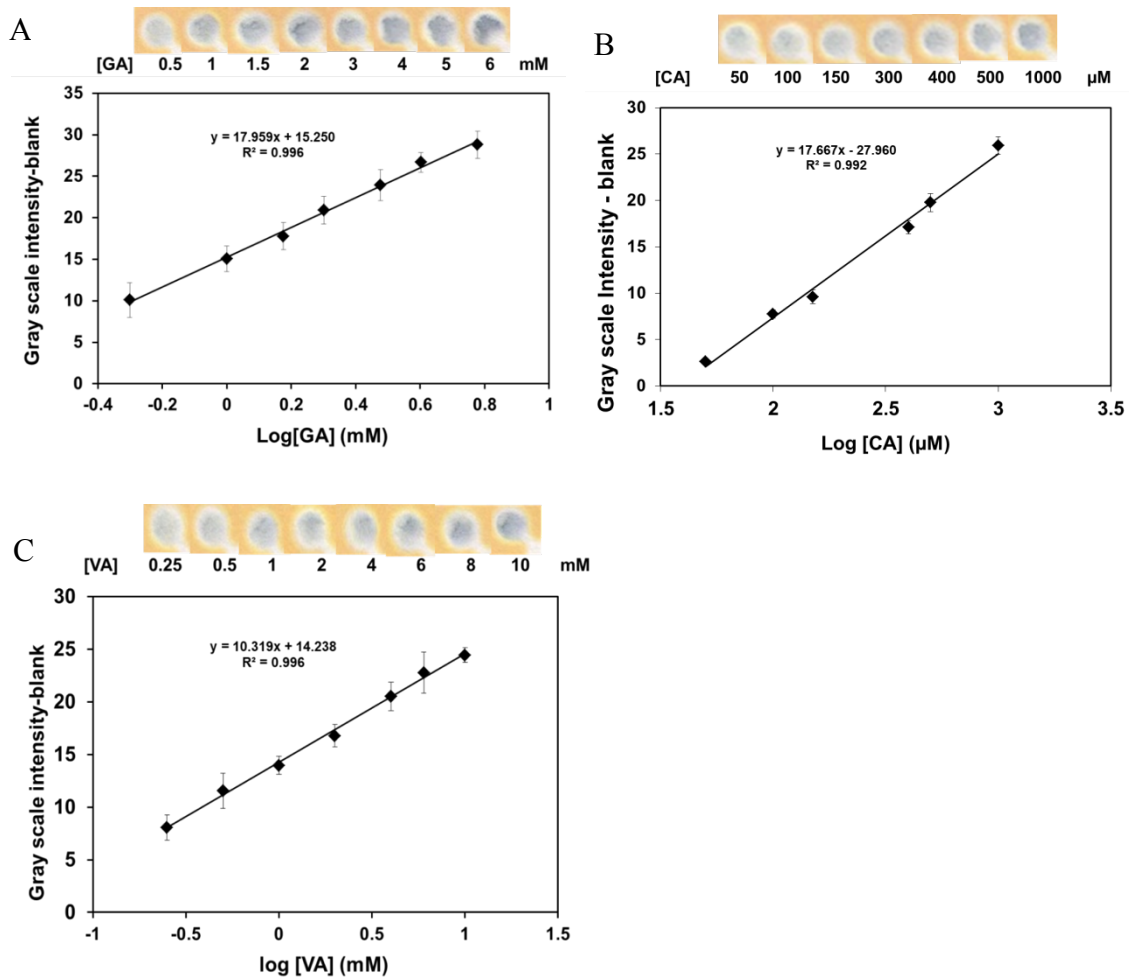
1



รูปที่ 3-10 แสดงรูปและกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน)A) GA (B) CA (C) VA และ(D) AA ด้วยวิธี ABTS บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ



รูปที่ 3-11 แสดงรูปและกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน)A) GA (B) CA (C) VA (D) AA และ)E) TO ด้วยวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (n=5)



รูปที่ 3-12 แสดงรูปและกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน)A) GA (B) CA และ (C) VA ด้วยวิธี FC บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.3.2 ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility)

การศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น โดยจะแสดงในรูปแบบของค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ทำโดยการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 3 ความเข้มข้นที่ในอยู่ช่วงความเป็นเส้นตรง ความเข้มข้นละ 5 μ M จากการศึกษพบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นให้ความสามารถในการทำซ้ำที่ดีอยู่ในช่วง 0.7-9.4% สำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน โดยค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 3-1

3.3.3 ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD)

การศึกษาขีดจำกัดการตรวจของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละตัว ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถแยกจากออกแบล่งค์ได้เมื่อทำการตรวจวัด ในงานวิจัยนี้ทำการหาค่า LOD จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มสีของแบล่งค์ซ้ำ 10 ครั้ง และแทนในสมการ $3SD/slope$ จากการวิเคราะห์พบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นให้ค่า LOD ที่ต่ำดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานด้วยวิธี CUPRAC FC และ ABTS บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

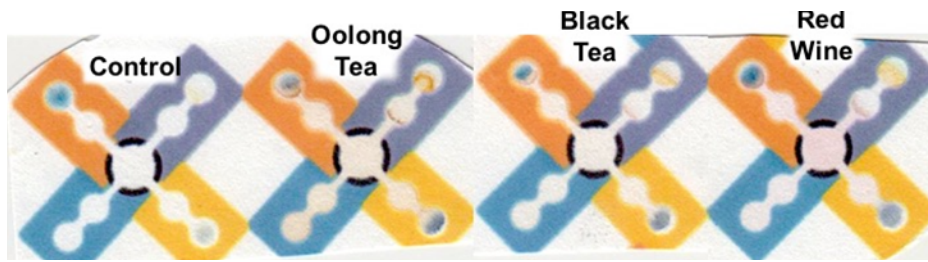
Assays	Antioxidant standards	Linear equation	R ²	Linear range	LOD	%RSD (n=5)
CUPRAC	GA	$y = 25.589x + 11.614$	0.999	0.5–6 mM	0.5 mM	1.8–3.0
	CA	$y = 4.932x + 19.190$	0.991	0.8–40 mM	0.8 mM	1.5–2.4
	VA	$y = 33.800x - 19.569$	0.995	10–60 mM	1.2 mM	0.7–1.2
	AA	$y = 29.771x - 24.477$	0.993	20–70 mM	1.2 mM	0.8–3.7
	TO	$y = 14.102x - 2.772$	0.989	2–60 mM	1.9 mM	2.4–4.0
FC	GA	$y = 17.959x + 15.250$	0.996	0.5–6 mM	0.5 mM	2.3–8.6
	CA	$y = 17.667x + 27.960$	0.992	100–1000 μ M	1.9 μ M	2.4–8.8
	VA	$y = 10.319x + 14.238$	0.996	0.25–10 mM	0.3 mM	1.9–3.0
ABTS	GA	$y = 56.858x - 7.784$	0.993	3–13 mM	1.3 mM	1.4–4.9
	CA	$y = 51.026x - 3.718$	0.995	2–10 mM	1.8 mM	2.6–4.0
	VA	$y = 22.916x + 11.269$	0.990	1–40 mM	2.1 mM	2.1–9.4
	AA	$y = 120.186x - 76.634$	0.996	5–15 mM	1.3 mM	5.4–6.8

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นได้นำมาใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างจริง 10 ชนิด ได้แก่ ชา ไวน์ และน้ำผลไม้ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น จะทำการทดลองโดยการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิม และประเมินความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมที่แตกต่าง ทั้ง 3 วิธี บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เพื่อแสดงสัมพันธ์ของวิธีทั้ง 3 บนอุปกรณ์เดียวกัน

3.4.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิม

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทำโดยวิเคราะห์ตัวอย่างจริง 10 ชนิด ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี ABTS CUPRAC และ FC แบบดั้งเดิม การวิเคราะห์ตัวอย่างจริงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นแสดงให้เห็นดังรูปที่ 3-13 ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธีพร้อมๆกัน ผลที่ได้เป็นไปตามทฤษฎีคือ วิธี CUPRAC และ FC เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ ความเข้มสีจะเพิ่มขึ้น และวิธี ABTS เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ ความเข้มสีจะลดลง โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างจะวิเคราะห์เทียบกับตัวควบคุม พื้นหลังจากตัวอย่างบางส่วนที่ปรากฏขึ้นบริเวณแขนสีฟ้าจะถูกนำมาหักลบกับความเข้มสีที่วัดได้ของการทดลองแต่ละครั้ง นอกจากนี้พื้นหลังที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างที่มีสีเข้มๆ เช่น สีแดงจากไวท์แดง จะถูกกระดาษกรองดูดซับสีที่บริเวณหยดสารตัวอย่าง ดังนั้นทำให้ไม่รบกวนการวิเคราะห์ความเข้มสีที่บริเวณตรวจวัด



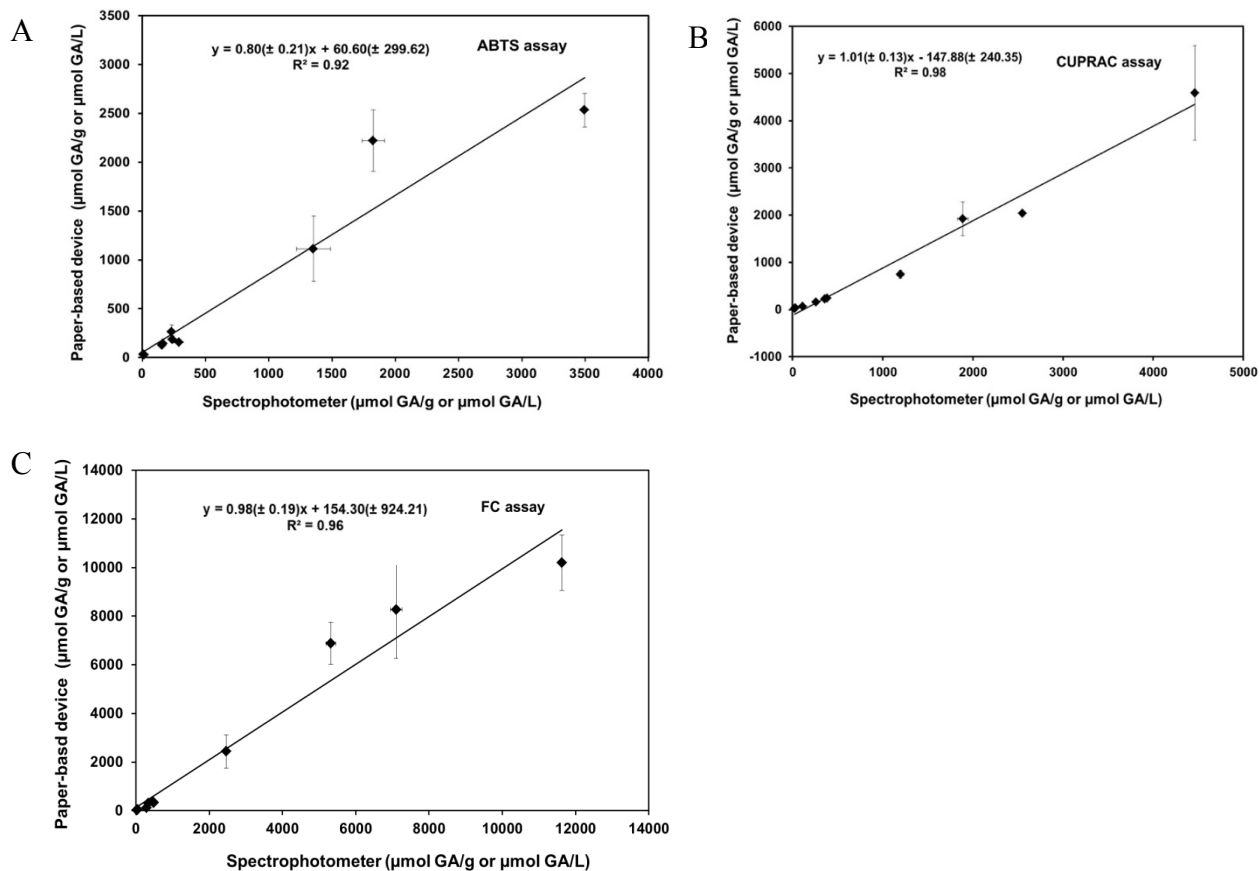
รูปที่ 3-13 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่าง (ชาอู่หลง ชาดำ และไวท์แดง) เทียบกับตัวควบคุม

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างค่าที่ได้จะถูกรายงานในรูปของ gallic acid equivalents (GAE) ในหน่วย $\mu\text{mol/g}$ และ $\mu\text{mol/L}$ สำหรับใบชาแห้งและเครื่องดื่ม (ไวน์ และน้ำผลไม้) ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3-2 จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างชาสามารถจัดอันดับได้ดังนี้ ชาอู่หลง > ชาดำ > ชาเขียว โดยการจัดอันดับดังกล่าวใกล้เคียงกับงานวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Phonchai, Kim, Chantiwas & Cho, 2016; Sirivibulkovit, Nouanthavong, & Sameenoi, 2018.) สำหรับตัวอย่างเครื่องดื่ม ตัวอย่างไวท์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าตัวอย่างน้ำผลไม้ เนื่องจากมีองค์ประกอบของพอลิฟีนอลและสารประกอบฟีนอลิกสูง นอกจากนี้การวิเคราะห์ตัวอย่างให้ %RSD อยู่ในช่วง 3.80–28.18% ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Floegel, *et al.* อีกด้วย

เมื่อนำค่า GAE ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดมาพลอตกราฟระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีแบบดั้งเดิม (อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ)เดิมโดยใช้ regression curve ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 3-14 จากกราฟสมการที่ได้จากการเปรียบเทียบทั้ง 3 วิธี (วิธี) ABTS CUPRAC และ FC) เทียบกับวิธีแบบดั้งเดิมที่แสดงด้วย regression curve ที่ความเชื่อมั่น 95% ของ intercept และ slope พบว่าให้ค่า intercept และ slope ที่ครอบคลุม 0 และ 1 ตามลำดับ ดังนั้นผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีแบบดั้งเดิมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p=0.05$)

ตารางที่ 3-2 ค่า GAE จากการวิเคราะห์ตัวอย่างของทั้ง 3 วิธีด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นกับวิธีทางสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบดั้งเดิม

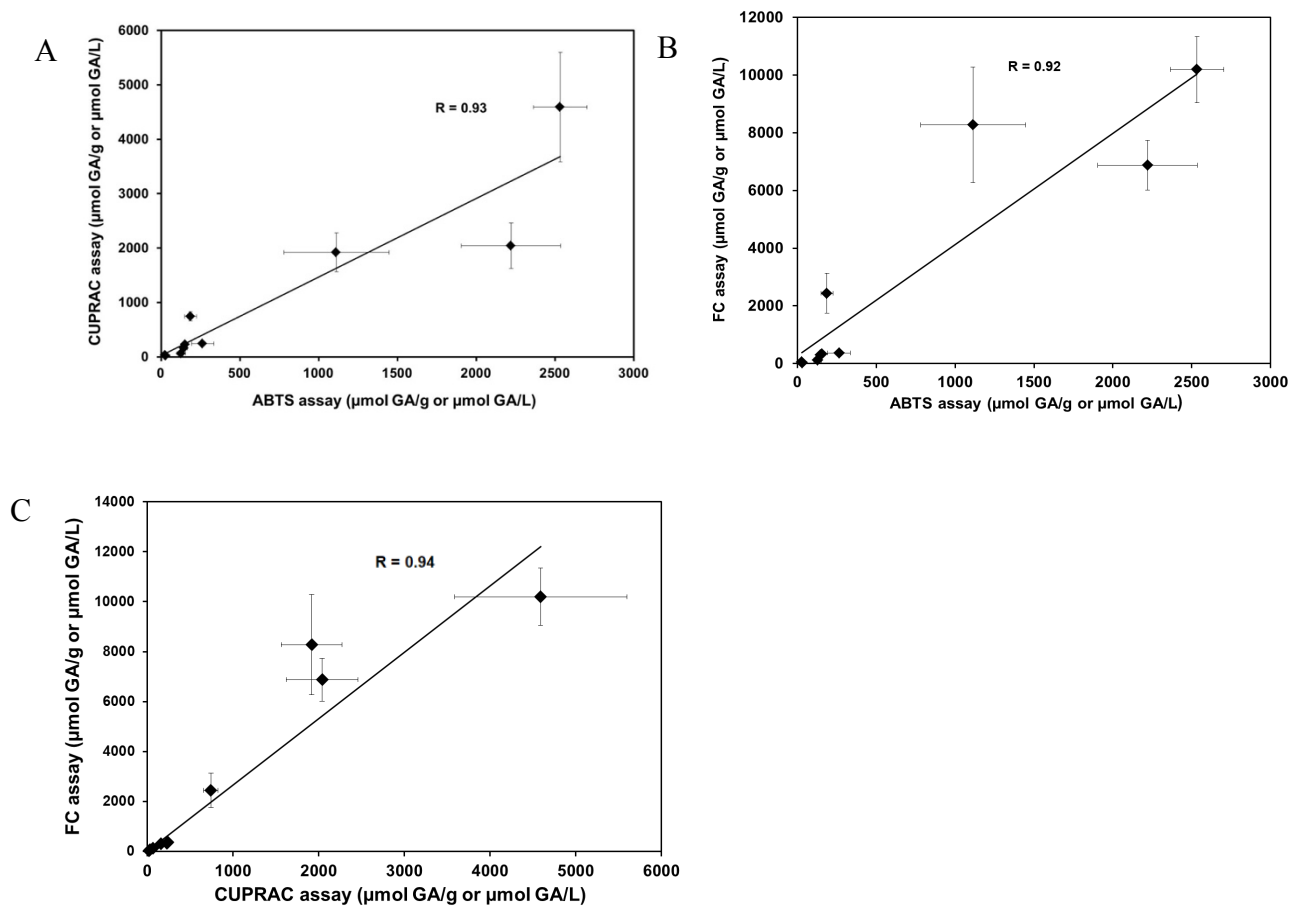
Samples	ABTS		CUPRAC		FC	
	Paper-based	Traditional	Paper-based	Traditional	Paper-based	Traditional
Teas ($\mu\text{mol GA/g}$)						
Mulberry green tea1	26.62 \pm 7.07	17.01 \pm 1.17	32.75 \pm 4.67	30.22 \pm 1.25	51.76 \pm 5.49	43.74 \pm 0.69
Mulberry green tea 2	30.90 \pm 8.11	9.89 \pm 0.29	22.49 \pm 0.85	21.67 \pm 1.42	27.81 \pm 4.33	26.45 \pm 0.20
Oolong tea	263.98 \pm 70.49	232.13 \pm 3.32	244.09 \pm 10.96	383.25 \pm 13.14	369.93 \pm 87.21	474.44 \pm 16.71
Black tea 1	154.62 \pm 13.17	291.94 \pm 1.27	227.14 \pm 36.8	356.32 \pm 17.42	325.47 \pm 54.32	485.57 \pm 6.93
Black tea 2	145.57 \pm 20.54	164.27 \pm 4.98	160.70 \pm 34.42	260.84 \pm 7.17	302.64 \pm 40.15	337.80 \pm 17.49
Black tea 3	127.62 \pm 25.45	158.67 \pm 2.41	64.06 \pm 6.08	110.52 \pm 3.19	120.46 \pm 10.79	291.75 \pm 2.17
Beverages ($\mu\text{mol GA/L}$)						
Bael juice	187.45 \pm 37.22	239.51 \pm 1.20	743.07 \pm 83.30	1196.96 \pm 38.52	2437.79 \pm 686.87	2467.81 \pm 47.36
Red wine 1	2533.37 \pm 170.00	3497.39 \pm 6.83	4590.23 \pm 1005.61	4461.22 \pm 21.57	10196.87 \pm 1147.73	11628.01 \pm 72.49
Red wine 2	2220.63 \pm 315.27	1826.07 \pm 87.39	2040.84 \pm 419.78	2548.53 \pm 58.82	6878.53 \pm 924.36	5322.89 \pm 129.74
Sparkling red wine	1112.43 \pm 332.85	1354.15 \pm 135.02	1919.40 \pm 356.23	1887.64 \pm 57.71	8278.38 \pm 2008.68	7102.88 \pm 158.09



รูปที่ 3-14 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่าง 10 ชนิด (รายงานในรูปแบบ GAE) ด้วย A) วิธี ABTS (B) วิธี CUPRAC และ C) วิธี FC โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นและเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.4.2 ความสัมพันธ์ของทั้ง 3 วิธีบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง 10 ชนิดที่แตกต่างกันโดยใช้ทั้ง 3 วิธี (วิธี ABTS CUPRAC และ FC) บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ จากการทดลองเมื่อนำค่าที่ได้มาพลอตกราฟเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละวิธีโดยใช้ Pearson Correlation (รูปที่ 3-15) พบว่ากราฟที่ได้แสดงค่า Pearson's correlation coefficient (R) ที่สูง โดยวิธี ABTS และ CUPRAC เท่ากับ 0.93 วิธี ABTS และ FC เท่ากับ 0.87 วิธี FC และ CUPRAC เท่ากับ 0.97 จากค่าที่ได้รับดังกล่าวสามารถบ่งชี้ได้ว่าทั้ง 3 วิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมาก และผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 วิธีสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ซึ่งกันและกันได้ ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ของวิธี CUPRAC เพื่อรายงานความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing capacity) สามารถสะท้อนให้เห็นถึงความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity) ของวิธี ABTS และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ของวิธี FC ได้



รูปที่ 3-15 ความสัมพันธ์ของทั้ง 3 วิธีบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษระหว่าง (A) วิธี ABTS และ CUPRAC (B) วิธี FC และ ABTS (C) วิธี FC และ CUPRAC

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้พร้อมกันถึง 2 วิธี และวัดปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดอีก 1 วิธี ได้แก่วิธี CUPRAC ABTS และ FC โดยได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธีบนอุปกรณ์ จากนั้นได้นำเอาสภาวะที่เหมาะสมมาตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหลากหลายชนิด พบว่าอุปกรณ์ดังกล่าวสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานได้อย่างหลากหลายชนิดที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ถึงมิลลิโมลาร์ ซึ่งเทียบเท่ากับช่วงที่ตรวจวัดได้กับงานวิจัยที่เคยมีรายงาน มีความสามารถในการทำซ้ำอยู่ในช่วงที่ดี และให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำ จากผลการทดลองเบื้องต้นจะเห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม ใช้สารปริมาณน้อยกว่าถึง 100 เท่า อุปกรณ์มีน้ำหนักเบาและราคาไม่แพง ไม่ต้องจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ มีแนวโน้มสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์พกพาไปตรวจวัดภาคสนามได้ และเมื่อนำเอาอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอาหารได้แก่ ชา ไวน์และน้ำผลไม้ เทียบกับวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิมพบว่า ค่าที่ได้จากทั้งสองวิธีมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดสูง

4.2 ข้อเสนอแนะ

อุปกรณ์แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างประเภทอื่นได้ และสามารถนำเอาวิธีตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ มาใช้ในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษได้

บทที่ 5 ผลผลิต

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Puangbanlang, C., Siriwibulkovit, K., Nacapricha, D., & Sameenoi, Y. (2019). A paper-based device for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples. *Talanta*. (Impact Factor: 4.244)

เอกสารอ้างอิง

Abe, K., Suzuki, K., & Citterio, D. (2008). Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. *Analytical Chemistry*, 80(18), 6928–6934.

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.

Bener, M., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2013). Novel optical fiber reflectometric cuprac sensor for total antioxidant capacity measurement of food extracts and biological samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8381–8388

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *In Methods In Enzymology*, 299, 15–27.

Bruzewicz, D. A., Reches, M., & Whitesides, G. M. (2002). Low-Cost Printing of Poly (dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. *J. Immunol. Methods*, 266, 1–5.

Cardoso, T. M., Garcia, P. T., & Coltro, W. K. (2015). Colorimetric determination of nitrite in clinical, food and environmental samples using microfluidic devices stamped in paper platforms. *Analytical Methods*, 7(17), 7311–7317.

Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., & Dyatmiko, W. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80(4), 1144–1152.

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.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043–1048.

Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, *18*(1), 29–36.

Phonchai, A., Kim, Y., Chantiwas, R., & Cho, Y. K. (2016). Lab-on-a-disc for simultaneous determination of total phenolic content and antioxidant activity of beverage samples. *Lab on a Chip*, *16*(17), 3268–3275.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118.

Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., & Carrilho, E. (2010). Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*, *82*(1), 3–10.

Martinez, A. W., Phillips, S. T., Wiley, B. J., Gupta, M., & Whitesides, G. M. (2008). FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, *8*(12), 2146–2150.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(10), 4290–4302.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9–10), 1231–1237.

Sameenoi, Y., Panymeesamer, P., Supalakorn, N., Koehler, K., Chailapakul, O., Henry, C. S., & Volckens, J. (2012). Microfluidic paper-based analytical device for aerosol oxidative activity. *Environmental Science & Technology*, *47*(2), 932–940.

Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical Sciences*, *34*(7), 795–800.

Vella, S. J., Beattie, P., Cademartiri, R., Laromaine, A., Martinez, A. W., Phillips, S. T., Mirica, K. A., & Whitesides, G. M. (2012). Measuring markers of liver function using a micropatterned paper device designed for blood from a fingerstick. *Analytical chemistry*, *84*(6), 2883–2891.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 701–705.