



การพัฒนาวิธีอัตโนมัติ รวดเร็ว และราคาถูก
สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน
ด้วยเทคนิคโพลีอินเจคชันอะนาไลซิส

โดย
นางสาวนันทยา ม่านทอง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การพัฒนาวิธีอัตโนมัติ รวดเร็ว และราคาถูกลง
สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน
ด้วยเทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาลิซิส



โดย
นางสาวนันทยา ม่านทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

DEVELOPMENT OF AUTOMATIC, RAPID AND ECONOMIC METHODS
FOR EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY
USING FLOW INJECTION ANALYSIS



By

MISS Nantaya MANTHONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (ANALYTICAL CHEMISTRY)

Department of CHEMISTRY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2017

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การพัฒนาวิธีอัตโนมัติ รวดเร็ว และราคาถูกลง สำหรับประเมิน ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ด้วยเทคนิคโพลีอินเจคชันอะ นาลิซิส
โดย	นันทยา ม่านทอง
สาขาวิชา	เคมีวิเคราะห์ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ดร. สุมนมาลย์ จันทร์เอี่ยม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชมี ชัยสุขสันต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร. สุมนมาลย์ จันทร์เอี่ยม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. วุฒิรัตน์ แม้นทิม)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสาวภาคย์ อีราทรง)

58310202 : เคมีวิเคราะห์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : การผลิตอนุมูลอิสระด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า, ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวม, ระบบการไหลอัตโนมัติ โพลีเอทิลีนอะนาไลซิส, ส่วนตรวจวัดฟิสิกส์

นางสาว นันทยา ม่านทอง: การพัฒนาวิธีอัตโนมัติ รวดเร็ว และราคาถูกลง สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ด้วยเทคนิคโพลีเอทิลีนอะนาไลซิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ดร. สุมนมาลย์ จันทร์เอี่ยม

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีอัตโนมัติ รวดเร็ว และราคาถูกลง สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวม โดยประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ 1) การศึกษาการผลิตอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่รวดเร็วโดยอาศัยวิธีทางเคมีไฟฟ้า 2) การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดสีของสารละลายโดยอาศัยหลักการฟิสิกส์ (Pair Emitter-Detector Diodes, PEDD) ไปใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมแทนเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ด้วยวิธี ABTS วิธี DPPH และวิธี FRAP โดยงานส่วนที่หนึ่ง ได้พัฒนาวิธีการผลิตอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่รวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม โดยอาศัยวิธีทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งใช้เวลาแค่ 10 นาที ในการเปลี่ยน ABTS ไปเป็น ABTS^{•+} โดยใช้ลวดแพลทินัมแบบตรงเป็นขั้วแคโทด จุ่มอยู่ในสารละลาย zinc acetate และลวดแพลทินัมแบบเกลียวคล้ายสปริงเป็นขั้วแอโนดจุ่มอยู่ในสารละลาย ABTS เมื่อให้กระแสไฟฟ้าคงที่แก่ขั้วไฟฟ้าทั้งสอง ด้านแอโนดจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยน ABTS ให้เป็นอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ผู้วิจัยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารละลาย ABTS^{•+} ได้แก่ ความเข้มข้นของกระแสไฟฟ้า เวลาที่จ่ายกระแสไฟฟ้า ความเข้มข้นและชนิดของสารละลาย supporting electrolyte และความเข้มข้นของสารละลาย ABTS พบว่าในสถานะที่เหมาะสมจะได้สารละลาย ABTS^{•+} ที่มีสีเขียวน้ำเงินและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เท่ากับ 0.7 และนำสารละลาย ABTS^{•+} ที่ผลิตได้ไปใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยระบบการไหลโพลีเอทิลีนอะนาไลซิส พบว่าเมื่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชัน จะทำให้ปริมาณของ ABTS^{•+} ลดลง สีของสารละลาย ABTS^{•+} จะจางลง ซึ่งสามารถติดตามวัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS^{•+} ที่ลดลงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันของวิธีการผลิตอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการผลิตอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิมด้วยวิธีการใช้สารเคมี พบว่าผลการวิเคราะห์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยส่วนที่สองเป็นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดสีของสารละลายโดยอาศัยหลักการฟิสิกส์ (PEDD) ซึ่งใช้หลอดไดโอดเปล่งแสงหรือหลอดไฟแอลอีดี (Light emitting diode, LED) ทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งกำเนิดแสงและเป็นตัวรับแสง และนำอุปกรณ์ฟิสิกส์ที่สร้างขึ้นไปใช้เป็นส่วนประกอบตรวจวัดสำหรับระบบการไหลที่พัฒนาขึ้นในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวม ด้วยวิธี ABTS วิธี DPPH และวิธี FRAP ทดแทนการใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ซึ่งมีราคาแพง และศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ สีของหลอดแอลอีดี อัตราการไหลของสารละลาย และปริมาตรสารตัวอย่าง อีกทั้งยังพัฒนาระบบการไหลด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ ABTS และแบบ FRAP ไปพร้อมกันเพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวม โดยใช้โพรบเจกชันวาล์วแบบ 10-port และเครื่องตรวจวัดชนิดฟิสิกส์ 2 เครื่อง และนำระบบที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้ เครื่องดื่มสมุนไพร และวิตามินซีแบบเม็ด โดยรายงานเป็นค่า Ascorbic acid equivalent (AAE) เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์แบบ batch ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้สร้างโพลีเอทิลีนอะนาไลซิส และสร้างเครื่องต้นแบบเซลล์เรอิมิตเตอร์แบบพกพาโดยอาศัยหลักการของฟิสิกส์อีกด้วย ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าสามารถใช้งานได้ อย่างไรก็ตามต้องศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของโพลีเอทิลีนอะนาไลซิส และความเสถียรของเครื่องเซลล์เรอิมิตเตอร์นี้ต่อไป

58310202 : Major (ANALYTICAL CHEMISTRY)

Keyword : Electrochemical generation, Total antioxidant capacity (TAC), Flow injection analysis (FIA), Paired Emitter-Detector Diodes (PEDD)

MISS NANTAYA MANTHONG : DEVELOPMENT OF AUTOMATIC, RAPID AND ECONOMIC METHODS FOR EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY USING FLOW INJECTION ANALYSIS THESIS ADVISOR : DR. SUMONMARN CHANEAM

This work presents the development of automatic, rapid and economic methods for evaluation of total antioxidant capacity (TAC) which consists of two parts. The first part describes a rapid method for generation of ABTS radical cation ($ABTS^{•+}$) using electrochemical technique. Due to the conventional chemical generation is time-consuming which requires 12-16 hrs. Using the electrochemical technique, the generation time was reduced to 10 minutes. To produce the $ABTS^{•+}$ electrochemically, a wire platinum was used as a cathode, immersing in zinc acetate solution, and a platinum coil was used as an anode, immersing in ABTS solution. A constant current was applied. Then, $ABTS^{•+}$ was produced at the anode. Some parameters were optimized with respect to applied current, generation time, supporting electrolyte and ABTS concentration. Under the optimum condition, the blue-green color of $ABTS^{•+}$ was appeared and the maximum absorbance at 734 nm of about 0.7 was achieved. The $ABTS^{•+}$ solution obtained from our method was used to evaluate the TAC by a flow injection analysis (FIA) system. Upon reaction with an antioxidant, the blue-green color of $ABTS^{•+}$ was diminished and monitored by a UV-Vis spectrophotometer. The sample analysis results obtained from our method was comparable to the results obtained from the conventional batch method with the $ABTS^{•+}$ chemical generation. In the second part, a simple colorimeter based on Paired Emitter-Detector Diodes (PEDD) was constructed as a detection device in the FIA system for evaluation of TAC instead of using the common spectrophotometer. The PEDD consists of two light emitting diodes (LEDs), which are LED-emitter and LED-detector. Some parameters affected the analytical performance were investigated including, color of LED, flow rate and injection volume. At the optimum condition, the PEDD furnished with the FIA system was employed for evaluation of TAC using ABTS, DPPH and FRAP assays, separately. Moreover, the TAC can be simultaneous analysis using the FIA with a 10-port valve and two PEDD devices. The TAC was measuring using the ABTS and FRAP assay in parallel. The developed method was applied to the measurement of TAC of commercial fruit juice, instant tea product and vitamin C tablet using ascorbic acid as a standard antioxidant. The ascorbic acid equivalent values (AAC) from our method were not significantly different from the reference batch methods with spectrophotometric detection. Moreover, a lab-made flow cell and a prototype of handheld colorimeter were also fabricated. Preliminary results show that the fabricated flow cell and the handheld colorimeter can be used for antioxidant assays. However, further experiments for testing of repeatability and stability should be investigated

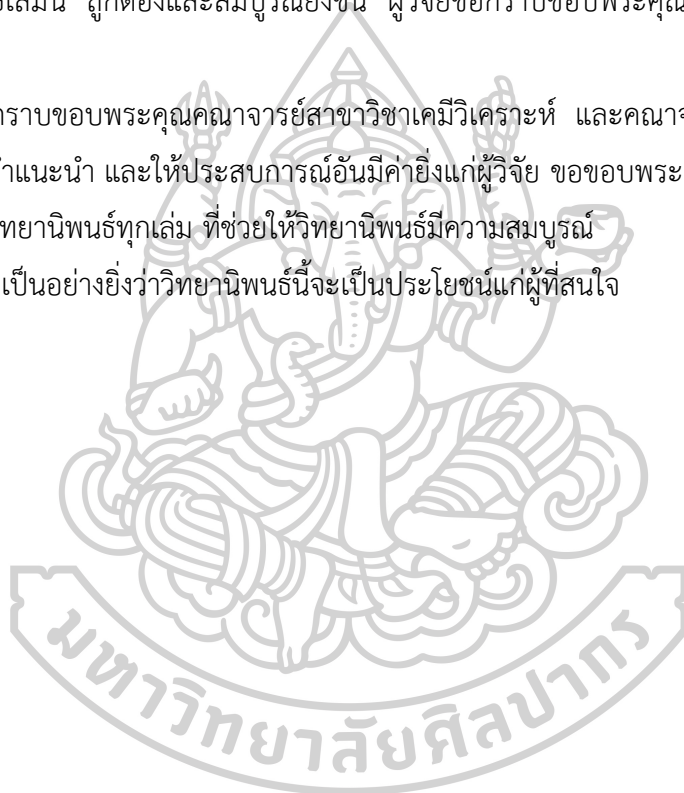
กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจากอาจารย์ ดร.สมนมาลัย จันทรเอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร.ฐิติรัตน์ แม้นทิม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้วิจัย รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัศมี ชัยสุขสันต์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวภาคย์ อีราทรง ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ส่งผลให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของทุกท่านเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์ และคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำ และให้ประสบการณ์อันมีค่ายิ่งแก่ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณผู้เขียนหนังสือ วารสาร เอกสาร และวิทยานิพนธ์ทุกเล่ม ที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์

หวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์นี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ

นันทยา ม่านทอง



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ (Introduction).....	1
1.1 ที่มา และความสำคัญ (Statement of problems).....	1
1.2 วัตถุประสงค์ (Purposes of research).....	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย (Hypotheses of research).....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย (Scopes of research).....	3
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Theory and Literature reviews).....	4
2.1 อนุมูลอิสระ (Free radical).....	4
2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant).....	5
2.3 วิธีประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน.....	7
2.3.1 วิธี ABTS assay.....	7
2.3.2 วิธี DPPH assay.....	10
2.3.3 วิธี FRAP assay.....	11
2.3.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน.....	12
2.4 การนำระบบการไหลอัตโนมัติแบบโพลินเจคชันอะนาลิซิสมาใช้ประเมินความสามารถของสารต้านออกซิเดชัน.....	14
2.5 ส่วนตรวจวัดพีอีดีดี (Paired Emitter-Detector Diodes, PEDD).....	15
2.5.1 ส่วนประกอบและหลักการทำงานของพีอีดีดี.....	15

2.5.2	หลอดไดโอดเปล่งแสง.....	16
2.5.3	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพีอีดีดี	20
<p>บทที่ 3 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการดำเนินงานวิจัย (Instrument, Glassware, Chemicals and Method).....</p>		
3.1	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
3.2	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
3.3	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.4	การเตรียมสารละลาย.....	25
3.5	การเตรียมตัวอย่าง	27
3.6	วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	27
3.6.1	การผลิต ABTS ^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า.....	27
3.6.1.1	เวลาที่จ่ายกระแสไฟฟ้า.....	29
3.6.1.2	ความเข้มข้นของกระแสไฟฟ้า	30
3.6.1.3	ความเข้มข้นของสารละลาย ABTS.....	31
3.6.1.4	ชนิดของสารละลาย supporting electrolyte	32
3.6.1.5	ความเข้มข้นของสารละลาย supporting electrolyte.....	32
3.6.1.6	ความเสถียรของสารละลาย ABTS ^{•+}	32
3.6.1.7	การนำ ABTS ^{•+} ที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้ามาทดสอบการใช้งาน.....	32
3.6.2	สร้างและทดสอบเซลล์เลอริมิเตอร์โดยอาศัยหลักการของพีอีดีดี	34
3.6.2.1	การทดสอบประสิทธิภาพของพีอีดีดีกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์.....	34
3.6.2.2	สีหลอดแอลอีดีสำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน	34
3.6.3	การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของระบบ FIA-PEDD สำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบปฏิกิริยาเดี่ยว (Single assay)	35
3.6.4	การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยระบบ FIA-PEDD แบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน (Dual assay).....	36

3.6.5 การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมของตัวอย่างด้วยวิธีดั้งเดิมแบบ Batch (classical method).....	37
3.6.6 การสร้างเครื่องต้นแบบคัลเลอร์มิเตอร์แบบพกพา (Prototype of handheld colorimeter).....	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง (Results and Discussion).....	40
4.1 การผลิต ABTS ^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า	40
4.1.1 ผลของเวลาที่จ่ายกระแสไฟฟ้า	40
4.1.2 ผลของความเข้มข้นของกระแสไฟฟ้า.....	41
4.1.3 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย ABTS	41
4.1.4 ผลของชนิดของสารละลาย supporting electrolyte	42
4.1.5 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย Zinc acetate.....	43
4.1.6 ผลของความเสถียรของ ABTS ^{•+}	43
4.1.7 การประยุกต์ ABTS ^{•+} ที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าเพื่อใช้ประเมินประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรด้วยวิธี ABTS assay	44
4.2 การสร้างและทดสอบฟีดดีตี	46
4.2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของฟีดดีตีเปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ...	46
4.2.1.1 วิธี ABTS assay	46
4.2.1.2 วิธี DPPH assay	48
4.2.1.3 วิธี FRAP assay	50
4.2.2 ผลของสีหลอดแอลอีดีสำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน	51
4.2.2.1 วิธี ABTS assay	51
4.2.2.2 วิธี DPPH assay	53
4.2.2.3 วิธี FRAP assay	54
4.3 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของระบบ FIA-PEDD สำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบปฏิกิริยาเดียว	56

4.3.1	วิธี ABTS assay	56
4.3.1.1	ผลของความยาวของท่อผสมเมื่อใช้วิธี ABTS assay.....	56
4.3.1.2	ผลของอัตราการไหลเมื่อใช้วิธี ABTS assay.....	56
4.3.1.3	ผลของปริมาตรตัวอย่างเมื่อใช้วิธี ABTS assay	57
4.3.1.4	คุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธี ABTS assay.....	58
4.3.1.5	การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันในตัวอย่างด้วยวิธี ABTS assay	60
4.3.2	วิธี DPPH assay.....	61
4.3.2.1	ผลของอัตราการไหลเมื่อใช้วิธี DPPH assay	61
4.3.2.2	ผลของปริมาตรตัวอย่างเมื่อใช้วิธี DPPH assay.....	61
4.3.2.3	คุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธี DPPH assay	62
4.3.3	วิธี FRAP assay	64
4.3.3.1	ผลของอัตราการไหลเมื่อใช้วิธี FRAP assay	64
4.3.3.2	ผลของปริมาตรตัวอย่างเมื่อใช้วิธี FRAP assay	64
4.3.3.3	คุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธี FRAP assay.....	65
4.3.3.4	การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันในตัวอย่างด้วยวิธี FRAP assay	67
4.4	การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยระบบ FIA-PEDD แบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน	68
4.5	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมของตัวอย่าง โดยระบบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีดั้งเดิม (classical method).....	70
4.6	การสร้างและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ flow cell ร่วมกับระบบ FIA-PEDD.....	73
4.7	การสร้างเครื่องต้นแบบคัลเลอร์มิเตอร์แบบพกพา.....	76
4.7.1	ทดสอบการใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน	76
4.7.2	ศึกษาอายุการใช้งาน.....	78

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง (Conclusions) 79

รายการอ้างอิง 80

ภาคผนวก (Appendices)..... 86

ประวัติผู้เขียน..... 108



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดแอสคอร์บิก 6

รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรดแกลลิก 7

รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน ABTS ไปเป็น ABTS^{•+} และปฏิกิริยาของ ABTS^{•+} reagent กับ Antioxidant..... 8

รูปที่ 2.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับ %Remaining..... 8

รูปที่ 2.5 การจัดวางอุปกรณ์ในการผลิต ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า..... 10

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)..... 10

รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาของ DPPH[•] reagent กับ Antioxidant..... 11

รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาของ FRAP reagent กับ Antioxidant..... 12

รูปที่ 2.9 อุปกรณ์ฟอโตดี..... 15

รูปที่ 2.10 รางวัลโนเบลสาขาฟิสิกส์ในปี 2014 17

รูปที่ 2.11 ส่วนประกอบของหลอด LED..... 17

รูปที่ 2.12 ลักษณะการทำงานของ LED..... 18

รูปที่ 3.1 การจัดวางอุปกรณ์ในการผลิต ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า..... 28

รูปที่ 3.2 สารละลาย ABTS ก่อน และสารละลาย ABTS^{•+} หลังการผลิตด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า..... 28

รูปที่ 3.3 แผนภาพจำลองระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสสำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS..... 33

รูปที่ 3.4 แผนภาพจำลองระบบการไหล FIA-PEDD สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน..... 35

รูปที่ 3.5 หน้าจอแสดงผลของโปรแกรม LabVIEW 8.2TM 36

รูปที่ 3.6 แผนภาพจำลองระบบการไหล FIA-PEDD สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน และ 10-port valve แสดงจังหวะ load และ inject..... 37

รูปที่ 3.7 หน้าจอแสดงผลของโปรแกรม LabVIEW 8.2™ แบบ 2 channel 37

รูปที่ 3.8 การออกแบบลักษณะภายนอกของเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพา..... 39

รูปที่ 3.9 การออกแบบลักษณะภายในของเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพา..... 39

รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS^{•+} เมื่อใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.2 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 6 mA เป็นเวลานาน 5, 10 และ 20 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว Zinc acetate เป็น supporting electrolyte 40

รูปที่ 4.2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS^{•+} เมื่อใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.2 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2, 4, 6 และ 8 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว Zinc acetate เป็น supporting electrolyte 41

รูปที่ 4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS^{•+} เมื่อใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.2, 0.3 และ 0.4 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว Zinc acetate เป็น supporting electrolyte 42

รูปที่ 4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS^{•+} เมื่อใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.4 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว Zn(CH₃COO)₂, Zn(NO₃)₂ และ ZnCl₂ เป็น supporting electrolyte 42

รูปที่ 4.5 The Hofmeister series 43

รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS^{•+} เมื่อใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.4 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลาย Zinc acetate เข้มข้น 0.5, 1.0 M และอิมิตัวเป็น supporting electrolyte 43

รูปที่ 4.7 การดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS^{•+} เป็นเวลา 30 นาที เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.4 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว Zinc acetate เป็น supporting electrolyte 44

รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก กับสัญญาณที่วัดได้จากพีอีดีซีของสารละลาย ABTS ^{•+} reagent ผสมกับสารละลาย มาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	47
รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานแสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากพีอีดีซีกับค่าการดูดกลืน แสงของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 nm	47
รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก กับสัญญาณที่วัดได้จากพีอีดีซีของสารละลาย DPPH [•] reagent ผสมกับสารละลาย มาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
รูปที่ 4.11 กราฟมาตรฐานแสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากพีอีดีซีกับค่าการดูดกลืน แสงของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 nm	49
รูปที่ 4.12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก กับสัญญาณที่วัดได้จากพีอีดีซีของสารละลาย FRAP reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	50
รูปที่ 4.13 กราฟมาตรฐานแสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จาก PEDD detector กับค่า การดูดกลืนแสงของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 nm	51
รูปที่ 4.14 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีฟ้าและสีแดง และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ สารละลาย ABTS ^{•+} ที่มีสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	52
รูปที่ 4.15 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีแดง และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง น้ำผลไม้เจือจางตามทิวเคราะห์จริง	52
รูปที่ 4.16 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีเขียวและสีแดง และสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ของสารละลาย DPPH [•] ที่มีสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	54
รูปที่ 4.17 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีแดง และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ สารละลาย FRAP ที่มีสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	55
รูปที่ 4.18 กราฟแสดงผลของความยาวของท่อผสมของวิธี ABTS assay	56
รูปที่ 4.19 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของวิธี ABTS assay.....	57
รูปที่ 4.20 กราฟแสดงผลของปริมาตรตัวอย่างของวิธี ABTS assay.....	58

รูปที่ 4.21 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่างๆ กับ สารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ^{•+} ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD (a) และกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับความสูงของ สัญญาณ (b).....	59
รูปที่ 4.22 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของวิธี DPPH assay.....	61
รูปที่ 4.23 กราฟแสดงผลของปริมาตรตัวอย่างของวิธี DPPH assay.....	62
รูปที่ 4.24 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่างๆ กับ สารละลายอนุมูลอิสระ DPPH [•] ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD (a) และกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับความสูงของ สัญญาณ (b).....	63
รูปที่ 4.25 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของวิธี FRAP assay.....	64
รูปที่ 4.26 กราฟแสดงผลของปริมาตรตัวอย่างของวิธี FRAP assay.....	65
รูปที่ 4.27 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่างๆ กับ สารละลาย FRAP reagent ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD (a) และกราฟมาตรฐานแสดง ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับความสูงของ สัญญาณ (b).....	66
รูปที่ 4.28 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดด้วยระบบการไหล FIA-PEDD ของวิธี ABTS assay (a) และ FRAP assay (c) และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับความสูงของสัญญาณของวิธี ABTS assay (b) และ FRAP assay (d).....	69
รูปที่ 4.29 กราฟแสดงสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน	72
รูปที่ 4.30 กราฟแสดงสหสัมพันธ์แบบเชิงอันดับของสเปียร์แมน	72
รูปที่ 4.31 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก กับความสูงของสัญญาณ	75
รูปที่ 4.32 เครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพาที่ประดิษฐ์ขึ้นในงานวิจัยนี้.....	76
รูปที่ 4.33 สัญญาณที่วัดได้จากเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์เมื่อใช้งานครั้งละ 3 ชั่วโมง.....	78
รูปที่ 4.34 สัญญาณที่วัดได้จากเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์เมื่อใช้งานต่อเนื่อง 12 ชั่วโมง.....	78

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ค่า Gallic acid equivalent (GAE) ในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรที่วิเคราะห์ 7 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ABTS ที่ใช้ระบบการไหลโพลอินเจกชันอะนาไลซิส (FIA method) โดยใช้ สารละลาย ABTS⁺ ที่ผลิตโดยวิธีทางเคมีไฟฟ้า เปรียบเทียบกับค่า GAE จากวิธีดั้งเดิม (Batch method) ที่ใช้สารละลาย ABTS⁺ ที่เตรียมได้จากการใช้สารเคมี 45

ตารางที่ 4.2 สมการเส้นตรง ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) และช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการสร้าง กราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก โดยเปลี่ยนหลอด LED-emitter และ LED-detector เป็นสีต่างๆ สำหรับวิธี ABTS assay..... 51

ตารางที่ 4.3 สมการเส้นตรง ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) และช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการสร้าง กราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก โดยเปลี่ยนหลอด LED-emitter และ LED-detector เป็นสีต่างๆ สำหรับวิธี DPPH assay 53

ตารางที่ 4.4 สมการเส้นตรง ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) และช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการสร้าง กราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก โดยเปลี่ยนหลอด LED-emitter และ LED-detector เป็นสีต่างๆ สำหรับวิธี FRAP assay..... 54

ตารางที่ 4.5 คุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธี ABTS assay 59

ตารางที่ 4.6 ค่า Ascorbic acid equivalent (AAE) ในตัวอย่างน้ำผลไม้ 8 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วย วิธี ABTS assay ที่ใช้ระบบการไหลโพลอินเจกชันอะนาไลซิสร่วมกับส่วนตรวจวัดฟิอิตีดี (FIA-PEDD) เปรียบเทียบกับค่า AAE จากวิธีดั้งเดิม (Classical batch method)..... 60

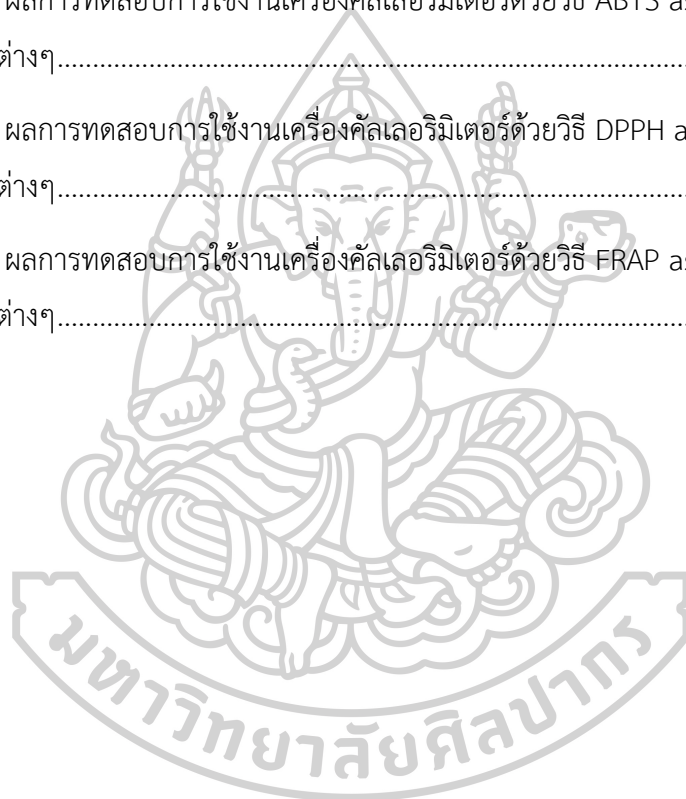
ตารางที่ 4.7 คุณลักษณะของวิธี DPPH assay 63

ตารางที่ 4.8 คุณลักษณะของวิธี FRAP assay 66

ตารางที่ 4.9 ค่า Ascorbic acid equivalent (AAE) ในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพร 10 ตัวอย่าง ที่ วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay ที่ใช้ระบบการไหลโพลอินเจกชันอะนาไลซิสร่วมกับส่วน ตรวจวัดฟิอิตีดี (FIA-PEDD) เปรียบเทียบกับค่า AAE จากวิธีดั้งเดิม (Classical batch method) 67

ตารางที่ 4.10 คุณลักษณะในการวิเคราะห์ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD แบบสองปฏิกิริยาไปพร้อม กัน 69

ตารางที่ 4.11 ค่า Ascorbic acid equivalent (AAE) ในตัวอย่าง 18 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดฟลูออโรมิเตอร์แบบสองปฏิกิริยาพร้อมกัน เปรียบเทียบกับ AAE จากวิธีดั้งเดิม (Classical batch method).....	71
ตารางที่ 4.12 ผลของความยาวของ path length.....	74
ตารางที่ 4.13 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อ.....	75
ตารางที่ 4.14 ผลของชนิดของอะคริลิก.....	75
ตารางที่ 4.15 ผลการทดสอบการใช้งานเครื่องคัดเลอริมิเตอร์ด้วยวิธี ABTS assay เมื่อใช้แอลกอฮอล์ ต่างๆ.....	77
ตารางที่ 4.16 ผลการทดสอบการใช้งานเครื่องคัดเลอริมิเตอร์ด้วยวิธี DPPH assay เมื่อใช้แอลกอฮอล์ ต่างๆ.....	77
ตารางที่ 4.17 ผลการทดสอบการใช้งานเครื่องคัดเลอริมิเตอร์ด้วยวิธี FRAP assay เมื่อใช้แอลกอฮอล์ ต่างๆ.....	77



วิทยานิพนธ์นี้

ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จากเงินรับฝากโครงการบริการวิชาการ

(โครงการอบรมภาษาอังกฤษเข้ม)

ของบัณฑิตวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2561

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร



บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

1.1 ที่มา และความสำคัญ (Statement of problems)

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสารที่ไม่เสถียรเนื่องจากมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยากับสารในร่างกายและทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ภายในร่างกายด้วย อาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคได้หลายชนิด เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้นการทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายอาจช่วยป้องกันการเกิดโรคดังกล่าวได้

สารที่มีความสามารถต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระเรียกว่า “สารต้านอนุมูลอิสระ” เป็นสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโมเลกุลข้างเคียง เกิดต่อเนื่องกันเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และทำลายเซลล์ของร่างกาย โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการจับกับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) และยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน บางครั้งจึงเรียกสารต้านอนุมูลอิสระว่า “สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)” โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่ร่างกายเราสร้างได้เอง และที่ต้องบริโภคจากอาหารหรือเครื่องดื่ม เช่น วิตามินอี วิตามินเอ แคโรทีนอยด์ วิตามินซี เป็นต้น

การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันทำได้โดยใช้เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ ซึ่งวิธีที่นิยมมีหลายวิธี เช่น วิธี ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) assay วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assay เป็นต้น วิธี ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2'- Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt หรือ ABTS โดยต้องเปลี่ยน ABTS ให้อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ $ABTS^{+•}$ ซึ่งหากใช้สารเคมีเป็นตัวออกซิไดส์ จะต้องใช้เวลา 12-16 ชั่วโมง สารละลาย $ABTS^{+•}$ ที่ได้มีสีเขียว ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 nm เมื่อสารต้านออกซิเดชันทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{+•}$ จะทำให้อนุมูลอิสระ $ABTS^{+•}$ ลดลง ทำให้ความเข้มของสารละลายสีเขียวจะลดลงด้วย โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC50) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $ABTS^{+•}$ เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลเป็น 50% inhibition concentration (IC50) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+•}$ ได้ 50% วิธีที่สอง คือ วิธี DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้

reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เมื่อละลายในตัวทำละลายอินทรีย์จะได้ DPPH[•] ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 nm เมื่อสารต้านออกซิเดชันทำปฏิกิริยากับ DPPH[•] อนุมูลอิสระ DPPH[•] จะลดน้อยลงทำให้ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลง โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า EC50 หรือ IC50 เช่นกัน และวิธี FRAP assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน อาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ โดยสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างไม่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่งมีสีฟ้าที่เข้มมากขึ้น สามารถติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่ความยาวคลื่น 595 nm จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันสารตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Ferrous sulfate หรือสารมาตรฐานอื่นๆ เนื่องจากการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วย 3 วิธี ที่กล่าวมาข้างต้นนั้นต้องใช้เวลากำให้สารทำปฏิกิริยากันแล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่เสถียร พบว่าต้องใช้เวลานานเป็นอย่างน้อย 30 นาที

งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันให้เป็นอัตโนมัติ รวดเร็ว และมีราคาถูก โดยใช้วิธีทางเคมีไฟฟ้ามาผลิต ABTS^{•+} ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็ว และพัฒนาเครื่องเซลล์โรติมิตอร์เพื่อใช้ทดแทนสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีราคาแพง แล้วนำเซลล์โรติมิตอร์นี้ไปใช้เป็นส่วนตรวจวัดของระบบวิเคราะห์การไหลโพลีอิมเมอร์อะนาไลซิสเพื่อให้การวิเคราะห์เป็นอัตโนมัติมากขึ้น ใช้ปริมาณรีเอเจนต์น้อยลง อย่างไรก็ตามวิธีการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันทั้ง 3 วิธีนี้ แม้จะใช้ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป แต่มีหลักการที่แตกต่างกัน ดังนั้นโดยทั่วไปแล้วการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันจึงนิยมใช้มากกว่าหนึ่งวิธีเพื่อเป็นการยืนยันผลที่วิเคราะห์ได้ หรือดูแนวโน้มความสามารถในการต้านออกซิเดชันของแต่ละตัวอย่าง ซึ่งหากมีตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนมากก็จะต้องใช้รีเอเจนต์ปริมาณมากและใช้เวลาในการวิเคราะห์นานอีกด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน ทำให้สามารถประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ 2 วิธี ในการวิเคราะห์เพียงหนึ่งครั้ง เพื่อลดระยะเวลาวิเคราะห์ ลดการใช้สารเคมี และลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

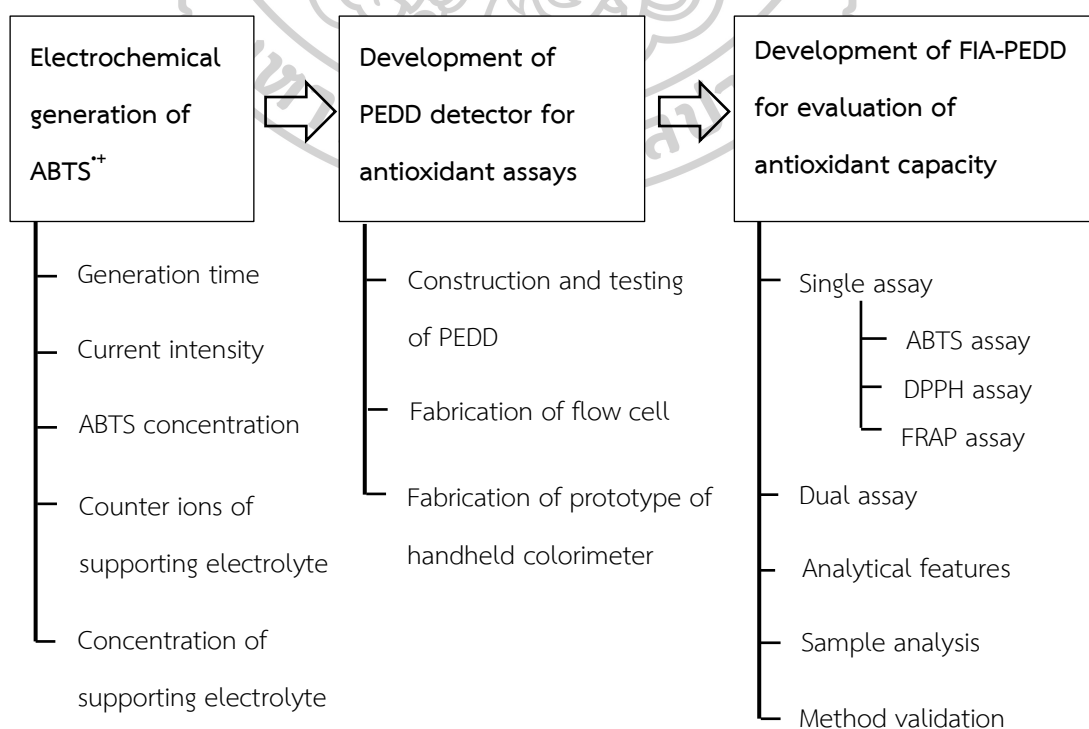
1.2 วัตถุประสงค์ (Purposes of research)

- 1.) เพื่อผลิต ABTS^{•+} ได้อย่างรวดเร็วด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า
- 2.) เพื่อสร้างอุปกรณ์คัลเลอริมิเตอร์อย่างง่ายโดยอาศัยหลักการของฟิอิดิตี
- 3.) เพื่อนำฟิอิดิตีที่สร้างขึ้นมาใช้งานร่วมกับระบบการไหลอัตโนมัติแบบ FIA
- 4.) เพื่อพัฒนาระบบ FIA-PEDD สำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบปฏิกิริยาเดียวและสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน
- 5.) เพื่อนำระบบ FIA-PEDD ที่พัฒนามาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงและเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง

1.3 สมมติฐานของการวิจัย (Hypotheses of research)

- 1.) การผลิต ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า จะใช้เวลาน้อยกว่าการผลิตด้วยการใช้สารเคมี
- 2.) คัลเลอริมิเตอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการของ PEDD มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดที่ดี และสามารถใช้ทดแทนเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ได้
- 3.) สามารถประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างโดยอาศัยหลักการของวิธี ABTS assay, DPPH assay และ FRAP assay ด้วยระบบที่พัฒนาขึ้น

1.4 ขอบเขตการวิจัย (Scopes of research)



บทที่ 2

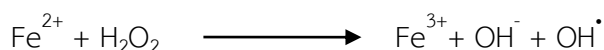
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Theory and Literature reviews)

2.1 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระหมายถึงอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดเป็นสารที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสูญเสียหรือให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่นเพื่อให้อิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, O_2^-) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl, OH^\cdot) อนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl, ROO^\cdot) เป็นต้น อนุมูลอิสระเกิดได้จาก 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยจากภายในและภายนอกร่างกาย ปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกาย เช่น การทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase, XOD) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระบวนการสลายเบสพิวรีนโดยเปลี่ยนไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) เป็นแซนทีน (xanthine) ซึ่งแซนทีนเกิดปฏิกิริยาต่อเปลี่ยนเป็นกรดยูริก (uric acid) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ดังปฏิกิริยา (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008)



ในร่างกายมีโลหะทรานซิชันเช่น เหล็ก ทองแดง เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^\cdot) ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์ที่แรงและไวในการทำปฏิกิริยาสูงมีค่าครึ่งชีวิตสั้นมากประมาณ 10^{-9} วินาที ดังนั้นอนุมูลไฮดรอกซิลจึงเป็นอันตรายต่อชีวโมเลกุลมากกว่าอนุมูลชนิดอื่นๆ ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton's reaction) ดังสมการ (Young & Woodside, 2001)



ปัจจัยภายนอกที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น การได้รับยา โดยเฉพาะยาต้านมะเร็ง เช่น adriamycin, mitomycin C, bleomycin เมื่อรับประทานเข้าไปจะเกิดอนุมูลอิสระและเกิดภาวะลิพิดเปอร์ออกซิเดชันซึ่งเป็นกระบวนการที่ลิพิดถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ควันทูบรีประกอบด้วย ไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO_2) และแอลคิลเปอร์ออกไซด์ไนไตรท์ ($ROONO$) ซึ่งเป็นสาเหตุของอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิล หรือไอโชนในอากาศแม้จะไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่เป็นตัวออกซิไดส์ที่แรงและ

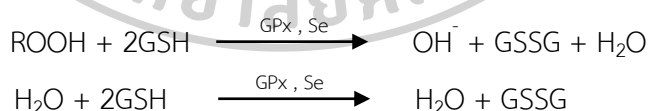
ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้ เมื่ออนุมูลไอโชนแอนไอออนทำปฏิกิริยากับโปรตอนจะเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น แสงแดด คาร์บอนไดออกไซด์ ไอเสียรถยนต์ อาหารประเภทแป้ง ยีสต์ สารชีวโมเลกุลในร่างกาย ได้แก่ ไขมัน โปรตีนและดีเอ็นเอ สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระทำให้การทำงานของสารชีวโมเลกุลเกิดความบกพร่องหรือถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคต่างๆ จะเห็นว่าคนเมืองมักเจ็บป่วยมากกว่าคนชนบท อาจเป็นเพราะว่าคนเมืองมีปัจจัยเสี่ยงในการรับอนุมูลอิสระมากกว่าโดยเฉพาะเรื่องอาหารการกินและมลพิษสิ่งแวดล้อม

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

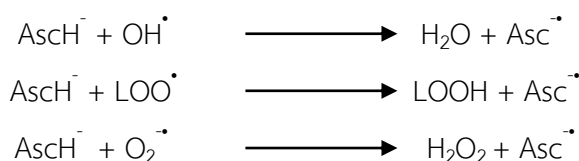
สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ ในร่างกายมีเอนไซม์บางชนิดที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) สามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนโดยเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



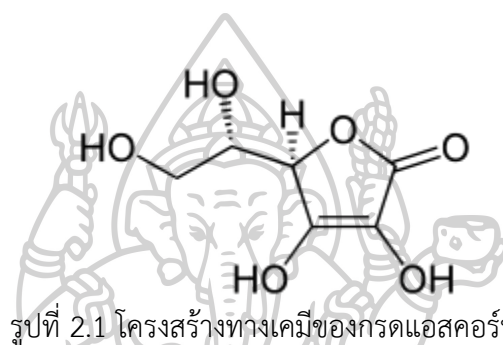
เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPX) ทำงานร่วมกับธาตุซีลีเนียมและกลูตาไทโอน (GSH) โดยเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและกลูตาไทโอนไดซัลไฟด์ (GSSG) นอกจากนี้สามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาเฟนตัน ดังสมการ



ปัจจุบันพบว่าผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพรที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีสารเคมีหลายชนิดที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบ เช่น วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) พบมากในผักและผลไม้สด เช่น ดอกขี้เหล็ก ผักหวาน มะรุม ส้ม มะขามป้อม เมื่อ ascorbic acid (AscH_2) อยู่ในร่างกายจะแตกตัวให้ไฮโดรเจนแล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูป ascorbate anion (AscH^-) ซึ่งเมื่อให้อิเล็กตรอนและไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเปอร์ออกซิล และ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน จะได้อนุมูล semidehydroascorbate ($\text{Asc}^{\cdot-}$) ที่เสถียร ดังสมการ

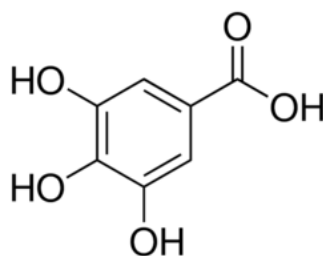


วิตามินซีในอาหารมี 2 รูปแบบซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ได้คือ ascorbic acid และ dehydroascorbic acid ซึ่ง ascorbic acid มีลักษณะโมเลกุลคล้ายกับน้ำตาลกลูโคส มีผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.1



ascorbic acid เมื่อถูกออกซิไดซ์จะกลายเป็น dehydroascorbic acid ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาทางเคมีในร่างกาย วิตามินซีละลายตัวได้เร็วที่สุดในจำพวกวิตามินด้วยกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวต่อออกซิเจนมาก (มีความไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน) นอกจากนี้ยังสามารถละลายตัวได้ง่ายในบรรยากาศที่มีความร้อน แสง ความชื้น โลหะหนัก (เช่น เมื่อตั้งทิ้งไว้ในบรรยากาศที่มีทองแดง) และในสิ่งแวดล้อมที่มีสภาพเป็นด่าง คุณสมบัติและปัจจัยต่างๆ เหล่านี้เป็นตัวทำให้วิตามินซีในพืชผักและผลไม้ละลายตัวได้ง่าย โดยเฉพาะพืชผักและผลไม้ที่เด็ดจากต้นมาเป็นเวลานานๆ หรือนำมาผ่านกระบวนการหุงต้ม (Yoshihara, Fujiwara, & Suzuki, 2010)

นอกจาก ascorbic acid แล้ว gallic acid หรือกรดแกลลิก ยังมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน ช่วยป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียดเมื่ออายุมากขึ้น ซึ่งช่วยลดโรคหัวใจและโรคมะเร็งในผู้สูงอายุ กรดแกลลิกเป็นกรดอินทรีย์ ในกลุ่มของ polyphenol มีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.2 อนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดแกลลิก คือ โพรพิลแกลเลต ใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันในอาหาร กรดแกลลิกพบในธรรมชาติ เช่น บลูเบอร์รี่ แอปเปิ้ล ใบบัว โดยผลไม้ตระกูลเบอร์รี่นั้นจะมีปริมาณกรดแกลลิกมาก (Yoshihara et al., 2010)



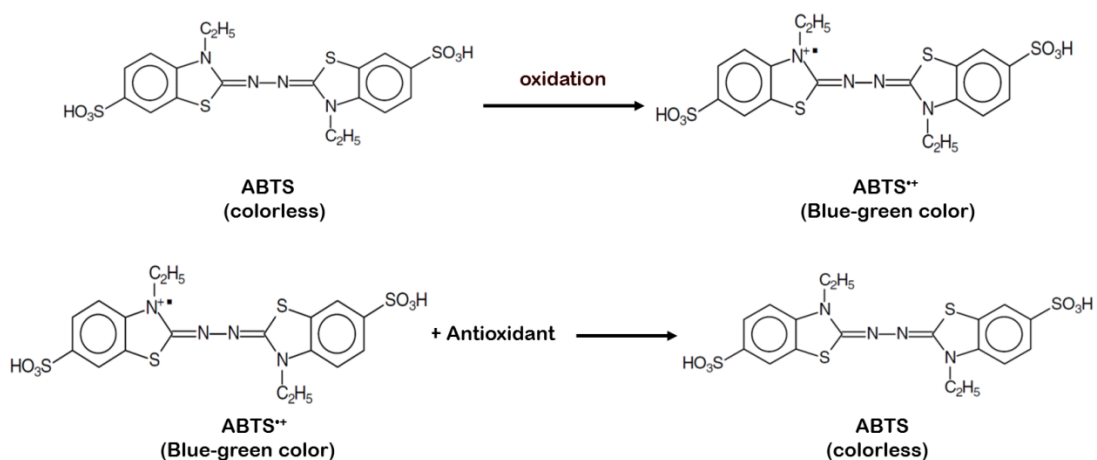
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรดแกลลิก

จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคหลายชนิดโดยเฉพาะโรคมะเร็ง อนุมูลอิสระถูกทำลายด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ปกติในร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระแต่ถ้าอนุมูลอิสระมีมากเกินไปร่างกายจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากปัจจัยภายนอกในร่างกาย ปัจจุบันการบริโภคน้ำผลไม้เพื่อสุขภาพ เป็นที่ทราบกันดีถึงประโยชน์อันมากมาย เนื่องจากมีวิตามินซีในปริมาณมาก โดยมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ดังนั้นการบริโภคน้ำผลไม้เป็นประจำจะมีคุณประโยชน์ต่อร่างกาย สามารถต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดโรคร้ายต่างๆ ได้ (Sen & Chakraborty, 2011) หรือผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมดื่มก็มีผลดีวางจำหน่ายมากมาย เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค และเชื่อว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ไม่มากนักน้อย แต่อย่างไรก็ตามจากการสำรวจพบว่าผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ไม่มีข้อมูลสารต้านออกซิเดชันปรากฏบนฉลาก ดังนั้นหากผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่มากและสามารถระบุปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระบนฉลากได้ก็จะยิ่งดึงดูดความสนใจของผู้บริโภคได้มากขึ้น ทั้งยังใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้ด้วย (Chan-Eam, Teerasong, Damwan, Nacapricha, & Chaisuksant, 2011)

2.3 วิธีประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

2.3.1 วิธี ABTS assay

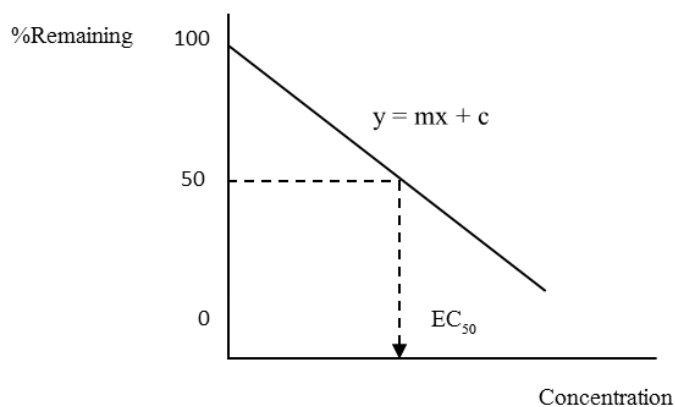
วิธี ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging) ของตัวอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิเดนต์ (Antioxidant capacity) ซึ่ง reagent ที่ใช้คือ ABTS โดยต้องมีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อเปลี่ยน ABTS ให้เป็นอนุมูลอิสระ $ABTS^{•+}$ เสียก่อน แล้วใช้ $ABTS^{•+}$ เป็นตัวแทนอนุมูลอิสระในร่างกาย ปฏิกิริยาการเกิด $ABTS^{•+}$ แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.3 $ABTS^{•+}$ ที่ได้มีความเสถียรใน aqueous solution สารละลาย $ABTS^{•+}$ มีสีเขียวน้ำเงินเข้ม และดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 nm ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระได้ดีก็ทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระ $ABTS^{•+}$ ลดลง มีผลทำให้ความเข้มของสารละลายสีเขียวน้ำเงินลดลงด้วย



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน ABTS ไปเป็น ABTS^{•+} และปฏิกิริยาของ ABTS^{•+} reagent กับ Antioxidant

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจะรายงานค่าเป็น EC₅₀ (50% effective concentration) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS^{•+} เหลืออยู่ 50% ทำได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Remaining ของ ABTS^{•+} ดังสมการ 2.1 ในแกน y กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างในแกน x เพื่อหาค่า EC₅₀ ลักษณะกราฟที่ได้แสดงดังรูปที่ 2.4 เมื่อสร้างกราฟจะได้สมการเส้นตรง แทนค่า y = 50 จากนั้นแก้สมการ คำนวณค่า x จะทำให้ทราบค่าความเข้มข้น หรือก็คือปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS^{•+} เหลืออยู่ 50% (EC₅₀)

$$\% \text{Remaining radical} = \left(\frac{Abs_{\text{sample}}}{Abs_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (\text{สมการ 2.1})$$



รูปที่ 2.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับ %Remaining

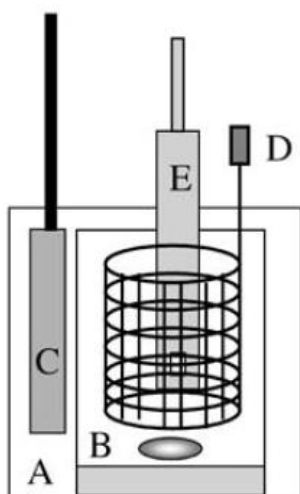
นอกจากนี้ยังพบว่ามีการหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระผ่านวิธี external calibration curve ของสารมาตรฐานแอนติออกซิแดนซ์ และรายงานผลเป็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) แสดงค่าในรูปปริมาณสมมูลของสารมาตรฐานนั้นๆ เช่น Ascorbic acid equivalent (AAE) เมื่อใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน (Kongkedsuk, Hongwitayakorn, Bootnapang, Boonto, & Chaisuksant, 2013) เป็นต้น

จากปฏิกิริยาในรูปที่ 2.3 จะเห็นว่าต้องเปลี่ยนสารละลาย ABTS ให้เป็น $ABTS^{•+}$ ก่อนจึงจะนำสารละลาย $ABTS^{•+}$ มาใช้เป็นรีเอเจนต์เพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ ซึ่งการเปลี่ยน ABTS ไปเป็น $ABTS^{•+}$ มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น

(1) ใช้ enzyme reaction คือ ใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด $ABTS^{•+}$ เช่น horseradish peroxidase เป็นต้น การใช้เอนไซม์มีข้อจำกัด คือ ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆ ที่ใช้อย่างเคร่งครัด เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีราคาแพงอีกด้วย (Cano, Hernández-Ruiz, García-Cánovas, Acosta, & Arnao, 1998)

(2) ใช้ chemical reaction โดยใช้สารเคมี เช่น manganese dioxide, potassium peroxodisulfate, 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) เป็นต้น วิธีนี้สามารถทำได้ง่าย แต่มีข้อเสีย คือ ต้องใช้เวลานานในการเปลี่ยน ABTS ไปเป็น $ABTS^{•+}$ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าต้องเก็บไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง (van den Berg, Haenen, van den Berg, & Bast, 1999) ซึ่งอาจจะไม่สะดวกในกรณีที่ต้องการวิเคราะห์สารตัวอย่างและต้องทราบผลในพื้นที่

(3) ใช้ electrochemical generation ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อผลิต $ABTS^{•+}$ เป็นวิธีที่รวดเร็ว ลดการใช้สารเคมีอื่นๆ และสะดวกต่อการควบคุมการเกิดปฏิกิริยา โดยเมื่อมีการให้กระแสไฟฟ้าในระบบวงจรบวกรวมส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีขึ้น โดยที่ขั้วแคโทดจะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ส่วนขั้วแอโนดจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น $ABTS^{•+}$ ออกมา (Alonso, Domínguez, Guillén, & Barroso, 2002) (Alonso, Guillén, & Barroso, 2003)

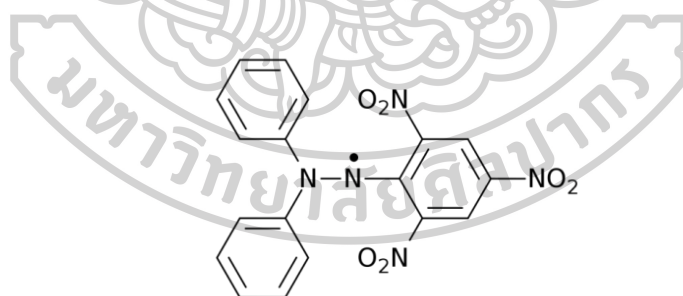


- A คือ ปีกเกอร์ขนาด 80 mL ใช้บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ด้านที่เป็นแคโทด
- B คือ ถ้วย Crucible filter ใช้บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ด้านที่เป็นแอโนด
- C คือ flat platinum electrode เป็นขั้วแคโทด
- D คือ cylindrical platinum mesh เป็นขั้วแอโนด
- E คือ UV-visible transmission Probe สำหรับวัดค่าดูดกลืนแสง

รูปที่ 2.5 การจัดวางอุปกรณ์ในการผลิต ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า (Alonso et al., 2003)

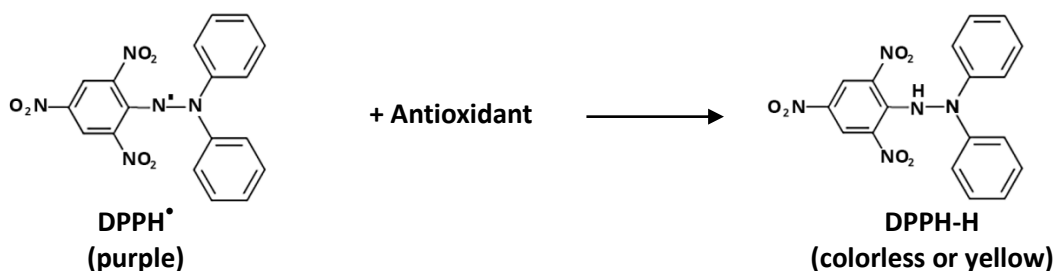
2.3.2 วิธี DPPH assay

วิธี DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging) ของตัวอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ ซึ่ง reagent ที่ใช้คือ DPPH เมื่อละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ethanol จะได้ DPPH[•] ที่มีความเสถียรตั้งแสดงในรูปที่ 2.6 สารละลายนี้มีสีม่วงและดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 nm



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

ปฏิกิริยาระหว่าง DPPH[•] และ Antioxidant แสดงดังรูปที่ 2.7

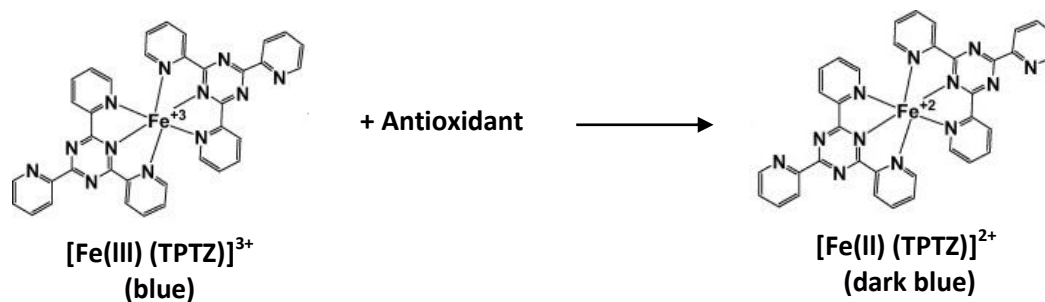


รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาของ DPPH[•] reagent กับ Antioxidant

ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระได้ดี ก็ทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระลดลง มีผลทำให้สีของสารละลายนั้นเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นไม่มีสีหรือเป็นสีเหลืองอ่อนในที่สุด โดยสามารถรายงานผลการทดลองเป็นค่า EC₅₀ ได้เช่นเดียวกับวิธี ABTS และมีงานวิจัยที่ใช้ External calibration curve ในการบอกความสามารถของอนุมูลอิสระเช่นกัน ข้อดีของวิธี DPPH คือ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ข้อเสียของวิธีนี้คือ ตัวอย่างต้องละลายในตัวทำละลายอินทรีย์หรือไม่ตกตะกอนเมื่อทำปฏิกิริยากับตัวทำละลายอินทรีย์ จึงจะสามารถวิเคราะห์ antioxidant capacity ได้

2.3.3 วิธี FRAP assay

วิธี FRAP assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method โดยที่สารประกอบเชิงซ้อน Fe³⁺-TPTZ complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน Fe²⁺-TPTZ complex ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้ม สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 595 nm ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันหรือเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ได้ดี จะมีผลทำให้ความเข้มของสารละลายสีน้ำเงินเข้มขึ้นด้วย ซึ่งปริมาณของ Fe²⁺-TPTZ complex ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถประเมินค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และรายงานเป็นค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP value)



รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาของ FRAP reagent กับ Antioxidant (Gülçin, 2012)

ข้อดีของวิธีนี้คือ ค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยากซับซ้อน และมีความเที่ยงดี แต่ข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water) (บุหรัน พันธุ์สุวรรณ, 2556)

2.3.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

สำหรับวิธี ABTS assay จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรายงานค่าเป็น EC₅₀ หรือใช้วิธี external calibration curve ของสารมาตรฐาน แอนติออกซิแดนท์ และรายงานผลเป็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) แสดงค่าในรูปปริมาณสมมูลของสารมาตรฐานนั้นๆ เช่น Ascorbic acid equivalent (AAE) เมื่อใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน

Arts *et al.* ได้ใช้วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay โดยใช้ Trolox เป็นสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐานเพื่อจับกับอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} มีการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย ABTS และสารต้านอนุมูลอิสระที่จะนำมาทดสอบ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย ABTS ที่เหมาะสมคือ 45 μ M ซึ่งต้องมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 และความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 2.5-25 μ M (Arts, Dallinga, Voss, Haenen, & Bast, 2004)

Villaño *et al.* ได้ทำการผลิต ABTS^{•+} ด้วยวิธีใช้ enzyme reaction โดยใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase enzyme ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมี hydrogen peroxide เป็น oxidant substrate จากนั้นได้ประเมินหาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในไวน์ โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐาน (Villaño, Fernández-Pachón, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2004)

สำหรับวิธี DPPH assay Brand-Williams *et al.* ได้ศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ โดยใช้ออนุมูลอิสระเป็น DPPH[•] ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 515 nm โดยได้ทดสอบกับสารต้าน

อนุมูลอิสระทั้ง 20 ชนิดเมื่อทำปฏิกิริยากับ DPPH พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อปฏิกิริยาได้ในเวลาที่ต่างกัน โดยกรดวิตามินซี isoascorbic และ isoeugenol มีปฏิกิริยาตอบสนองได้อย่างรวดเร็วด้วย DPPH ส่วนสารประกอบที่เหลือต้องรอเวลาให้สารทำปฏิกิริยากันแล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต้องใช้เวลาจนถึง 1-6 ชั่วโมง (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995)

สำหรับวิธี FRAP assay Benzie *et al.* ได้ทดสอบหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดโดยอาศัยวิธี FRAP assay ในสารชีวภาพของเหลว เช่น พลาสมาในเลือดสามารถวัดได้โดยตรงซึ่งวิธี FRAP ยังเป็นวิธีที่สำคัญและให้ผลวิเคราะห์ที่แม่นยำมากพอที่จะนำมาใช้ในการประเมินการดูดซึมของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย (Benzie & Strain, 1996)

Benzie *et al.* ได้ทดสอบหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของชาชนิดต่างๆ เช่น ชาดำ ชาเขียว ชาอู่หลง โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน (Benzie & Szeto, 1999) นอกจากนี้ Rabeta *et al.* ยังได้ทดสอบหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในใบและผลของ *Garcinia atrovirdis* และ *Cynometra cauliflora* เป็นต้น (Rabeta & Faraniza, 2013)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่า การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS วิธี DPPH และวิธี FRAP ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี และถูกนำมาใช้กับตัวอย่างหลากหลาย อย่างไรก็ตามการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากหลายๆ วิธี ยกตัวอย่างงานวิจัยของ Floegel *et al.* ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มเป็นจำนวนมาก โดยใช้วิธี ABTS และ DPPH ในการทดสอบ (Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun, 2011) Müller *et al.* ได้เปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแคโรทีนอยด์ในน้ำผลไม้และน้ำมัน โดยทดสอบด้วยวิธี FRAP, ABTS, TEAC, DPPH และ peroxy radical scavenging assay (Müller, Fröhlich, & Böhm, 2011) และ Wootton-Beard *et al.* ทำการศึกษาศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟีนอลิกโดยรวมในตัวอย่างน้ำผลไม้ 23 ชนิด โดยทดสอบด้วยวิธี FRAP, DPPH, ABTS และ Folin-Ciocalteu (Wootton-Beard, Moran, & Ryan, 2011) เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันผลที่วิเคราะห์ได้ หรือดูแนวโน้มของความสามารถในการต้านออกซิเดชันของแต่ละตัวอย่าง หากมีตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนมาก ก็จะต้องใช้รีเอเจนต์ปริมาณมาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์นานอีกด้วย และวิธีแบบ batch นี้จำเป็นต้องควบคุมเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้น มีผู้วิจัยได้พัฒนาระบบการไหลแบบอัตโนมัติ เพื่อลดระยะเวลา ลดการใช้สารเคมี และลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ได้

2.4 การนำระบบการไหลอัตโนมัติแบบโพลินเจกชันอะนาลิซิสมาใช้ประเมินความสามารถของสารต้านออกซิเดชัน

เทคนิคโพลินเจกชันอะนาลิซิส (Flow injection analysis) หรือ FIA มีหลักการพื้นฐานคือ การฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่กระแสตัวพา (carrier stream) ซึ่งมีการไหลตลอดเวลา เกิดเป็นท่อนโซนขึ้นภายในท่อลำเลียง อาจมีกระบวนการต่างๆ ทางเคมีและทางกายภาพทำให้สารเกิดการเปลี่ยนแปลงก่อนถูกพาไปในระบบตรวจวัดสัญญาณ (detection system) เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณได้อย่างต่อเนื่อง ลักษณะที่สำคัญของ FIA มีดังนี้

- (1.) เป็นระบบการไหลแบบต่อเนื่อง
- (2.) สารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าสู่กระแสของตัวพาโดยตรง
- (3.) การกระจาย (dispersion) ของสารละลายตัวอย่างจะถูกควบคุมโดยระบบทั้งหมด โดยที่ระบบไม่จำเป็นต้องเข้าสู่สมดุลใดๆ ทั้งสิ้น
- (4.) การทำงานของระบบจะถูกควบคุมให้ใช้ช่วงเวลาที่เท่ากันตลอด ซึ่งหมายความว่าตั้งแต่ฉีดสารละลายตัวอย่างจนถึงการบันทึกสัญญาณจะใช้เวลาเท่ากันทุกครั้งทำให้ผลที่ได้มีความแม่นยำสูง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำระบบการไหลอัตโนมัติแบบโพลินเจกชันอะนาลิซิสมาใช้ประเมินความสามารถของสารต้านออกซิเดชัน เช่น Magalhães *et al.* ได้ศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay และ DPPH assay โดยได้ประยุกต์ร่วมกับเทคนิค FIA โดยมีการรายงานว่าการไหลอัตโนมัติมีข้อดีคือ ใช้ง่าย ต้นทุนต่ำ และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับวิธี batch แบบดั้งเดิม (Magalhães, Santos, Segundo, Reis, & Lima, 2009)

Magalhães *et al.* ใช้ระบบการไหลอัตโนมัติสำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay และวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้ gallic acid และ trolox เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบกับตัวอย่างไวน์ เบียร์ เครื่องดื่มสมุนไพร ชา และน้ำผลไม้ ในงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 24 ตัวอย่างต่อชั่วโมง (Magalhães *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่นำระบบการไหลมาใช้ในวิธีการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างที่หลากหลาย เช่น ชา กาแฟ น้ำมัน สมุนไพรสกัด ขมิ้นสกัด เป็นต้น

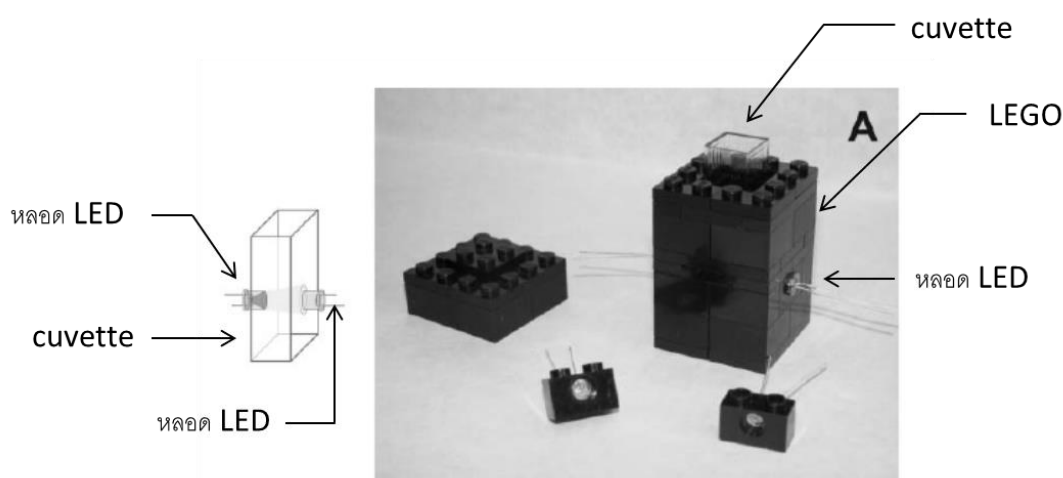
เนื่องจากวิธีการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่กล่าวมาข้างต้นนั้น สามารถทำได้โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เปลี่ยนไปนี้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ซึ่งเป็นอุปกรณ์การตรวจวัดทางแสงชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ที่ทันสมัยในหลายๆ ด้าน หากต้องประเมินความสามารถ

ของสารต้านออกซิเดชันที่มากกว่า 1 วิธีพร้อมๆ กัน เพื่อยืนยันผลที่วิเคราะห์ได้ จึงต้องใช้เครื่องมือที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตามเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ส่วนมากที่ใช้ในปัจจุบันยังคงมีราคาสูงและมีขนาดใหญ่ ไม่สะดวกต่อการพกพาหรือเคลื่อนย้าย ดังนั้นการพัฒนาอุปกรณ์การตรวจวัดทางแสงที่มีราคาถูก และสะดวกต่อการพกพาจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยอุปกรณ์การตรวจวัดทางแสงอย่างง่ายที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ทดแทนเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในงานวิจัยนี้มีชื่อว่า “ส่วนตรวจวัดฟิอิตีดี” โดยอาศัยหลักการ Paired Emitter-Detector Diodes (PEDD) หรือฟิอิตีดี

2.5 ส่วนตรวจวัดฟิอิตีดี (Paired Emitter-Detector Diodes, PEDD)

2.5.1 ส่วนประกอบและหลักการทำงานของฟิอิตีดี

Paired Emitter-Detector Diodes (PEDD) หรือ ฟิอิตีดี เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดแสงชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยหลอด light emitting diode (LED) จำนวน 2 หลอด โดยแต่ละหลอดจะทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงและเป็นตัวตรวจวัดแสง (Tymecki, Pokrzywnicka, & Koncki, 2008) (Tymecki & Koncki, 2009) โดยหลอด LED ทั้งสองจะถูกนำไปใส่ในช่องตัวต่อ LEGO ซึ่งอยู่ในระดับที่เหมาะสมของการตรวจวัด (รูปที่ 2.9) ตัวต่อ LEGO นี้จะทำหน้าที่ยึด cuvette ด้วย หลอด LED ที่ใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสง (LED-emitter) ถูกต่อเข้ากับ power supply ให้หลอด LED เปล่งแสง และผ่านตัวต้านทานค่าหนึ่ง เพื่อลดกระแสไฟฟ้าที่จะผ่านหลอด LED ส่วนหลอด LED ที่ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจวัดแสง (LED-detector) ถูกต่อเข้ากับ multimeter เพื่อวัดสัญญาณที่ได้ออกมาเป็นค่าความต่างศักย์ (voltage) โดยสัญญาณนี้จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแสงที่ส่องมาตกที่ LED-detector และจะแปรตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์



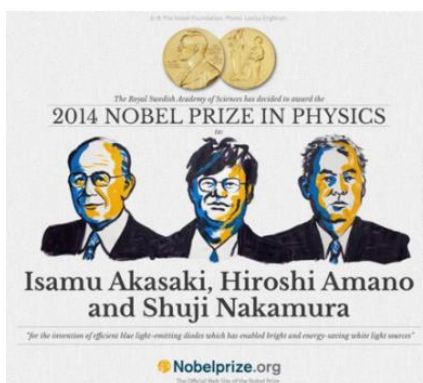
รูปที่ 2.9 อุปกรณ์ฟิอิตีดี (ประยุกต์จาก (Tymecki & Koncki, 2009))

หลักการการทำงานของฟลูออโรเมตริค คือ เมื่อ power supply ให้กำลังไฟฟ้าคงที่ไปที่หลอด LED-emitter จากนั้น หลอด LED-emitter เปล่งแสง ส่องผ่าน reagent ที่ไหลอย่างต่อเนื่องผ่าน flow-through cell และมาตกกระทบบน LED-detector วัดสัญญาณด้วย Digital multimeter ได้เป็นสัญญาณ base line และเมื่อฉีดสารมาตรฐาน antioxidant หรือตัวอย่างเข้าไปในระบบ จะเกิดปฏิกิริยาการจับอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} หรือ DPPH[•] หรือรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ complex ทำให้สีของสารละลายมีการเปลี่ยนแปลงไป แสงจาก LED-emitter ที่มาตกกระทบบน LED-detector ก็เปลี่ยนแปลงไปด้วย เกิดเป็นสัญญาณที่ตรวจวัดได้ด้วย Digital multimeter

2.5.2 หลอดไดโอดเปล่งแสง

LED ย่อมาจากคำว่า Light Emitting Diode เป็นอุปกรณ์สารกึ่งตัวนำอย่างหนึ่งจัดอยู่ในจำพวกไดโอด เมื่อถูกไบอัสทางไฟฟ้าในทิศทางไปข้างหน้า สามารถเปล่งแสงได้ใกล้ช่วงอัลตราไวโอเล็ต ช่วงแสงที่มองเห็น และช่วงอินฟราเรด ในช่วงสเปกตรัมแคบ ปรากฏการณ์นี้อยู่ในรูปของ electroluminescence และสีของแสงที่เปล่งออกมานั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุกึ่งตัวนำที่ใช้ ผู้พัฒนาไดโอดเปล่งแสงขึ้นเป็นคนแรก คือ Nick Holonyak Jr. ซึ่งได้พัฒนาไดโอดเปล่งแสงในช่วงแสงที่มองเห็น และสามารถใช้งานได้เชิงปฏิบัติเป็นครั้งแรก เมื่อ ค.ศ. 1962 โดยบริษัทเจเนอรัลอิเล็กทริก (General Electric)

เมื่อวันที่ 6 ต.ค. พ.ศ. 2557 ศาสตราจารย์ อิชามุ อากาซากิ, อิโรชิ อามาโนะ และชูจินากามูระ นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นได้คว่ำรางวัลโนเบลสาขาฟิสิกส์ประจำปีนี้ไปครอง ด้วยการคิดค้นไดโอดเปล่งแสง สีน้ำเงินขึ้นมา คณะกรรมการตัดสินรางวัลโนเบลกล่าวว่า LED สีน้ำเงิน เป็นผลงานการประดิษฐ์ที่มีประโยชน์มาก และรางวัลโนเบลนี้ก่อตั้งขึ้นมาเพื่อแสดงให้เห็นถึงการยอมรับการพัฒนาที่เป็นประโยชน์อย่างที่สุดต่อมนุษยชาติ ทั้งนี้ ศาสตราจารย์ทั้งสามคนประดิษฐ์คิดค้น LED สีน้ำเงิน ขึ้นมาในช่วงต้นทศวรรษที่ 1990 ซึ่งเมื่อนำมันมารวมกับ LED สีแดงและเขียวที่มีอยู่แล้ว ทำให้เกิดนวัตกรรมแสงรุ่นใหม่ นำไปสู่การประดิษฐ์หลอดประหยัดไฟสีขาว รวมถึงจอภาพ LED สำหรับ LED สีแดงและเขียวถูกประดิษฐ์ขึ้นมาก่อนหลายปีแล้ว แต่ LED สีน้ำเงินนั้นถือเป็นอุปสรรคที่ทำนายเหล่านักวิทยาศาสตร์ทั้งในโลกการศึกษาและอุตสาหกรรม ซึ่งหากไม่มี LED สีน้ำเงินก็จะไม่สามารถผสมสีให้เกิดหลอดไฟสีขาวขึ้นมาได้ รวมทั้งจอคอมพิวเตอร์และโทรทัศน์ด้วย ทุกวันนี้ LED สีน้ำเงินพบได้ทั่วไปในหน้าจอสมาทโฟนที่อยู่ในกระเป๋าของคนทั่วโลก หลอดไฟสีขาวให้แสงสว่างในที่ทำงานและบ้านทั่วโลก (หทัยชนก หมั่นกล้า, 2013)

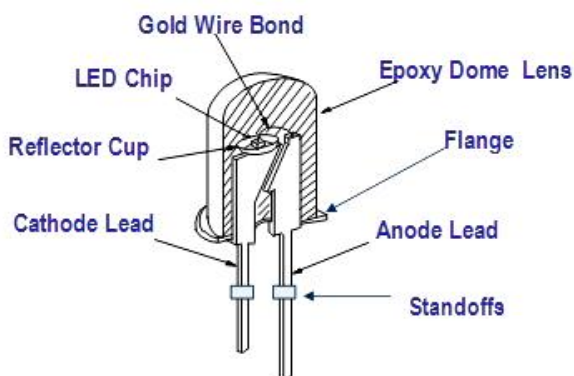


รูปที่ 2.10 รางวัลโนเบลสาขาฟิสิกส์ในปี 2014

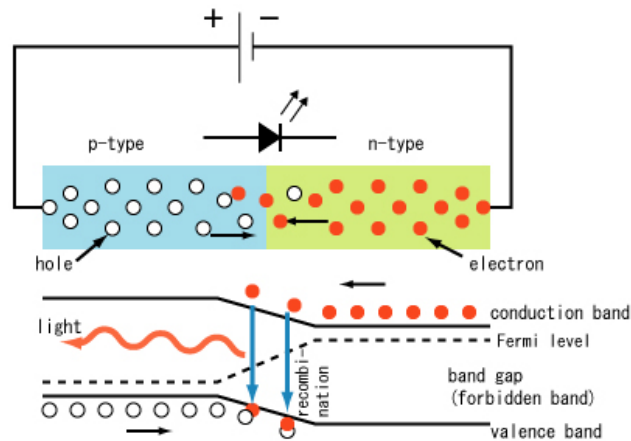
ที่มา <https://www.pinterest.com/pin/127648970668238570/>

หลอดไฟ LED ประหยัดพลังงานมากกว่า หลอดไส้ร้อนแบบธรรมดา (incandescent) และหลอดฟลูออเรสเซนต์ เพราะ LED เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็นโฟตอน (photon) แสงโดยตรง ต่างจากหลอดไส้ร้อนที่ต้องสูญเสียพลังงานส่วนหนึ่งไปโดยเปล่าประโยชน์จากการให้ความร้อนแก่ไส้หลอดที่เป็นลวดโลหะ กระทั่งมีอุณหภูมิสูงจนเปล่งแสง

หลักการทำงานของ LED ภายในหลอด LED จะประกอบไปด้วยสารกึ่งตัวนำชนิด N และสารกึ่งตัวนำชนิด P ประกบเข้าด้วยกัน มีผิวข้างหนึ่งเรียบคล้ายกระจกเมื่อจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงผ่านตัว LED โดยจ่ายไฟบวกให้ขาแอโนด (A) จ่ายไฟลบให้ขาแคโทด (C) ดังรูปที่ 2.11 จะทำให้อิเล็กตรอนที่สารกึ่งตัวนำชนิด N-type มีพลังงานสูงกว่าช่องว่างระหว่างแถบพลังงาน (band gap energy) มีพลังงานสูงมากพอที่จะทำให้อิเล็กตรอนหลุดข้ามรอยต่อจากสารชนิด N-type ไปรวมกับโฮล (hole) ในสารชนิด P-type เป็นผลให้ระดับพลังงานของอิเล็กตรอนเปลี่ยนไปและคายพลังงานออกมาในรูปคลื่นแสง (Tymecki & Koncki, 2009) แสดงดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.11 ส่วนประกอบของหลอด LED



รูปที่ 2.12 ลักษณะการทำงานของ LED เมื่อถูกไบอัสในทิศทางไปข้างหน้า

จากหลักการทำงานของหลอดไดโอดเปล่งแสง และอุปกรณ์พีอีดีดี สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายและสัญญาณที่วัดได้ด้วย Shockley ideal diode equation ซึ่งเป็นสมการของไดโอดชอคเลย์ในอุดมคติหรือกฎของไดโอด ได้ให้สมการที่แสดงถึงกราฟคุณลักษณะเฉพาะของกระแส และแรงดันเอาไว้ว่า

$$I = I_s \left[\exp\left(-\frac{E}{E_T}\right) - 1 \right] \quad (\text{สมการ 2.2})$$

เมื่อ	I	คือ	กระแสที่ไหลผ่านไดโอด
	I_s	คือ	กระแสอิ่มตัวเมื่อทำการไบอัสกลับ
	E	คือ	แรงดันที่ตกคร่อมไดโอด
	E_T	คือ	ค่าความต่างศักย์อันเนื่องมาจากความร้อน ($E_T = kT/q$)
โดยที่	k	คือ	Boltzmann's constant มีค่าเท่ากับ $1.3806503 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
	T	คือ	อุณหภูมิที่บริเวณรอยต่อ p-n
	q	คือ	ประจุของอิเล็กตรอน มีค่าเท่ากับ $1.602176487 \times 10^{-19} \text{ C}$

สำหรับกระแสไบอัสขนาดเล็ก exponential ขนาดใหญ่ (เพราะความต่างศักย์มีความร้อนน้อยมาก) ดังนั้นสมการที่ (2.2) จึงเขียนใหม่ได้เป็นสมการที่ (2.3)

$$I = I_s \left[\exp\left(-\frac{E}{E_T}\right) \right] \quad (\text{สมการ 2.3})$$

ในทางกลับกัน พลังงานที่ถูกปล่อยออกมาจากหลอด LED เป็นสัดส่วนโดยตรงกับพลังงานไฟฟ้าที่ไหลผ่านรอยต่อ p-n ดังนั้นในพีอีดีดี I_L คือ ความเข้มของแสงจาก LED-detector เป็นสัดส่วน

โดยตรงกับ I_C คือ กระแสจาก LED-emitter ดังนั้นเพื่อให้อธิบายสมการ Shcockley equation ได้ง่าย จึงเขียนในรูปแบบลอการิทึม

$$E = a + \log(I_C) = a + \log(I_L) \quad (\text{สมการ 2.4})$$

โดยที่ a และ b เป็นค่าคงที่ การวัดแรงดันไฟฟ้า โดย LED-detector สำหรับ cuvette โดยปราศจากตัวดูดกลืนแสง (E_{max}) สำหรับ 'blank' สามารถเป็นสัญญาณความเข้มของแสงของ LED-emitter ($I_L = I_{max}$) ดูดกลืนเท่ากับศูนย์

$$E_{max} = a + \log(I_{max}) \quad (\text{สมการ 2.5})$$

ในลักษณะเดียวกันแรงดันไฟฟ้าสำหรับตัวอย่างที่ดูดกลืนแสง (E_{sample}) คือ

$$E_{sample} = a + \log(I_{sample}) \quad (\text{สมการ 2.6})$$

ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงแรงดันไฟฟ้าสำหรับตัวอย่าง (E_{sample}) วัดโดย LED detector คือ

$$\Delta E_{sample} = E_{max} - E_{sample} \quad (\text{สมการ 2.7})$$

ดังนั้น

$$\Delta E_{sample} = \log(I_{max} - I_{sample}) \quad (\text{สมการ 2.8})$$

จากความสัมพันธ์ของ Lambert-Beer's Law

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (\text{สมการ 2.9})$$

ดังนั้น จากสมการที่ (2.8) และ (2.9) จะได้

$$\Delta E_{sample} = bA_{sample} = b\epsilon l C \quad (\text{สมการ 2.10})$$

เมื่อ

l คือ path length

C คือ ความเข้มข้นของ analyte ในตัวอย่าง

ϵ คือ ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงของสารละลาย (Molar absorptivity)

จึงสรุปได้ว่า สัญญาณที่ได้จาก PEDD detector เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ analyte ในตัวอย่าง (Tymecki et al., 2008)

2.5.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฟิโอดีตี

งานวิจัยก่อนหน้านี้ Diamond *et al.* นำฟิโอดีตีมาใช้เป็นเซนเซอร์ในทางเคมีวิเคราะห์ (O'Toole, Lau, & Diamond, 2005) (Lau, McHugh, Baldwin, & Diamond, 2006) (O'Toole, Lau, Shepherd, Slater, & Diamond, 2007) (de Vargas-Sansalvador *et al.*, 2011) (Orpen *et al.*, 2011) และ Koncki *et al.* ได้ใช้หลอดแอลอีดีมาเป็นตัวตรวจวัดแสงแบบดูดกลืนแสง และ ฟลูออเรสเซนซ์ (Tymecki & Koncki, 2009) (Pokrzywnicka, Koncki, & Tymecki, 2010) อีกทั้งยังใช้วิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่มต่างๆ เช่น สารชีวโมเลกุล (Rozum & Koncki, 2011) (Tymecki, Brodacka, Rozum, & Koncki, 2009) (Mieczkowska, Koncki, & Tymecki, 2011) (Pokrzywnicka, Tymecki, & Koncki, 2012) (Strzelak, Koncki, & Tymecki, 2012) (Tymecki, Korszun, Strzelak, & Koncki, 2013) (Strzelak & Koncki, 2013) (Kolacinska & Koncki, 2014) (Strzelak, Wiśniewska, Bobilewicz, & Koncki, 2014) (Michalec *et al.*, 2016) (Rybkowska, Koncki, & Strzelak, 2017) (Rybkowska, Strzelak, & Koncki, 2018) ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม (Tymecki, Pokrzywnicka, & Koncki, 2011) (Pokrzywnicka, Fiedoruk, & Koncki, 2012) (Tymecki, Rejnis, Pokrzywnicka, Strzelak, & Koncki, 2012) (Fiedoruk, Mieczkowska, Koncki, & Tymecki, 2014) และในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม (Fiedoruk, Cocovi-Solberg, Tymecki, Koncki, & Miró, 2015) เป็นต้น

ฟิโอดีตีถูกประดิษฐ์ขึ้นเพื่อใช้เป็นส่วนตรวจวัดของระบบการไหลทั้งแบบ flow injection analysis แบบ sequential injection analysis (SIA) และแบบ multicommutated flow analysis (MCFA) เช่น Tymecki *et al.* หาปริมาณ creatinine ในตัวอย่างปัสสาวะของมนุษย์ ด้วยวิธีของ Jaffe ทำการตรวจวัดด้วยฟิโอดีตี ร่วมกับระบบ MCFA ในส่วนของฟิโอดีตีนั้น ประกอบด้วย หลอด LED-emitter ที่ 505 nm และ หลอด LED-detector ที่ 525 nm ในงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้ในระดับ ppm และสามารถวิเคราะห์ได้ 15-40 ตัวอย่างต่อชั่วโมง (Tymecki, Korszun, *et al.*, 2013) และนอกจากนี้ยังมีการนำฟิโอดีตีมาใช้วิเคราะห์สารหลากหลายประเภท เช่น Saetear *et al.* นำระบบการไหลแบบ SIA มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต (Saetear, Khamtau, Ratanawimarnwong, Sereenonchai, & Nacapricha, 2013) มีการนำระบบการไหลแบบ MCFA มาใช้ในการวิเคราะห์หา alkaline phosphatase (Tymecki, Strzelak, & Koncki, 2013) ปริมาณฟอสเฟตและแคลเซียม (Fiedoruk-Pogrebniak & Koncki, 2015) ปริมาณโปรตีน และครีอะตินีน (Strzelak, Misztal, Tymecki, & Koncki, 2016) และ

วิเคราะห์ Fe-transferrin ในซีรัมของมนุษย์ (Strzelak, Rybkowska, Wiśniewska, & Koncki, 2017) เป็นต้น Kalinowski and Koronkiewicz ใช้ฟิอิตีมาใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง แบบ double-beam photometric โดยใช้ฟิอิตีตัวหนึ่งเป็นตัวตรวจวัดปฏิกิริยา และฟิอิตีอีกตัวหนึ่งเป็น reference (Kalinowski & Koronkiewicz, 2017) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำฟิอิตีมาใช้เพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน



บทที่ 3

เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการดำเนินงานวิจัย

(Instrument, Glassware, Chemicals and Method)

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่อง DC power supply (BEST รุ่น PS-150200, สาธารณรัฐประชาชนจีน)
- เครื่อง Digital multimeter (FLUKE 45 DUAL DISPLAY MULTIMETER, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่อง Digital multimeter (KYORITSU รุ่น Model 1009, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่อง Peristaltic pumps (ISMATEC, เยอรมัน)
- เครื่องวัด pH (pH meter) (Mettler Toledo รุ่น F20, สวิตเซอร์แลนด์)
- เครื่อง Potentiostat (Autolab PGSTAT 101, เนเธอร์แลนด์)
- เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Perkin Elmer รุ่น Lambda 35, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Agilent รุ่น HP-8453, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่อง Vortex (Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่องกวนแม่เหล็ก พร้อมควบคุมอุณหภูมิ (Hot plate stirrer) (IKA รุ่น C-MAG HS7, สาธารณรัฐประชาชนจีน)
- เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์)

3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- Flow-through cell ยี่ห้อ Hellma, ปริมาตร 80 μL เฮอร์มันนี
- Injection valve ของ Upchurch Scientific[®] (V-540)
- Quartz cell ขนาด 3 mL, optical path length = 1 cm.
- ท่อ PTFE เส้นผ่านศูนย์กลาง 1/16 นิ้ว x 1.0 mm ยี่ห้อ VICI Jour[®]
- ท่อ TYGON R3607 เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.02 mm ความหนาของท่อขนาด 0.86 mm ยี่ห้อ Upchurch Scientific
- Flgs Nut 1/16 PEEK Short/10pk ยี่ห้อ Upchurch Scientific
- Flangeless Ferrule 1/16 in blue ยี่ห้อ Upchurch Scientific
- หลอดฉีดยาพลาสติก (Syringe) ขนาด 1 mL
- หลอด LED สีเหลือง, สีเขียว, สีแดง และสีฟ้า ยี่ห้อ Honglitronic, สาธารณรัฐประชาชนจีน
- ตัวต้านทาน 100 $\Omega \pm 1\%$
- สายไฟพร้อมหัวหนีบปากจระเข้ (Wire with crocodile clip)
- ตัวต่อ LEGO
- ไมโครปิเปตของ RAININ รุ่น Pipet-Lite XLS ขนาด 20-200 μL
- ไมโครปิเปตของ RAININ รุ่น Pipet-Lite XLS ขนาด 100-1000 μL
- ไมโครปิเปตของ RAININ รุ่น Pipet-Lite XLS ขนาด 500-5000 μL
- ปิเปต
- ลูกยางปิเปต
- กระจกบอกดวงขนาด 10 mL
- ขวดฉีดยาน้ำกลั่น
- ขวดปริมาตร
- ข้อนตักสาร
- แท่งแก้วคนสาร
- นาฬิกาจับเวลา
- ปีกเกอร์
- หลอดทดลอง
- หลอดหยด

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	มวล โมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต	เกรด
2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)	548.68	Fluka	HPLC grade
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	394.32	Fluka	HPLC grade
2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ)	312.33	SIGMA-ALDRICH	Reagent grade
Acetic acid	60.05	SIGMA-ALDRICH	99.98%
Disodium hydrogenphosphate			
Ethanol 99%	46.07	EMSURE	Absolute for analysis
Ferric chloride	162.02	SIGMA-ALDRICH	Reagent grade
Gallic acid	188.14	Riedel-de Haën	Reagent grade
Hydrochloric acid	36.46	CARLO ERBA	Reagent grade
L-Ascorbic acid	176.13	UNILAB	Reagent grade
Potassium peroxodisulfate	270.33	Fluka	Reagent grade
Sodium acetate	82.03	Riedel-de Haën	Reagent grade
Sodium dihydrogenphosphate	156.02	UNIVAR	Reagent grade
Zinc acetate	219.51	SIGMA-ALDRICH	Reagent grade
Zinc chloride	136.30	SIGMA-ALDRICH	Reagent grade
Zinc nitrate	189.36	SIGMA-ALDRICH	Reagent grade

3.4 การเตรียมสารละลาย

3.4.1 สารละลาย ABTS เข้มข้น 1 mM

ชั่ง ABTS 0.025x g ละลายด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 6.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 50.00 mL สารละลายนี้ใช้ทดสอบการผลิต ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

3.4.2 สารละลาย ABTS^{•+}

เตรียม ABTS 7 mM โดยชั่ง ABTS 0.038x g และเตรียม Potassium peroxodisulfate 2.45 mM โดยชั่ง Potassium peroxodisulfate 0.006x g ละลายผสมกับ ABTS แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10.00 mL ด้วย DI water จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชม. จะได้ Stock สารละลาย ABTS^{•+} เมื่อนำไปใช้วิเคราะห์ ให้เจือจางสารละลาย ABTS^{•+} โดยปิเปต Stock สารละลาย ABTS^{•+} 2 mL ปรับปริมาตรด้วย DI water 100.00 mL จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ให้มีค่า Absorbance 0.70xx ที่ความยาวคลื่น 734 nm

3.4.3 สารละลาย DPPH[•] เข้มข้น 1.0000 mM

ชั่ง DPPH 0.098x g จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 250.00 mL ด้วย Ethanol ($\geq 99\%$)

3.4.4 สารละลาย FRAP reagent

เตรียม FRAP reagent โดยมีส่วนประกอบของสารละลาย Acetate buffer (pH 3.6) ความเข้มข้น 300 mM สารละลาย 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCL และสารละลาย FeCl₃ ความเข้มข้น 20 mM ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ

3.4.5 สารละลาย Ascorbic acid

ชั่ง ascorbic acid 0.44xx g ละลายด้วย DI water ปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL จะได้สารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 0.1 M แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.01 mM โดยการปิเปตจาก stock 0.1 M มา 250 μ L ละลายด้วย DI water ปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL จะได้ความเข้มข้น 0.01 mM จากนั้นทำการเจือจาง stock 0.01 mM เป็น 10, 20, 30, 40, และ 50 μ M ในขวดปริมาตร 25.00 mL ดังตารางด้านล่างสำหรับเป็น working solution

ปริมาณที่ปิเปิดจาก stock solution (μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (μM)
250	10
500	20
750	30
1000	40
1250	50

3.4.6 สารละลาย Gallic acid

ซึ่ง gallic acid 0.47xx g ละลายด้วย DI water ปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL จะได้สารละลาย gallic acid เข้มข้น 0.1 M แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.01 mM โดยการปิเปิดจาก stock 0.1 M มา 250 μL ละลายด้วย DI water ปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL จะได้ความเข้มข้น 0.01 mM จากนั้นทำการเจือจาง stock 0.01 mM เป็น 2, 4, 6, 8, และ 10 μM ในขวดปริมาตร 25.00 mL ดังตารางด้านล่างสำหรับเป็น working solution

ปริมาณที่ปิเปิดจาก stock solution (μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (μM)
50	2
100	4
150	6
200	8
250	10

3.4.7 สารละลาย Phosphate buffer (pH 6.0) เข้มข้น 0.1 M

ซึ่ง Na_2HPO_4 4.313 g ผสมกับ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.060 g ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 500 mL ปรับ pH เป็น 6.0 จะได้สารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 6.0

3.4.8 สารละลาย Saturated zinc acetate

ซึ่ง Zinc acetate (Solubility in water = 43 g/100 mL) 64.50 g ละลายด้วย DI water 150 mL ในปิกเกอร์ หลังจากนั้นกวนบน stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.5 การเตรียมตัวอย่าง

3.5.1 น้ำผลไม้

น้ำผลไม้เข้มข้น 100% ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด เตรียมโดยนำน้ำผลไม้มากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman[®] No.1) แล้วเจือจางให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

3.5.2 เครื่องดื่มสมุนไพรมะนาว

เครื่องดื่มสมุนไพรมะนาวเตรียมโดยชงในน้ำร้อนด้วยอัตราส่วนที่แนะนำตามฉลาก โดยชั่งตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งละเอียด 2.00–6.00 g เทน้ำร้อนใส่ลงไปจนท่วม คนให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman[®] No.1) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรเป็น 50.00 mL

3.5.3 วิตามินซีแบบเม็ด

วิตามินซีแบบเม็ด เตรียมโดยบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา แล้วชั่งตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งละเอียด 1.00x g ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman[®] No.1) แล้วปรับปริมาตรเป็น 50.00 mL

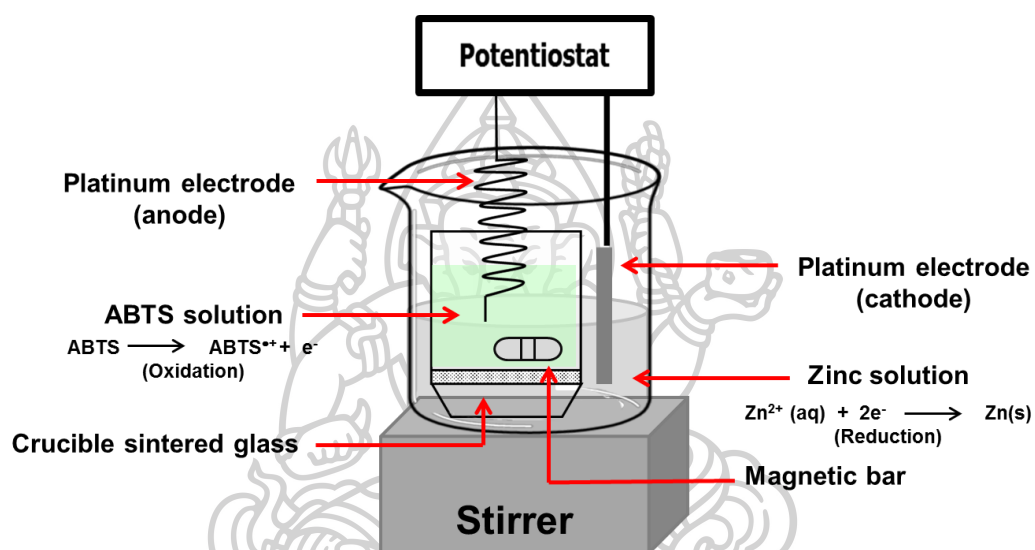
3.6 วิธีการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ ส่วนที่หนึ่งเป็นการผลิตอนุมูล ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าเพื่อลดระยะเวลาและลดการใช้สารเคมี และส่วนที่สองเป็นการพัฒนาส่วนตรวจวัดฟิอิติตีเพื่อใช้ทดแทนสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกลง และเมื่อนำไปใช้ร่วมกับระบบการไหลโพลอินเจกชันอะนาลิซิสจะทำให้การวิเคราะห์เป็นอัตโนมัติมากขึ้น และสามารถทำการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันพร้อมกันได้มากกว่า 1 วิธี นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้สร้างโพลเซลล์ และเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพาโดยอาศัยหลักการของฟิอิติตี โดยมีวิธีการดำเนินงานวิจัยดังนี้

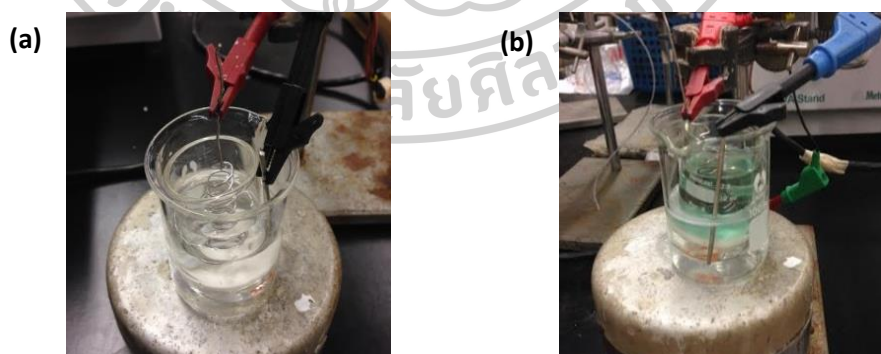
3.6.1 การผลิต ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

สำหรับขั้นตอนการผลิต ABTS^{•+} ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้านั้นจะอาศัยเทคนิค Chronopotentiometry โดยใช้เครื่อง Potentiostat (Autolab PGSTAT 101) โปรแกรมที่ใช้คือ NOVA (1.8) โดยจัดอุปกรณ์ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว คือ ขั้วแพลทินัมมีลักษณะเป็นเกลียวคล้ายสปริงเป็นขั้วแอโนด และขั้วแพลทินัมมีลักษณะเป็นทรงกระบอกตรงเป็นขั้วแคโทด ซึ่งขั้วแคโทดจะจุ่มอยู่ในสารละลาย zinc acetate ($Zn(CH_3COO)_2$) ปริมาตร 30.0 mL บรรจุอยู่ในบีกเกอร์ใหญ่ ส่วนขั้วแอโนดจุ่มอยู่ในสารละลาย ABTS ปริมาตร 25.00 mL ที่บรรจุอยู่ใน

ภาชนะที่เรียกว่า Crucible sintered glass ที่บริเวณก้นภาชนะจะมีรูพรุน เพื่อให้สารละลายสามารถแพร่ผ่านถึงกันได้ จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าคร่อมระหว่างขั้วไฟฟ้าทั้ง 2 ขั้ว โดยที่ขั้วแคโทดจะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ส่วนขั้วแอโนดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ ABTS เปลี่ยนเป็น $ABTS^{•+}$ ซึ่งสารละลายจะมีสีเขียวน้ำเงิน จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่จะผลิตให้ได้สารละลาย $ABTS^{•+}$ ที่มีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ 0.7 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เพื่อนำไปใช้เป็นสารละลาย reagent สำหรับวิธี ABTS assay



รูปที่ 3.1 การจัดวางอุปกรณ์ในการผลิต $ABTS^{•+}$ ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า



รูปที่ 3.2 สารละลาย ABTS ก่อน (a) และสารละลาย $ABTS^{•+}$ หลัง (b) การผลิตด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

3.6.1.1 เวลาที่จ่ายกระแสไฟฟ้า

การศึกษาเวลาที่จ่ายกระแสไฟฟ้าให้สารละลาย ABTS เพื่อใช้ในการผลิต $ABTS^{•+}$ เนื่องจากเมื่อมีการให้กระแสไฟฟ้าในเวลาที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะทำให้ ABTS สูญเสียอิเล็กตรอน มากขึ้น และกลายเป็น $ABTS^{•+}$ มากยิ่งขึ้น ซึ่งจะติดตามได้จากการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการศึกษาเวลาที่ให้กระแสไฟฟ้าที่ 5, 10 และ 20 นาที ซึ่งมีการกำหนดสภาวะการทดลองต่างๆ ในโปรแกรม NOVA 1.8 ดังต่อไปนี้

เลือก procedure Chronopotentiometry ($\Delta t > 1$ ms)

Autolab control

WE(1)Mode	:	Galvanostatic
WE(1)Bandwidth	:	High stability
WE(1)Current range	:	10 mA
Set current		
Current(A)	:	6.000E-03
Set cell		
WE(1)	:	On
Wait time		
Wait time(s)	:	5
Record signal (>1ms) galvanostat		
Duration(s)	:	300
Interval time(s)	:	1
Estimated number of point	:	300

หลังจากการผลิตเสร็จสิ้นจะได้สารละลาย $ABTS^{•+}$ สีเขียวน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ application : scan ที่ความยาวคลื่น 400-900 nm ทำการทดลองซ้ำโดยการเปลี่ยนค่า Duration (s) เป็น 600 และ 1200 s ตามลำดับ

3.6.1.2 ความเข้มข้นของกระแสไฟฟ้า

การศึกษาความเข้มข้นของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ในการผลิต ABTS^{•+} เนื่องจากกระแสไฟฟ้าที่ให้ไปในระบบมีความเข้มข้นมากขึ้น จะทำให้ ABTS สูญเสียอิเล็กตรอนมากขึ้น และกลายเป็น ABTS⁺⁺ มากยิ่งขึ้น และจะติดตามได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการศึกษาโดยให้กระแสไฟฟ้าไปในระบบที่ความเข้มข้นของกระแสไฟฟ้าที่ 2, 4, 6 และ 8 mA ซึ่งมีการกำหนดสภาวะการทดลองต่างๆ ในโปรแกรม NOVA 1.8 ดังต่อไปนี้

เลือก procedure Chronopotentiometry ($\Delta t > 1$ ms)

Autolab control

WE(1)Mode	:	Galvanostatic
WE(1)Bandwidth	:	High stability
WE(1)Current range	:	10 mA
Set current		
Current(A)	:	2.000E-03
Set cell		
WE(1)	:	On
Wait time		
Wait time(s)	:	5
Record signal (>1ms) galvanostat		
Duration(s)	:	600
Interval time(s)	:	1
Estimated number of point	:	600

หลังจากการผลิตเสร็จสิ้นจะได้สารละลาย ABTS^{•+} สีเขียวน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ application : scan ที่ความยาวคลื่น 400-900 nm ทำการทดลองซ้ำโดยการเปลี่ยนค่า Current(A) เป็น 4, 6 และ 8 mA ตามลำดับ

3.6.1.3 ความเข้มข้นของสารละลาย ABTS

การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย ABTS เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นภายในสารละลายก็จะมีปริมาณ ABTS มากขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณของ $ABTS^{•+}$ เพิ่มขึ้น และจะติดตามได้จาก การวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการศึกษาสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.3 และ 0.4 mM ซึ่งมีการกำหนดสภาวะการทดลองต่างๆ ในโปรแกรม NOVA 1.8 ดังต่อไปนี้

เลือก procedure Chronopotentiometry ($\Delta t > 1$ ms)

Autolab control

WE(1)Mode	:	Galvanostatic
WE(1)Bandwidth	:	High stability
WE(1)Current range	:	10 mA
Set current		
Current(A)	:	2.000E-03
Set cell		
WE(1)	:	On
Wait time		
Wait time(s)	:	5
Record signal (>1ms) galvanostat		
Duration(s)	:	600
Interval time(s)	:	1
Estimated number of point	:	600

หลังจากการผลิตเสร็จสิ้นจะได้สารละลาย $ABTS^{•+}$ สีเขียวน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ application : scan ที่ความยาวคลื่น 400-900 nm ทำการทดลองซ้ำโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของ ABTS เป็น 0.3 mM และ 0.4 mM ตามลำดับ

3.6.1.4 ชนิดของสารละลาย supporting electrolyte

ศึกษาชนิดของ Counter ions ของ supporting electrolyte ซึ่งมีผลต่อปริมาณของ $ABTS^{+}$ ที่เกิดขึ้น โดยทำศึกษาสารละลายอิมตัวของ $Zn(CH_3COO)_2$, $Zn(NO_3)_2$ และ $ZnCl_2$ ซึ่งมีการกำหนดสภาวะการทดลองต่างๆ ในโปรแกรม NOVA 1.8 เช่นเดียวกับการทดลอง 3.6.1.3 หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ application : scan ที่ความยาวคลื่น 400-900 nm ทำการทดลองซ้ำโดยการเปลี่ยนเป็นสารละลายอิมตัวของ $Zn(NO_3)_2$ และ $ZnCl_2$ ตามลำดับ

3.6.1.5 ความเข้มข้นของสารละลาย supporting electrolyte

การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Zinc acetate ซึ่งทำหน้าที่เป็น supporting electrolyte เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณของ $ABTS^{+}$ เพิ่มขึ้น และจะติดตามได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Zinc acetate ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 M และสารละลายอิมตัว ซึ่งมีการกำหนดสภาวะการทดลองต่างๆ ในโปรแกรม NOVA 1.8 เช่นเดียวกับการทดลอง 3.6.1.3 หลังจากการผลิตเสร็จสิ้นจะได้สารละลาย $ABTS^{+}$ สีเขียวน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ application : scan ที่ความยาวคลื่น 400-900 nm ทำการทดลองซ้ำโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลาย Zinc acetate เป็น 0.5 M และ 1.0 M ตามลำดับ

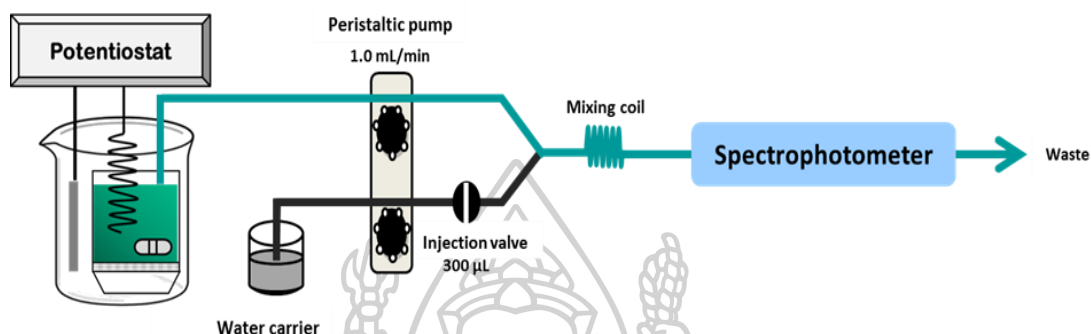
3.6.1.6 ความเสถียรของสารละลาย $ABTS^{+}$

ศึกษาความเสถียรของสารละลาย $ABTS^{+}$ ที่ผลิตได้ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยการนำสารละลาย $ABTS^{+}$ สีเขียวน้ำเงินไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ application : Time drive ทำการวัดเป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.6.1.7 การนำ $ABTS^{+}$ ที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้ามาทดสอบการใช้งาน

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงใช้สารละลาย $ABTS^{+}$ ที่ผลิตขึ้นด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้ามาใช้เป็นสารละลายรีเอเจนต์สำหรับวิธี ABTS assay เพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเครื่องตีสมุนไพรมานำระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสดังแสดงในรูปที่ 3.3 มาใช้โดยไหลสารละลาย $ABTS^{+}$ เข้าสู่ระบบโดยใช้ปั๊มลูกริตด้วยอัตราเร็ว 1.0 mL/min ทำการวิเคราะห์โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก หรือตัวอย่างผ่านวาล์ว โดยใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 μ L จากนั้นวัดสัญญาณด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 nm แล้วนำสัญญาณที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยพล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย

กรดแกลลิก (แกน X) กับความสูงของสัญญาณ (แกน Y) และคำนวณหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างโดยใช้ External calibration curve แล้วรายงานเป็นค่า Gallic Acid Equivalent (GAE) แล้วเปรียบเทียบกับวิธี ABTS แบบดั้งเดิม ซึ่งใช้สารละลาย ABTS^{•+} ที่ผลิตได้จากการใช้สารเคมี



รูปที่ 3.3 แผนภาพจำลองระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสสำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS

สำหรับวิธี ABTS แบบดั้งเดิม ทำการทดลองแบบ batch โดยนำสารละลาย ABTS^{•+} ที่เตรียมได้จากการใช้สารเคมีปริมาตร 3.50 mL ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 0.10 mM หรือสารละลายตัวอย่างปริมาตรต่างๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4.00 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 nm นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหา %Remaining radical ตามสมการ 2.1

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง (แกน X) กับ %Remaining radical (แกน Y) เพื่อหาค่า EC₅₀ จากนั้นนำค่า EC₅₀ ไปคำนวณเปรียบเทียบกับค่า EC₅₀ ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกแล้วรายงานเป็นค่า GAE

3.6.2 สร้างและทดสอบคัลเลอร์มิเตอร์โดยอาศัยหลักการของฟิโอดีตี

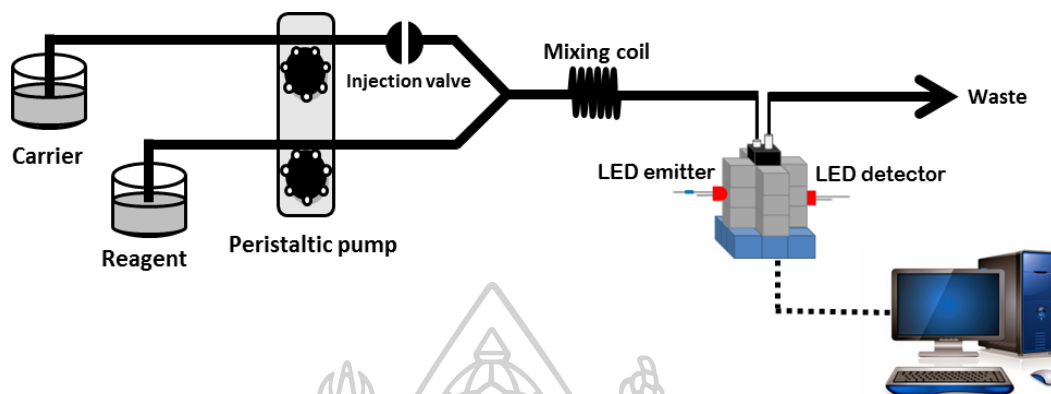
3.6.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของฟิโอดีตีกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ทดสอบประสิทธิภาพของฟิโอดีตี โดยประดิษฐ์ส่วนตรวจวัดฟิโอดีตีซึ่งใช้หลอดแอลอีดีจำนวน 2 หลอดเป็นแหล่งกำเนิดแสง (LED-emitter) และตรวจวัดแสง (LED-detector) ตามลำดับโดยทางด้าน LED-emitter เชื่อมต่อกับแหล่งจ่ายไฟกระแสตรง 5 V ผ่านตัวต้านทานขนาด $100 \pm 1 \ \Omega$ เพื่อแปลงแสงที่มีความเข้มแสงคงที่ และ LED-detector จะต่อกับ digital multimeter หลอดแอลอีดีทั้งสองนี้ยึดอยู่กับแท่นสำหรับวาง cuvette ซึ่งเป็นตัวต่อเลโก้ ในการทดลองนี้เลือกใช้หลอดแอลอีดีสีแดงเป็นแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัดแสง สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธี ABTS assay, DPPH assay และ FRAP assay แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดลองโดยนำสารละลายรีเอเจนท์ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 0.10 mM ปริมาตร 0.40-3.20 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.00 mL ผสมให้เข้ากัน และรอเวลาที่ปฏิกิริยาเกิดแบบสมบูรณ์โดยวิธี ABTS assay และ DPPH assay ใช้เวลา 30 นาที และวิธี FRAP assay ใช้เวลา 5 นาที นำสารละลายไปวัดสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นโวลต์ (V) ที่ได้จากหลอดแอลอีดีที่เป็นตัวตรวจวัดแสงของฟิโอดีตีที่ประดิษฐ์ขึ้น และนำสารละลายชุดเดียวกันนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) โดยพิจารณาจากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

3.6.2.2 สีหลอดแอลอีดีสำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

จัดระบบการไหลโพลินเจคชันอะนาลิซิสร่วมกับส่วนตรวจวัดฟิโอดีตี (FIA-PEDD) ดังรูปที่ 3.4 โดยใช้อัตราการไหล (flow rate) ของสารละลายรีเอเจนท์และน้ำตัวพาเท่ากับ 1.0 mL/min และปริมาตรตัวอย่าง (sample volume) เท่ากับ 300 μL ทำการศึกษาสีของแสงของหลอดแอลอีดีที่เหมาะสมสำหรับใช้วัดสารละลายของ reagent แต่ละวิธี เช่น วิธี ABTS assay จะใช้หลอดแอลอีดี ที่ให้แสงสีฟ้าเป็น LED-emitter และใช้หลอดแอลอีดีเดียวกันเป็น LED-detector ด้วย ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่างๆ แล้ววัดสัญญาณออกมาเป็นค่าความต่างศักย์ (voltage) ที่ได้จากหลอด LED-detector จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของแสงที่ผ่านตัวอย่างมาตกกระทบที่ LED-detector และแปรตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ พล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (แกน X) กับความสูงของสัญญาณ (แกน Y) จากนั้นทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนสีของแสงของหลอดแอลอีดีทั้ง LED-emitter และ LED-detector เป็นสีเขียว สีเหลือง และสีแดงตามลำดับ เปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์

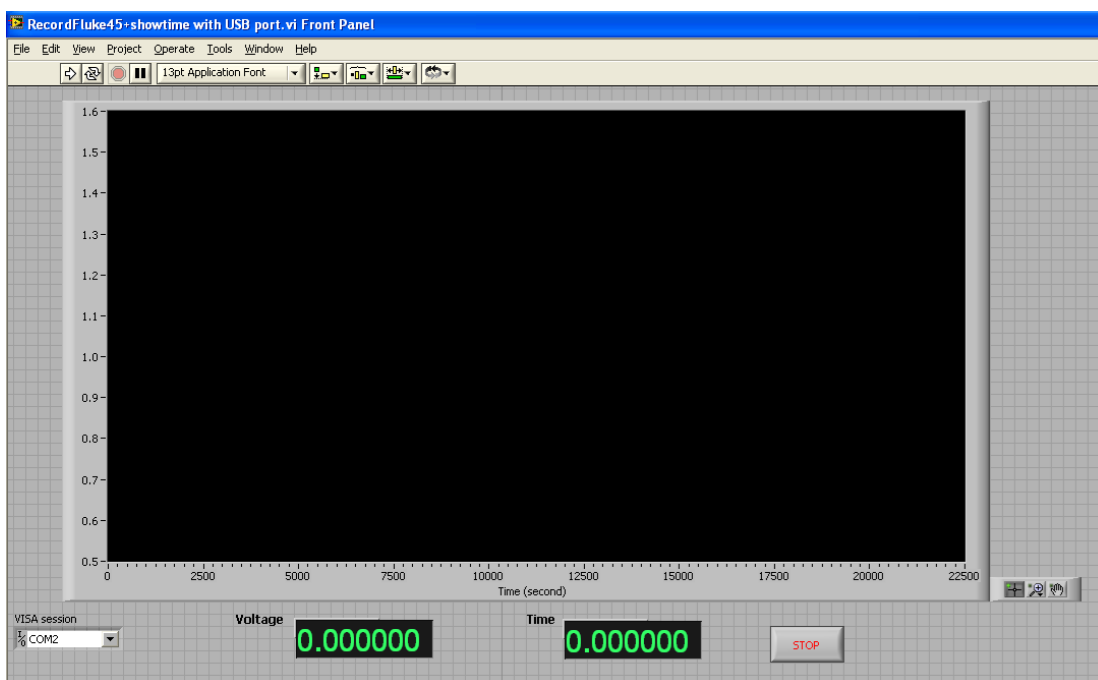
โดยพิจารณาจากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน และทำการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้กับ DPPH assay และ FRAP assay



รูปที่ 3.4 แผนภาพจำลองระบบการไหล FIA-PEDD สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3.6.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ FIA-PEDD สำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบปฏิกิริยาเดียว (Single assay)

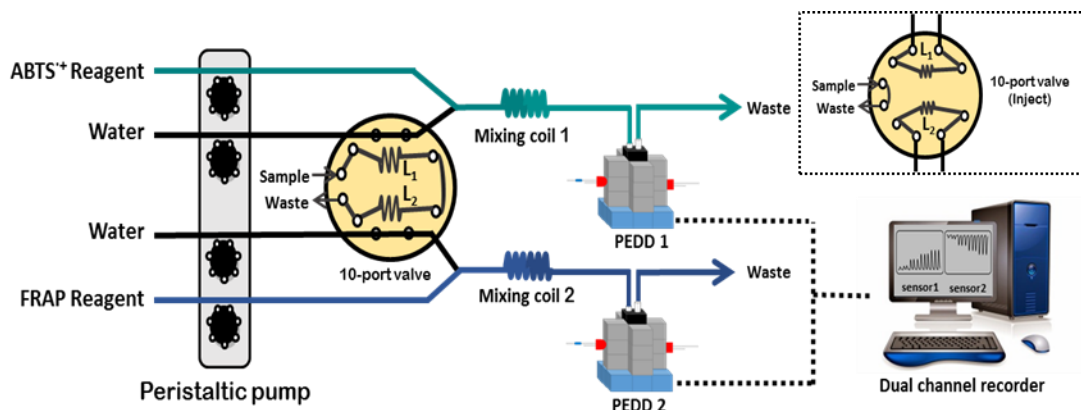
งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบ FIA-PEDD สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบปฏิกิริยาเดียว ออกแบบการทดลองโดยจัดระบบ FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.4 โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกผ่านวาล์ว เข้าสู่กระแสตัวพา (carrier stream) ซึ่งไหลอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการไหลคงที่ ควบคุมโดยปั๊มลูกรีด สารละลายไหลผ่านท่อลำเลียงสาร ปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับสารละลายรีเอเจนท์ จะเกิดขึ้นที่ท่อผสม (mixing coil) จากนั้นท่อนที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาจะถูกพาไปยังส่วนตรวจวัดฟิอิดิตี และอ่านสัญญาณด้วยเครื่อง digital multimeter แล้วแสดงผลผ่านหน้าจocomพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม LabVIEW 8.2TM (รูปที่ 3.5) ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณลักษณะการวิเคราะห์ ได้แก่ ความยาวของท่อผสม (length of mixing coil) อัตราการไหล (flow rate) และปริมาตรตัวอย่าง (sample volume) เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุด เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละวิธีแล้ว จึงประเมินความสามารถของตัวอย่างด้วยระบบที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีแบบ batch



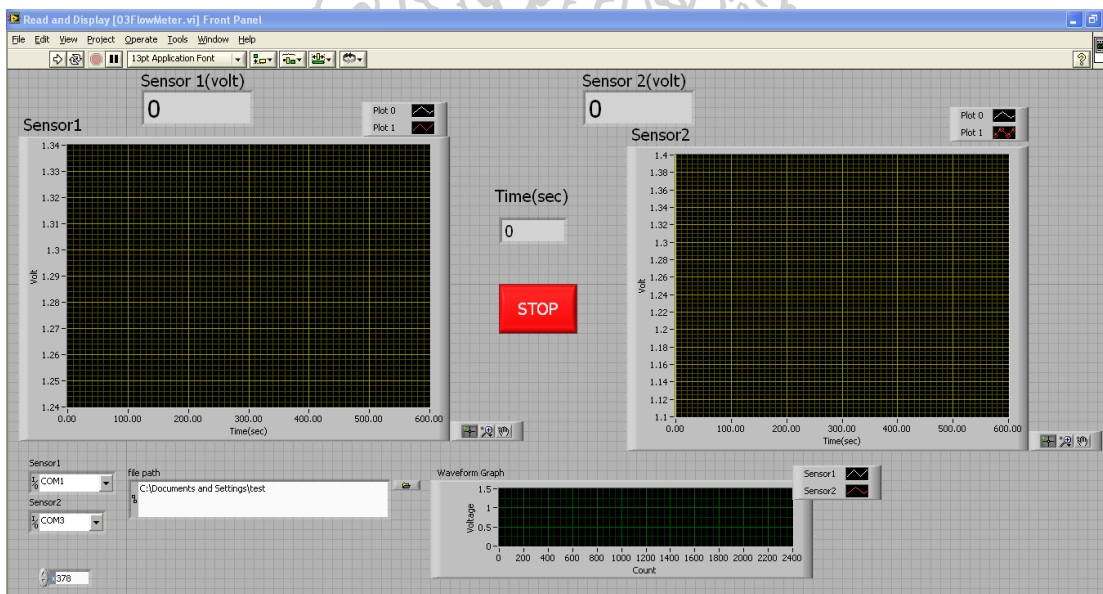
รูปที่ 3.5 หน้าจอแสดงผลของโปรแกรม LabVIEW 8.2TM

3.6.4 การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยระบบ FIA-PEDD แบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน (Dual assay)

งานวิจัยส่วนนี้ได้พัฒนาระบบ FIA-PEDD สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกันโดยเลือกวิธี ABTS assay และ FRAP assay เนื่องจากรีเอเจนท์ที่ใช้สามารถเตรียมได้ใน aqueous solution และสามารถใส่สารตัวพาเป็นน้ำร่วมกันได้ ออกแบบการทดลองโดยจัดระบบการไหล FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.6 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากทดลองข้อ 3.6.3 แล้วฉีดสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างผ่านวาล์ว (10-port valve) ซึ่งมี 2 sample loop (L1 และ L2) ท่อนโซนของตัวอย่างใน L1 จะถูกกระแสตัวพาไปผสมกับสารละลาย ABTS⁺ เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับสารละลายรีเอเจนท์ที่ต่อช่วยผสม 1 จากนั้นท่อนโซนที่เกิดปฏิกิริยาจะถูกพาไปยังส่วนตรวจวัดฟิอิตีดี 1 ในขณะเดียวกันท่อนโซนของตัวอย่างใน L2 จะถูกกระแสตัวพาไปผสมกับสารละลาย FRAP เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับสารละลายรีเอเจนท์ที่ต่อช่วยผสม 2 จากนั้นท่อนโซนที่เกิดปฏิกิริยาจะถูกพาไปยังส่วนตรวจวัดฟิอิตีดี 2 และอ่านสัญญาณด้วยเครื่อง digital multimeter แสดงผลผ่านหน้าจอคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม LabVIEW 8.2TM ซึ่งสามารถบันทึกสัญญาณได้ 2 ช่องไปพร้อมๆ กัน (รูปที่ 3.7)



รูปที่ 3.6 แผนภาพจำลองระบบการไหล FIA-PEDD สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน และ 10-port valve แสดงจังหวะ load และ inject (รูปแทรก)



รูปที่ 3.7 หน้าจอแสดงผลของโปรแกรม LabVIEW 8.2™ แบบ 2 channel

3.6.5 การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมของตัวอย่างด้วยวิธีดั้งเดิมแบบ Batch (classical method)

สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมในตัวอย่างแบบดั้งเดิม วิธี ABTS assay ทำการทดลองโดยนำสารละลาย ABTS⁺ ปริมาตร 3.50 mL ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 0.10 mM หรือสารละลายตัวอย่างปริมาตรต่างๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4.00 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่า

การดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 nm นำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง (แกน X) กับ %Remaining radical (แกน Y) เพื่อหาค่า EC50 จากนั้นนำค่า EC50 ไปคำนวณเปรียบเทียบกับค่า EC50 ของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกแล้วรายงานเป็นค่า AAE

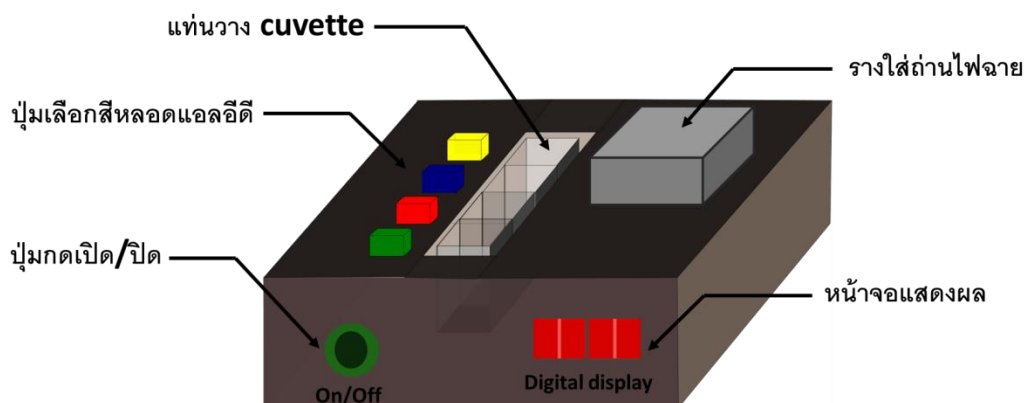
ส่วนวิธี FRAP assay ทำการทดลองโดยนำสารละลายรีเอเจนท์ FRAP ปริมาตร 1.00 mL ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 0.10 mM หรือสารละลายตัวอย่างปริมาตรต่างๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4.00 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (แกน X) กับ ค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างไปคำนวณหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระผ่านวิธี external calibration curve ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก แล้วรายงานเป็นค่า AAE เช่นกัน

3.6.6 การสร้างเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพา (Prototype of handheld colorimeter)

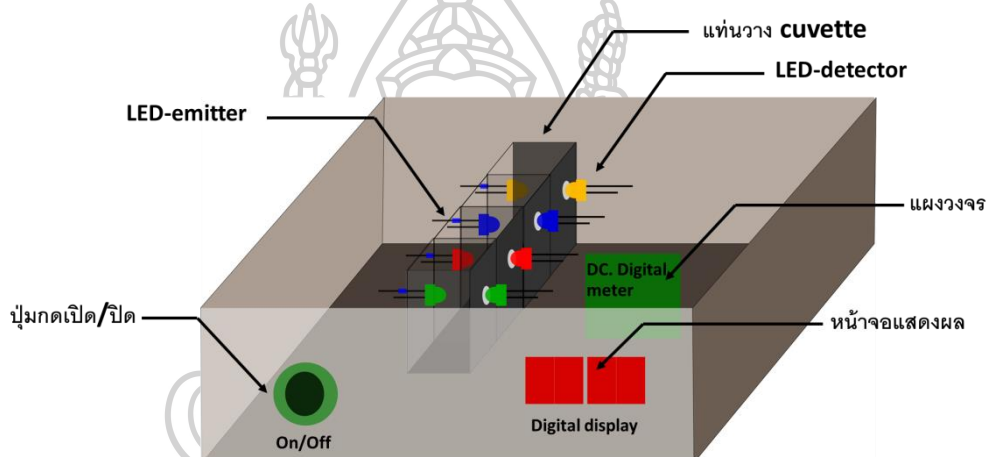
งานวิจัยนี้ได้ออกแบบและพัฒนาเครื่องคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพาโดยอาศัยหลักการของฟิสิกส์ โดยเครื่องคัลเลอริมิเตอร์นี้ใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดแสง สามารถเลือกวัดโดยใช้แสงจากหลอดแอลอีดี ได้ 4 สี คือ สีเหลือง สีฟ้า สีแดง และสีเขียว เครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้สามารถใช้งานได้ง่าย สะดวกต่อการพกพาไปใช้วิเคราะห์ภาคสนามได้

เครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่สร้างในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย หลอดแอลอีดีสีเหลือง สีฟ้า สีแดง และสีเขียว สำหรับเป็นแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัดแสง รางถ่านไฟฉายสำหรับถ่านไฟฉายขนาด AA จำนวน 4 ก้อน แท่นวาง cuvette วงจรดิจิทัลมิเตอร์ หน้าจอแสดงผลแบบดิจิทัล และปุ่มกดเปิด/ปิด

วิธีการใช้งานของเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ คือ ใส่ถ่านไฟฉาย AA ขนาด 1.5 V จำนวน 4 ก้อนในรางถ่าน แล้วกดปุ่มเปิดเครื่องทำงาน จากนั้นกดปุ่มเลือกสีหลอดแอลอีดี ที่ต้องการใช้งาน แล้วอ่านค่าสัญญาณที่วัดได้จากหน้าจอแสดงผลแบบดิจิทัล



รูปที่ 3.8 การออกแบบลักษณะภายนอกของเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพา



รูปที่ 3.9 การออกแบบลักษณะภายในของเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพา

จากนั้นนำเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่ประดิษฐ์ขึ้นมาทดสอบการใช้งานสำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของวิธี ABTS assay, DPPH assay และ FRAP assay ทำการทดลองโดยนำสารละลายรีเอเจนท์ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 0.10 mM ปริมาตร 0.02-0.5 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4.00 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเหวี่ยง (vortex) และรอเวลาที่ปฏิกิริยาเกิดแบบสมบูรณ์โดยวิธี ABTS assay และ DPPH assay ใช้เวลา 30 นาที และวิธี FRAP assay ใช้เวลา 5 นาที นำสารละลายไปวัดสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นโวลต์ (V) ด้วยเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่ประดิษฐ์ขึ้น แล้วอ่านค่าสัญญาณที่ได้โดยฟोटодиโอดีใช้หลอดแอลอีดีสีฟ้า สีเหลือง สีเขียว และสีแดง แล้วพล็อตกราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกับค่าสัญญาณที่อ่านได้

บทที่ 4

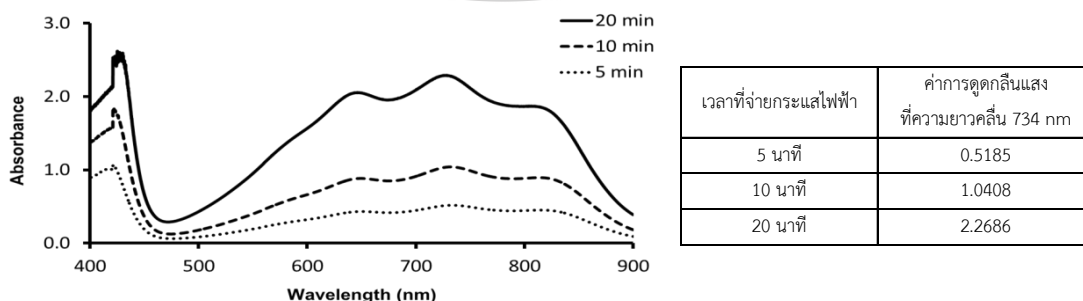
ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง (Results and Discussion)

4.1 การผลิต $ABTS^{+}$ ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อผลิต $ABTS^{+}$ ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าโดยจัดอุปกรณ์ตามรูปที่ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต $ABTS^{+}$ จากนั้นนำ $ABTS^{+}$ ที่ผลิตได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งสารละลาย $ABTS^{+}$ ที่ต้องการจะต้องมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7 ที่ความยาวคลื่น 734 nm เพื่อนำไปใช้งานได้ทันที จากนั้นนำ $ABTS^{+}$ ที่ผลิตได้ไปใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรด้วยระบบการไหลแบบโฟลอินเจกชันอะนาลิซิส

4.1.1 ผลของเวลาที่จ่ายกระแสไฟฟ้า

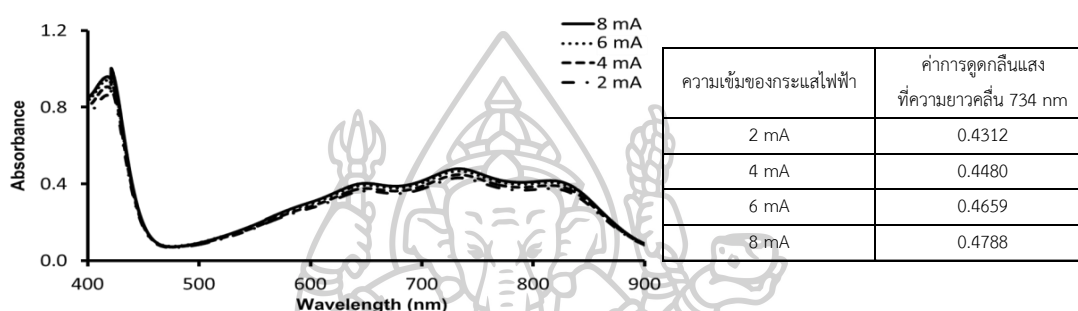
ผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการให้กระแสไฟฟ้าแก่ระบบ 6 mA ที่ขั้วแอโนดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้ $ABTS$ สูญเสียอิเล็กตรอนเกิดเป็น $ABTS^{+}$ ซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีเขียวเข้ม ดังนั้นเมื่อเพิ่มเวลาในการให้กระแสไฟฟ้าที่นานขึ้น จะส่งผลให้ $ABTS$ สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกลายเป็น $ABTS^{+}$ ได้เพิ่มมากขึ้นด้วย สารละลายที่ได้จะมีสีเขียวเข้มขึ้น ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้น พบว่าที่เวลาในการให้กระแสไฟฟ้า 20 นาที มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดแสดงผลดังรูปที่ 4.1 อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้จึงได้เลือกเวลาที่ให้กระแสไฟฟ้าเป็น 10 นาที เนื่องจากสามารถทำให้สารละลาย $ABTS$ เกิดเป็นสารละลาย $ABTS^{+}$ ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm มีค่าใกล้เคียง 0.7 ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปใช้งานสำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้



รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{+}$ เมื่อใช้สารละลาย $ABTS$ เข้มข้น 0.2 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 6 mA เป็นเวลานาน 5, 10 และ 20 นาที และใช้สารละลายอิมตัว Zinc acetate เป็น supporting electrolyte

4.1.2 ผลของความเข้มของกระแสไฟฟ้า

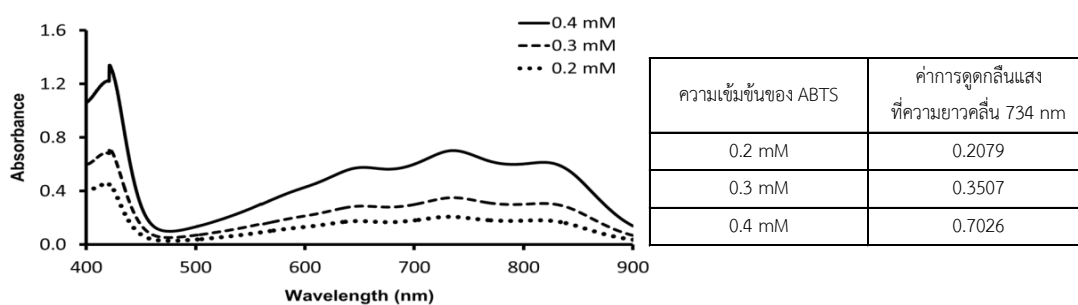
ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2 พบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มของกระแสไฟฟ้า ไม่ได้ส่งผลต่อการเกิด $ABTS^{*+}$ สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{*+}$ ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงว่าความเข้มของกระแสไฟฟ้านั้นไม่ได้มีผลต่อการผลิต $ABTS^{*+}$ มากนัก ดังนั้นจึงเลือกความเข้มของกระแสไฟฟ้าที่ 2 mA ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุด เพื่อเป็นการประหยัดพลังงาน และสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Alonso *et al.*, 2003)



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{*+}$ เมื่อใช้สารละลาย $ABTS$ เข้มข้น 0.2 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2, 4, 6 และ 8 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว Zinc acetate เป็น supporting electrolyte

4.1.3 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย $ABTS$

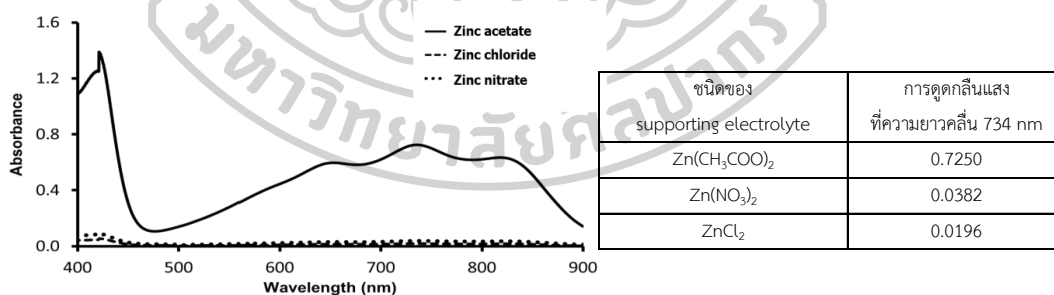
จากผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อใช้สารละลายตั้งต้น $ABTS$ ที่มีความเข้มข้นมาก จะให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{*+}$ ที่เพิ่มมากขึ้นด้วย เนื่องจากสารละลายตั้งต้น $ABTS$ ที่มีความเข้มข้นมากจะมีปริมาณของ $ABTS$ มากขึ้นด้วย เมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้มีการเกิดของ $ABTS^{*+}$ ได้เพิ่มขึ้น สารละลายที่ได้จึงมีสีเขียวที่เข้มขึ้น ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงขึ้นด้วย ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น $ABTS$ ที่ 0.4 mM มาใช้สำหรับการผลิต $ABTS^{*+}$ เพื่อที่จะให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7 ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เพียงพอต่อการนำไปใช้งาน



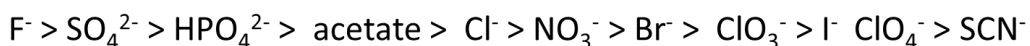
รูปที่ 4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ เมื่อใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.2, 0.3 และ 0.4 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว Zinc acetate เป็น supporting electrolyte

4.1.4 ผลของชนิดของสารละลาย supporting electrolyte

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนชนิด counter ions ของสารละลาย supporting electrolyte มีผลต่อการเกิด $ABTS^{+\bullet}$ สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงเมื่อใช้ $Zn(NO_3)_2$ และ $ZnCl_2$ จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำมากๆ แต่เมื่อใช้ $Zn(CH_3COO)_2$ สารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ ที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูง เนื่องจาก CH_3COO^- เป็น Kosmotropic anions ตาม Hofmeister series สามารถช่วย stabilizing $ABTS^{+\bullet}$ ได้ ส่วน NO_3^- และ Cl^- จัดอยู่ในกลุ่มของ Chaotropic anions ซึ่งจะไม่ช่วย stabilizing $ABTS^{+\bullet}$ โดยความสามารถในการช่วย stabilizing เป็นไปตามลำดับในรูปที่ 4.5 (Yang, 2009) ดังนั้น จึงได้เลือกสารละลาย Saturated zinc acetate มาใช้สำหรับการผลิต $ABTS^{+\bullet}$



รูปที่ 4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ เมื่อใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.4 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว $Zn(CH_3COO)_2$, $Zn(NO_3)_2$ และ $ZnCl_2$ เป็น supporting electrolyte

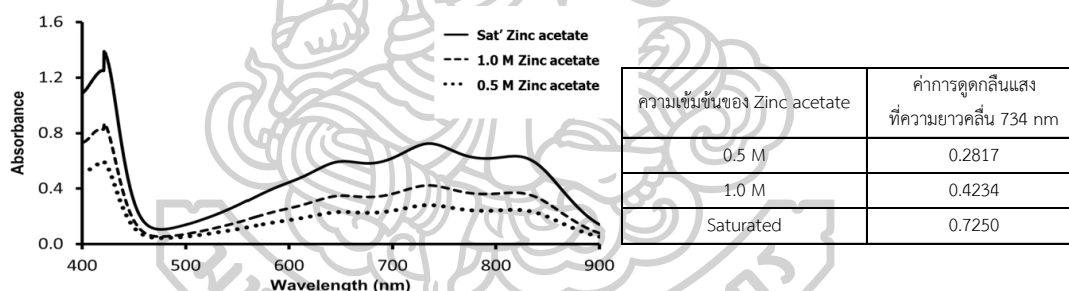


	Kosmotropic ions	chaotropic ions
Size	Small	Large
Surface charge density	High	Low
Hydration	Strong	Weak
Effect on water structure	Structure making	Structure breaking

รูปที่ 4.5 The Hofmeister series (Yang, 2009)

4.1.5 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย Zinc acetate

จากผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ Zinc acetate ส่งผลให้มีการเกิด $ABTS^{*+}$ มากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มมากขึ้น โดยที่สารละลายอิมิตัวจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุด เนื่องจาก Hofmeister ion effect นี้จะส่งผลก็ต่อเมื่อเกลือ Zinc acetate มีความเข้มข้นมาก (Yang, 2009)



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{*+}$ เมื่อใช้สารละลาย $ABTS$ เข้มข้น 0.4 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลาย Zinc acetate เข้มข้น 0.5, 1.0 M และอิมิตัวเป็น supporting electrolyte

4.1.6 ผลของความเสถียรของ $ABTS^{*+}$

จากผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ค่าการดูดกลืนแสงยังคงให้ค่าใกล้เคียงเดิม โดยมีค่าใกล้เคียง 0.7 ที่ความยาวคลื่น 734 nm มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ดังนั้นสารละลาย $ABTS^{*+}$ ที่ผลิตได้มีความเสถียรมากในช่วงเวลา 30 นาที ซึ่งเพียงพอต่อการวิเคราะห์ด้วยระบบการไหล FIA โดยปริมาตรสารละลาย $ABTS^{*+}$ ที่ผลิตได้แต่ละครั้งประมาณ 25 mL สามารถสร้างกราฟมาตรฐานพร้อมวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 3 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามจากรูป 4.7 จะเห็นว่ากรการผลิต $ABTS^{*+}$ แต่ละครั้งสามารถทำซ้ำและได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่แตกต่างกัน

นอกจากนี้สามารถคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย ABTS^{•+} ที่ผลิตได้จากวิธีนี้โดยใช้ค่า molar absorptivity ของ ABTS^{•+} จากงานวิจัยก่อนหน้า (Re et al., 1999) เท่ากับ $1.5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ Lcm}^{-1}$ โดย ABTS^{•+} ที่ผลิตได้มีความเข้มข้น $0.048 \pm 0.001 \text{ mM}$



รูปที่ 4.7 การดูคลื่นแสงของสารละลาย ABTS^{•+} เป็นเวลา 30 นาที เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 0.4 mM แล้วให้กระแสไฟฟ้า 2 mA เป็นเวลานาน 10 นาที และใช้สารละลายอิมิตัว Zinc acetate เป็น supporting electrolyte

4.1.7 การประยุกต์ ABTS^{•+} ที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าเพื่อใช้ประเมินประเมิน

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรด้วยวิธี ABTS assay

การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพร โดยนำระบบการไหลโพลินเจกชันอะนาไลซิสมาใช้ในการวิเคราะห์ และใช้สารละลาย ABTS^{•+} ที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าเป็นรีเอเจนต์ แล้วเปรียบเทียบกับวิธี ABTS แบบดั้งเดิม โดยใช้สารละลาย ABTS^{•+} ที่เตรียมได้จากการใช้สารเคมี โดยพิจารณาจากค่า GAE ของตัวอย่าง ซึ่งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพร 7 ตัวอย่างของทั้งวิธีโพลินเจกชันอะนาไลซิสและวิธีดั้งเดิมแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ *t*-test (paired two sample for means) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่า t_{stat} มีค่าเท่ากับ 1.47 ซึ่งน้อยกว่า t_{critical} ที่มีค่าเท่ากับ 2.45 ดังนั้นผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีนี้จึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าสารละลาย ABTS^{•+} ที่ผลิตโดยอาศัยวิธีทางเคมีไฟฟ้าสามารถนำมาใช้เป็นรีเอเจนต์สำหรับวิธี ABTS assay ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำวิธีการเตรียมสารละลาย ABTS^{•+} ที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า มาใช้แทนวิธีการใช้สารเคมีเพื่อลดระยะเวลาในการเตรียมรีเอเจนต์ได้

ตารางที่ 4.1 ค่า Gallic acid equivalent (GAE) ในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรที่วิเคราะห์ 7 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ABTS ที่ใช้ระบบการไหลโพลินเจนคชันอะนาไลซิส (FIA method) โดยใช้สารละลาย ABTS^{•+} ที่ผลิตโดยวิธีทางเคมีไฟฟ้า เปรียบเทียบกับค่า GAE จากวิธีดั้งเดิม (Batch method) ที่ใช้สารละลาย ABTS^{•+} ที่เตรียมได้จากการใช้สารเคมี

Sample	GAE (mg/g sample)	
	Chemical generation with batch method ^a	Electrochemical generation with FIA method
ชา 1	0.14±0.01	0.11±0.73
ชา 2	0.40±0.01	0.31±0.41
ชา 3	0.91±0.01	0.71±0.09
ชา 4	1.70±0.03	1.93±0.05
ชา 5	2.21±0.08	2.41±0.37
ชา 6	33.31±1.23	35.30±0.45
ชา 7	46.16±1.26	50.18±0.46

^a เตรียมสารละลายตัวอย่างตามภาคผนวก 5



4.2 การสร้างและทดสอบฟิโอดีตี

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อสร้างฟิโอดีตีและทดสอบประสิทธิภาพของฟิโอดีตีเปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และหาสีของหลอดแอลอีดีที่เหมาะสมสำหรับวิธีการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันในแต่ละวิธี โดยนำฟิโอดีตีมาใช้ร่วมกับระบบการไหลโพลินเจกชันอะนาไลซิส

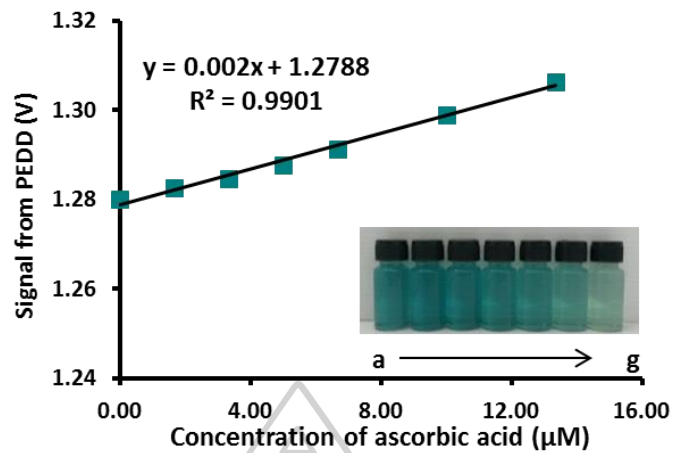
4.2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของฟิโอดีตีเปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

4.2.1.1 วิธี ABTS assay

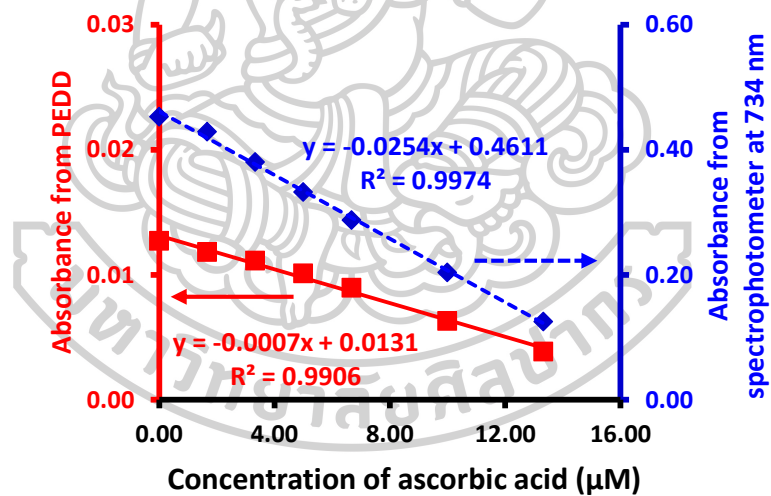
ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8 จะเห็นว่าสัญญาณของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นต่างๆ ที่วัดได้จากฟิโอดีตีมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเพิ่มมากขึ้น จะเกิดปฏิกิริยาจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{*+}$ มากขึ้น จึงเหลืออนุมูลอิสระ $ABTS^{*+}$ น้อยลง ทำให้สีของสารละลาย $ABTS^{*+}$ จางลง จึงมีแสงจากหลอด LED-emitter ส่องผ่านไปยังหลอด LED-detector มากขึ้น สัญญาณจึงเพิ่มขึ้น จากนั้นอาศัยสมการ

$$Absorbance = -\log \frac{V}{V_0} \quad (\text{สมการ 4.1})$$

ในการเปลี่ยนสัญญาณความต่างศักย์ที่วัดได้จากฟิโอดีตีเป็นค่าการดูดกลืนแสง เมื่อ V คือ ค่าความต่างศักย์ของสารละลายที่ต้องการตรวจวัด (Colored solution) และ V_0 คือ ค่าความต่างศักย์ของน้ำกลั่น (100% Transparent solution) จากนั้นเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แสดงผลดังรูปที่ 4.9 พบว่าความไวในการวิเคราะห์ของฟิโอดีตีน้อยกว่าเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ อย่างไรก็ตามกราฟมาตรฐานแสดงความเป็นเส้นตรงที่ดีมาก ($r^2 = 0.9974$) แสดงถึงความสัมพันธ์ที่ระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณ และความไวในการวิเคราะห์นี้เพียงพอสำหรับการตรวจวัดการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธี ABTS assay แล้ว



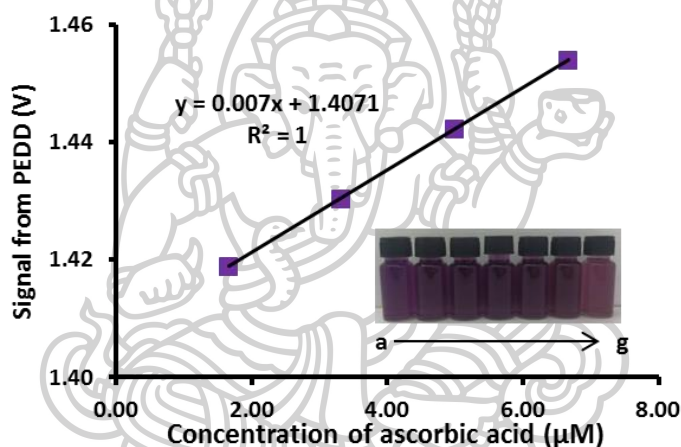
รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก กับสัญญาณที่วัดได้จากฟิอิตีติของสารละลาย ABTS⁺ reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ a) 0.0, b) 1.67, c) 3.33, d) 5.00, e) 6.67, f) 10.00 and g) 13.33 μM แสดงในรูปแบบแทรก



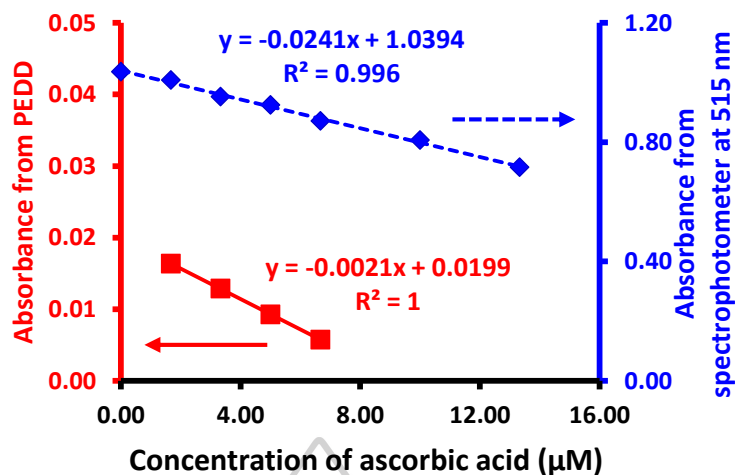
รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานแสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากฟิอิตีติกับค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 nm

4.2.1.2 วิธี DPPH assay

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 พบว่าสัญญาณของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นต่างๆ ที่วัดได้จากพีอีดีตีมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเพิ่มมากขึ้น ปฏิกริยากับอนุมูลอิสระ DPPH[•] มากขึ้น จึงเหลืออนุมูลอิสระ DPPH[•] น้อยลง ทำให้สีของสารละลาย DPPH[•] จางลง จึงมีแสงจากหลอด LED-emitter ส่งผ่านไปยังหลอด LED-detector มากขึ้น สัญญาณจึงเพิ่มขึ้น จากนั้นอาศัยสมการ 4.1 ในการเปลี่ยนสัญญาณความต่างศักย์ที่วัดได้จากพีอีดีตีเป็นค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แสดงผลดังรูปที่ 4.11 พบว่าความไวในการวิเคราะห์ของพีอีดีตีน้อยกว่าเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก กับสัญญาณที่วัดได้จากพีอีดีตีของสารละลาย DPPH[•] reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ a) 0.0, b) 1.67, c) 3.33, d) 5.00, e) 6.67, f) 10.00 and g) 13.33 µM แสดงในรูปแทรก



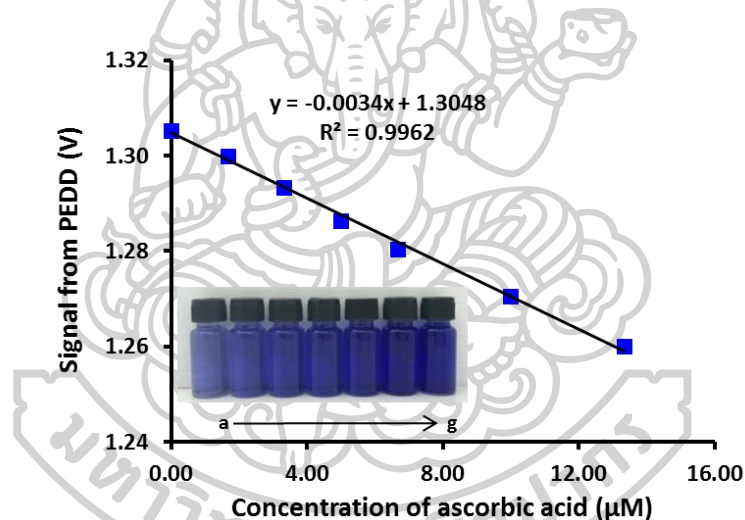
รูปที่ 4.11 กราฟมาตรฐานแสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากพีอีดีดีกับค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 nm

จากผลการทดลองจะเห็นว่า การใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตนั้นมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.00-13.33 µM แต่ในขณะที่การใช้พีอีดีดีมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.67-6.67 µM อาจจะมีสาเหตุมาจากการที่สีของหลอดแอลอีดีไม่เหมาะสมกับสีของสารละลาย เนื่องจากในวิธี DPPH assay นี้เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระทำให้ความเข้มของสารละลายสีม่วงลดลงจนเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลืองเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระมีความเข้มข้นมากขึ้น ซึ่งสารละลายสีเหลืองนี้อาจจะไม่เหมาะสมกับสีของหลอดแอลอีดีที่ใช้ จึงทำให้ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่แคบ

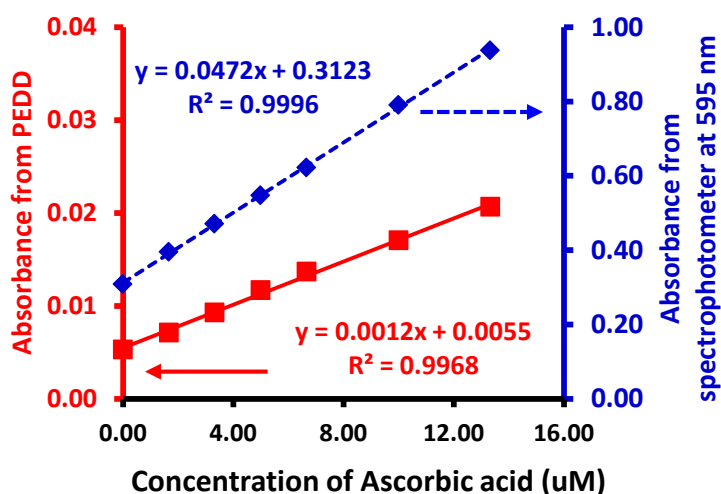


4.2.1.3 วิธี FRAP assay

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12 จะเห็นว่าสัญญาณของสารละลายแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่างๆ ที่วัดได้จากฟิอิดีตีมีค่าน้อยลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ มากขึ้น ทำให้สีของสารละลายเข้มขึ้น จึงมีแสงจากหลอด LED-emitter ส่องผ่านไปยังหลอด LED-detector ได้น้อยลง สัญญาณจึงลดลง จากนั้นอาศัยสมการ 4.1 ในการเปลี่ยนสัญญาณความต่างศักย์ที่วัดได้จากฟิอิดีตีเป็นค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แสดงผลดังรูปที่ 4.13 พบว่าความไวในการวิเคราะห์ของฟิอิดีตีน้อยกว่าเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ อย่างไรก็ตามกราฟมาตรฐานแสดงความเป็นเส้นตรงที่ดีมาก ($r^2 = 0.9968$) แสดงถึงความสัมพันธ์ที่ตรงระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณ และความไวในการวิเคราะห์นี้เพียงพอสำหรับการตรวจวัดการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธี FRAP assay แล้ว



รูปที่ 4.12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคกับสัญญาณที่วัดได้จากฟิอิดีตีของสารละลาย FRAP reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ a) 0.0, b) 1.67, c) 3.33, d) 5.00, e) 6.67, f) 10.00 and g) 13.33 µM แสดงในรูปแบบแทรก



รูปที่ 4.13 กราฟมาตรฐานแสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จาก PEDD detector กับค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 nm

4.2.2 ผลของสีหลอดแอลอีดีสำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

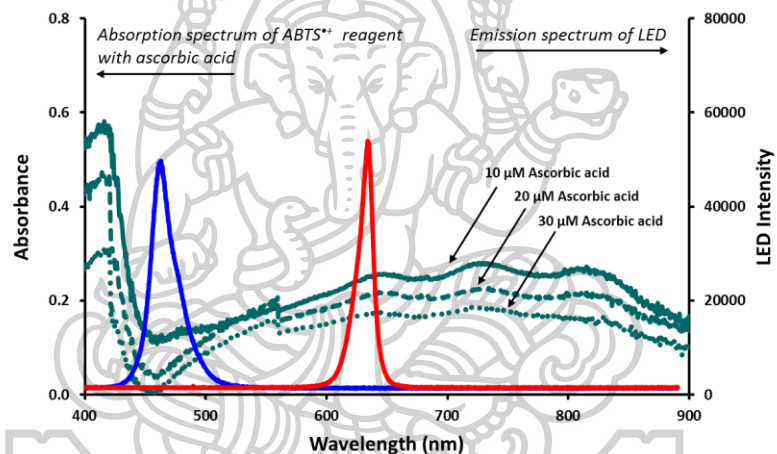
4.2.2.1 วิธี ABTS assay

ผลการทดลองจากการเปลี่ยนสีของแสงของคู่หลอดแอลอีดีสำหรับ emitter และ detector เป็นสีฟ้า เขียว เหลือง และแดง พบว่าเมื่อใช้หลอดแอลอีดีสีฟ้าให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดดังตารางที่ 4.2 ทั้งนี้เมื่อใช้หลอดแอลอีดีสีแดงพบว่าให้ความไวในการวิเคราะห์ลดลงแต่ยังคงเพียงพอสำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน รวมถึงให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีเช่นเดียวกับหลอดแอลอีดีสีฟ้า

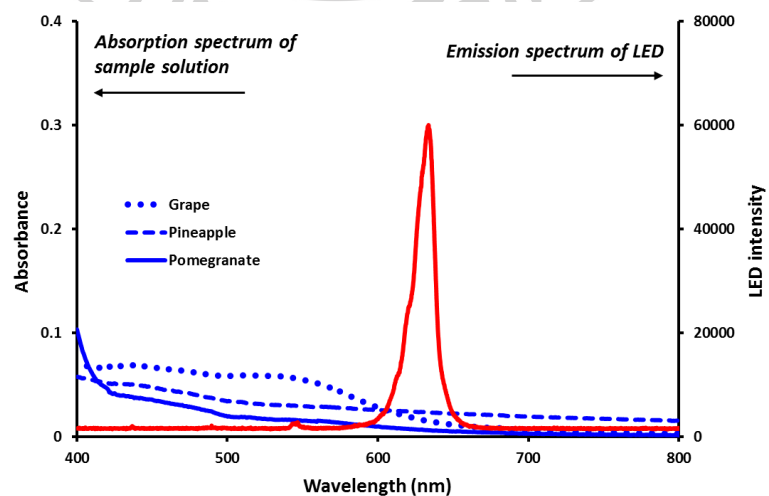
ตารางที่ 4.2 สมการเส้นตรง ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) และช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก โดยเปลี่ยนหลอด LED-emitter และ LED-detector เป็นสีต่างๆ สำหรับวิธี ABTS assay

สีของแสงของหลอดแอลอีดี	สมการเส้นตรง	ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2)	ช่วงความเป็นเส้นตรง
ฟ้า (463 nm)	$y = 4.9777x - 32.950$	0.9980	10-40 μM
เขียว (520 nm)	$y = 0.3397x - 0.7333$	0.9949	20-50 μM
เหลือง (567 nm)	$y = 0.3451x - 1.5467$	0.9970	10-40 μM
แดง (634 nm)	$y = 1.805x + 3.9390$	0.9981	10-40 μM

ผลการทดลองสอดคล้องกับสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS⁺ เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 μM แสดงดังรูปที่ 4.14 โดยมีช่วงการดูดกลืนแสงระหว่าง 460-900 nm ($\lambda_{\text{max}} = 734 \text{ nm}$) เมื่อพิจารณาร่วมกับสเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีฟ้า ($\lambda_{\text{max}} = 463 \text{ nm}$) จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นต่างกันบริเวณที่มีการซ้อนทับกันจะมีการดูดกลืนแสงที่มีความเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน จึงทำให้หลอดแอลอีดีสีฟ้ามีความไวในการวิเคราะห์ที่สูงที่สุด และเมื่อพิจารณาสเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีแดง ($\lambda_{\text{max}} = 634 \text{ nm}$) จะเห็นว่าการซ้อนทับเช่นกัน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เลือกใช้หลอดแอลอีดีสีแดง เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนที่อาจเกิดขึ้นได้จากสีของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 600 nm (รูปที่ 4.15) ดังนั้นหลอดแอลอีดีสีแดงจึงสามารถใช้เป็น LED-emitter และ LED-detector สำหรับวิธี ABTS assay ได้



รูปที่ 4.14 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีฟ้าและสีแดง และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS⁺ ที่มีสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.15 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีแดง และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำผลไม้เจือจางตามทิววิเคราะห์จริง

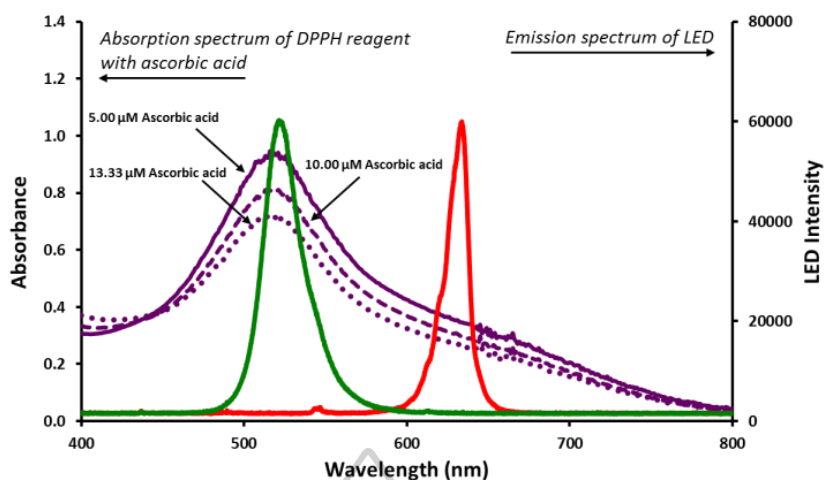
4.2.2.2 วิธี DPPH assay

ผลการทดลองจากการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยกรดแอสคอร์บิกและเปลี่ยนสีของคู่อลิตีสำหรับ emitter และ detector เป็นสีฟ้า เขียว เหลือง และแดง พบว่าเมื่อใช้หลอดแอลอีดีสีแดงให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด รวมถึงให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี แสดงผลดังตารางที่ 4.3 ทั้งนี้เมื่อใช้หลอดแอลอีดีสีแดงพบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นที่ต่ำ คือ อยู่ในช่วง 40-120 μM

ตารางที่ 4.3 สมการเส้นตรง ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) และช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก โดยเปลี่ยนหลอด LED-emitter และ LED-detector เป็นสีต่างๆ สำหรับวิธี DPPH assay

สีของแสงของหลอดแอลอีดี	สมการเส้นตรง	ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2)	ช่วงความเป็นเส้นตรง
ฟ้า (463 nm)	$y = 72.07x - 11.201$	0.9959	0.3-0.7 mM
เขียว (520 nm)	$y = 207.36x - 61.778$	0.9844	0.3-0.7 mM
เหลือง (567 nm)	$y = 113.03x - 25.373$	0.9428	0.3-0.7 mM
แดง (634 nm)	$y = 1056.2x - 18.284$	0.9873	40-120 μM

สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 5.00, 10.00 และ 13.33 μM แสดงดังรูปที่ 4.16 โดยมีช่วงการดูดกลืนแสงระหว่าง 430-700 nm ($\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$) เมื่อพิจารณาร่วมกับสเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีเขียว ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) และสีแดง ($\lambda_{\text{max}} = 634 \text{ nm}$) แม้ว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ซ้อนทับกับสเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีเขียวมากกว่า แต่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้หลอดแอลอีดีสีแดงให้ค่าความไวในการวิเคราะห์ที่มากกว่า ดังนั้นหลอดแอลอีดีสีแดงจึงเหมาะสมสำหรับการใช้เป็น LED-emitter และ LED-detector สำหรับวิธี DPPH assay



รูปที่ 4.16 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีเขียวและสีแดง และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.2.2.3 วิธี FRAP assay

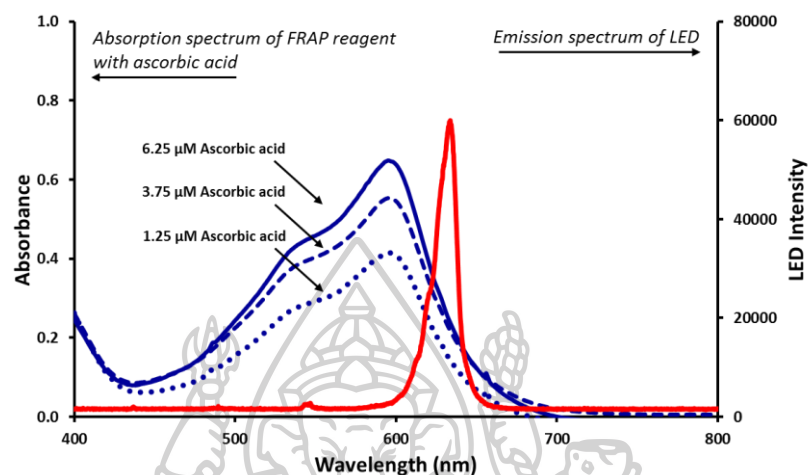
ผลการทดลองจากการเปลี่ยนสีของแสงของคู่หลอดแอลอีดีสำหรับ emitter และ detector เป็นสีฟ้า เขียว เหลือง และแดง พบว่าเมื่อใช้หลอดแอลอีดีสีแดงจะให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดดังตารางที่ 4.4 นอกจากนี้เมื่อใช้หลอดแอลอีดีสีแดงพบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นที่ต่ำ คือ อยู่ในช่วง 10-40 μM

ตารางที่ 4.4 สมการเส้นตรง ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) และช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก โดยเปลี่ยนหลอด LED-emitter และ LED-detector เป็นสีต่างๆ สำหรับวิธี FRAP assay

สีของแสงของหลอดแอลอีดี	สมการเส้นตรง	ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2)	ช่วงความเป็นเส้นตรง
ฟ้า (463 nm)	$y = 0.3538x + 8.878$	0.9794	60-100 μM
เขียว (520 nm)	$y = 0.1294x + 0.486$	0.9986	20-50 μM
เหลือง (567 nm)	$y = 0.0478x + 5.352$	0.8465	60-100 μM
แดง (634 nm)	$y = 2.8091x - 18.335$	0.9655	10-40 μM

ผลการทดลองสอดคล้องกับสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 1.25, 3.75 และ 6.25 μM แสดงดังรูปที่ 4.17 โดยมีช่วง

การดูดกลืนแสงระหว่าง 430-700 nm ($\lambda_{\max} = 595$ nm) เมื่อพิจารณาพร้อมกับสเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีแดง ($\lambda_{\max} = 634$ nm) จะเห็นว่าการซ้อนทับกัน ดังนั้นหลอดแอลอีดีสีแดงจึงเหมาะสมสำหรับการใช้เป็น LED-emitter และ LED-detector สำหรับวิธี FRAP assay



รูปที่ 4.17 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีแดง และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย FRAP ที่มีสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

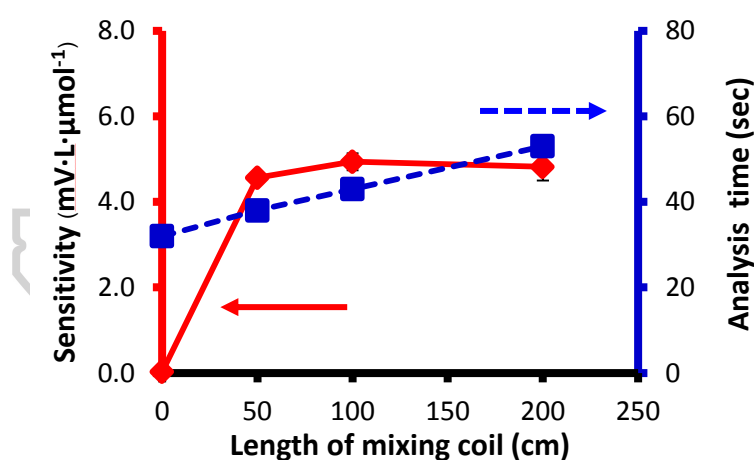


4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ FIA-PEDD สำหรับการประเมินความสามารถในการ ต้านออกซิเดชันแบบปฏิกิริยาเดียว

4.3.1 วิธี ABTS assay

4.3.1.1 ผลของความยาวของท่อผสมเมื่อใช้วิธี ABTS assay

ผลของความยาวของท่อผสมที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของระบบการไหลโพลินเจคชันอะนาไลซิส ทำการศึกษาความยาวของท่อผสมในช่วง 0-200 cm โดยจัดระบบ FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.4 ใช้น้ำเป็นกระแสดำพา และสารละลาย ABTS^{•+} เป็นรีเอเจนต์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.18 พบว่าระบบที่มีท่อช่วยผสม จะมีความไวในการวิเคราะห์มากกว่าระบบที่ไม่มีท่อช่วยผสมและทำให้ base line มีความเสถียรมากกว่าด้วย เมื่อเพิ่มความยาวของท่อผสมขึ้นจาก 50 cm เป็น 100 และ 200 cm พบว่าความไวในการวิเคราะห์มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเห็นได้ชัดว่าที่ความยาวของท่อผสมยาว 50 cm นั้นใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นลง (40 วินาทีต่อตัวอย่าง) โดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 90 ตัวอย่างใน 1 ชั่วโมง

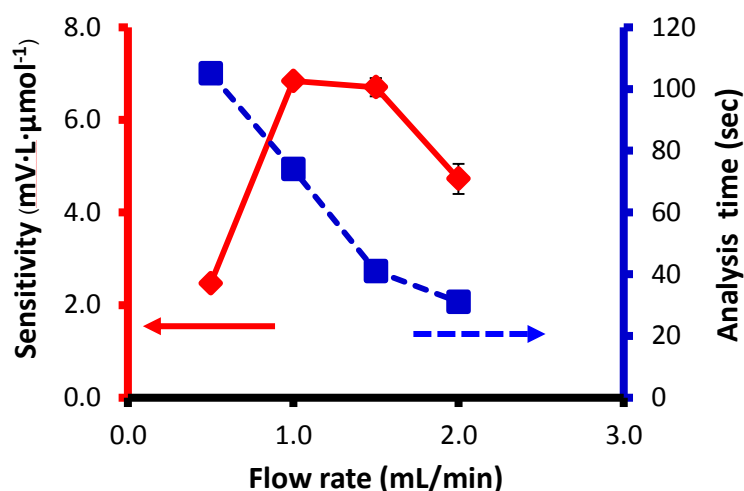


รูปที่ 4.18 กราฟแสดงผลของความยาวของท่อผสมของวิธี ABTS assay

4.3.1.2 ผลของอัตราการไหลเมื่อใช้วิธี ABTS assay

ผลของอัตราการไหลที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของระบบการไหลโพลินเจคชันอะนาไลซิส ทำการศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.5-2.0 mL/min โดยจัดระบบ FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.4 ใช้น้ำเป็นกระแสดำพา และสารละลาย ABTS^{•+} เป็นรีเอเจนต์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่าเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นจาก 0.5 mL/min เป็น 1.0 mL/min ส่งผลให้ความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลเป็น 1.5 และ 2.0 mL/min ความไวในการวิเคราะห์จะลดลง

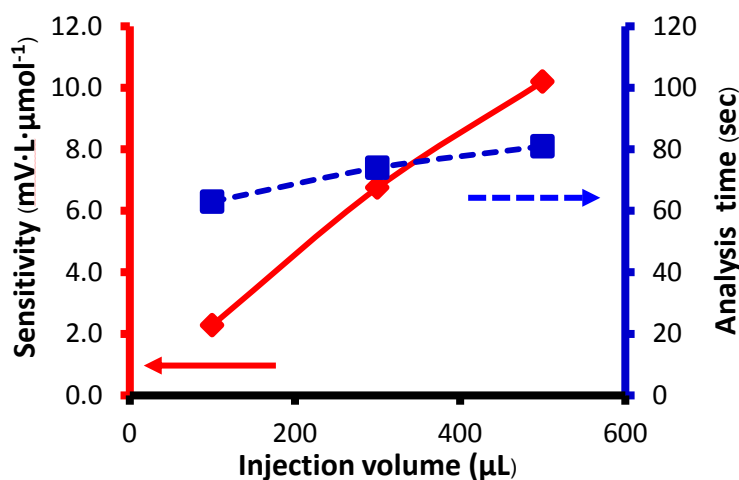
เนื่องจากเมื่อใช้อัตราการไหลมากเกินไปจะทำให้เวลาในการทำปฏิกิริยาของสารลดลง รวมถึงเวลาที่ท่อนโซนของสารผ่านส่วนตรวจวัดก็เร็วเกินไปด้วย ดังนั้นจึงได้เลือกอัตราการไหลของสารที่ 1.0 mL/min เพราะให้ความไวในการวิเคราะห์ที่สูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้น (74 วินาทีต่อตัวอย่าง)



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของวิธี ABTS assay

4.3.1.3 ผลของปริมาตรตัวอย่างเมื่อใช้วิธี ABTS assay

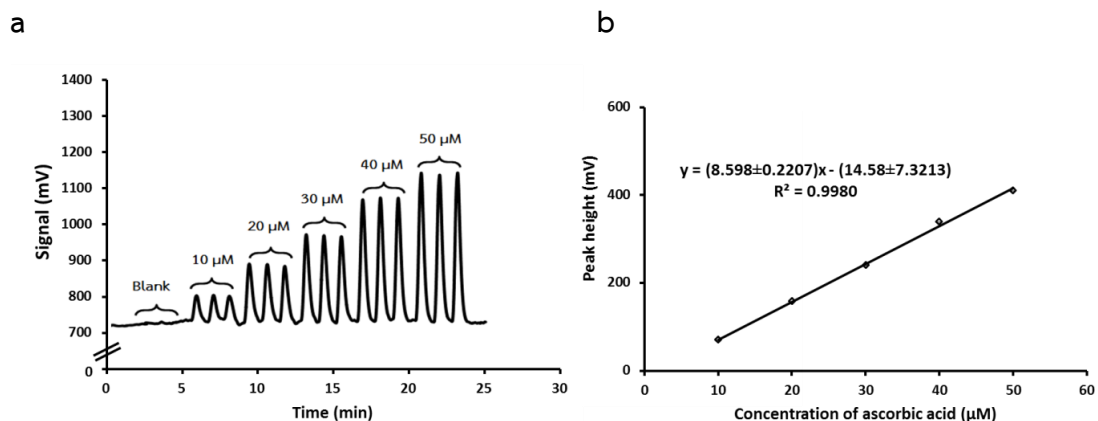
ผลของปริมาตรตัวอย่างที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของระบบการไหลโพลอินเจคชันอะนาลิซิส ทำการศึกษาปริมาตรตัวอย่างในช่วง 100-500 μL โดยจัดระบบการไหล FIA-PEDD เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.3.1.1 และใช้อัตราการไหล 1.0 mL/min ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.20 พบว่าเมื่อปริมาตรสารตัวอย่างมากขึ้น ความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้น เนื่องจากมีปริมาณ analyte เข้าทำปฏิกิริยามากขึ้น โดยที่ปริมาตร 500 μL ให้ผลดีที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ปริมาตรมากขึ้นก็ส่งผลให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมากขึ้นด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 300 μL เนื่องจากให้ความไวในการวิเคราะห์เพียงพอ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 74 วินาทีต่อตัวอย่าง



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงผลของปริมาณตัวอย่างของวิธี ABTS assay

4.3.1.4 คุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธี ABTS assay

เมื่อใช้ระบบ FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.4 โดยใช้น้ำเป็นกระแสตัวพา และสารละลาย ABTS⁺⁺ เป็นรีเอเจนต์ และใช้สภาวะที่เหมาะสมคือหลอด LED-emitter และ LED-detector สีแดง (634 nm) อัตราการไหลของสาร 1.0 ml/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 µL และความยาวของท่อช่วยผสม 200 cm ศึกษาคุณลักษณะการวิเคราะห์ ABTS assay กับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก สัญญาณที่บันทึกได้แสดงในรูปที่ 4.21 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเพิ่มมากขึ้น จะเกิดปฏิกิริยาจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺⁺ มากขึ้น จึงเหลืออนุมูลอิสระ ABTS⁺⁺ น้อยลง ทำให้สีของสารละลาย ABTS⁺⁺ จางลง จึงมีแสงจากหลอด LED-emitter ส่องผ่านไปยังหลอด LED-detector มากขึ้น สัญญาณจึงสูงขึ้นนั่นเอง กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงในรูปที่ 4.21 ได้สมการเส้นตรงคือ $y = (8.598 \pm 0.2207)x - (14.58 \pm 7.3213)$ และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9980 โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก 10-50 µM และค่าความเที่ยง (precision, %RSD) เท่ากับ 2.41 (30 µM, n = 10) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 1.98 µM (3S/N) และระบบนี้มีความเร็วในการวิเคราะห์ดีมาก โดยสามารถทำการวิเคราะห์ได้ถึง 47 ตัวอย่างใน 1 ชั่วโมง ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าระบบการไหล FIA-PEDD ที่พัฒนาขึ้นมานี้มีประสิทธิภาพดีและเหมาะสมกับการใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันในตัวอย่างได้



รูปที่ 4.21 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่างๆ กับสารละลายอนุมูลอิสระ $ABTS^{\cdot+}$ ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD (a) (สภาวะที่ใช้: อัตราการไหลสาร 1.0 mL/min, ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 μ L) และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคกับความสูงของสัญญาณ (b)

ตารางที่ 4.5 คุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธี ABTS assay

Feature	Value
1. Calibration equation	$y = (8.598 \pm 0.2207)x - (14.58 \pm 7.3213)$
2. Sensitivity	8.598
3. Linearity (r^2)	0.9980
4. Linear range (μ M)	10-50
5. Precision (%RSD, 30 μ M, n=10)	2.41
6. LOD (3S/N, μ M)	1.98
7. Analysis time (sec)	74
8. Throughput (samples/h)	47

4.3.1.5 การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันในตัวอย่างด้วยวิธี ABTS

assay

เมื่อได้สถานะที่เหมาะสมแล้วจึงประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยระบบ FIA-PEDD ที่พัฒนาขึ้น แล้วเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีดั้งเดิมแบบ batch ซึ่งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้ของทั้งวิธีโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสและวิธีดั้งเดิมแสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ t -test (paired two sample for means) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่า t_{stat} มีค่าเท่ากับ 2.19 ซึ่งน้อยกว่า $t_{critical}$ ที่มีค่าเท่ากับ 2.36 ดังนั้นผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีจึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.6 ค่า Ascorbic acid equivalent (AAE) ในตัวอย่างน้ำผลไม้ 8 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay ที่ใช้ระบบการไหลโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสร่วมกับส่วนตรวจวัดที่อิตีดี (FIA-PEDD) เปรียบเทียบกับค่า AAE จากวิธีดั้งเดิม (Classical batch method)

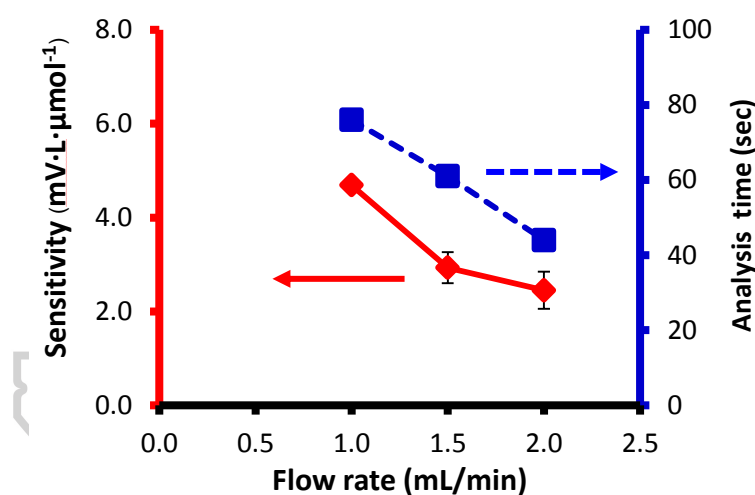
Sample	AAE (mM)	
	FIA-PEDD system	Classical batch method ^a
น้ำผลไม้ 1	0.91±0.06	0.71±0.01
น้ำผลไม้ 2	1.05±0.03	0.96±0.06
น้ำผลไม้ 3	1.26±0.01	1.11±0.01
น้ำผลไม้ 4	1.69±0.06	1.73±0.05
น้ำผลไม้ 5	1.74±0.02	1.87±0.58
น้ำผลไม้ 6	1.83±0.04	1.65±0.06
น้ำผลไม้ 7	2.57±0.03	2.32±0.28
น้ำผลไม้ 8	9.51±0.02	9.43±1.33

^a เตรียมสารละลายตัวอย่างตามภาคผนวก 6

4.3.2 วิธี DPPH assay

4.3.2.1 ผลของอัตราการไหลเมื่อใช้วิธี DPPH assay

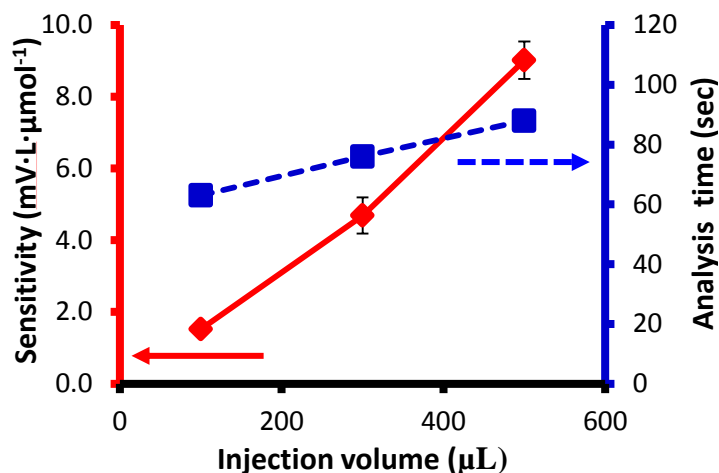
ผลของอัตราการไหลที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของระบบการไหลโพลอินเจคชันอะนาลิซิส ทำการศึกษาปริมาตรอัตราการไหลในช่วง 1.0-2.0 mL/min โดยจัดระบบ FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.4 ใช้เอทานอลเป็นกระแสตัวพา และสารละลาย DPPH เป็นรีเอเจนต์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.22 พบว่าที่อัตราการไหลเป็น 1.0 mL/min ให้ความไวในการวิเคราะห์ที่สูงที่สุด แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลเป็น 1.5 และ 2.0 mL/min ส่งผลให้ความไวในการวิเคราะห์ลดลง เนื่องจากเมื่อใช้อัตราการไหลมากเกินไปจะทำให้เวลาในการทำปฏิกิริยาของสารลดลง รวมถึงเวลาที่ท่อนโซนของสารผ่านส่วนตรวจวัดก็เร็วเกินไปด้วย ดังนั้นจึงได้เลือกอัตราการไหลของสารที่ 1.0 mL/min เพราะให้ความไวในการวิเคราะห์ที่สูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้น (76 วินาทีต่อตัวอย่าง)



รูปที่ 4.22 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของวิธี DPPH assay

4.3.2.2 ผลของปริมาตรตัวอย่างเมื่อใช้วิธี DPPH assay

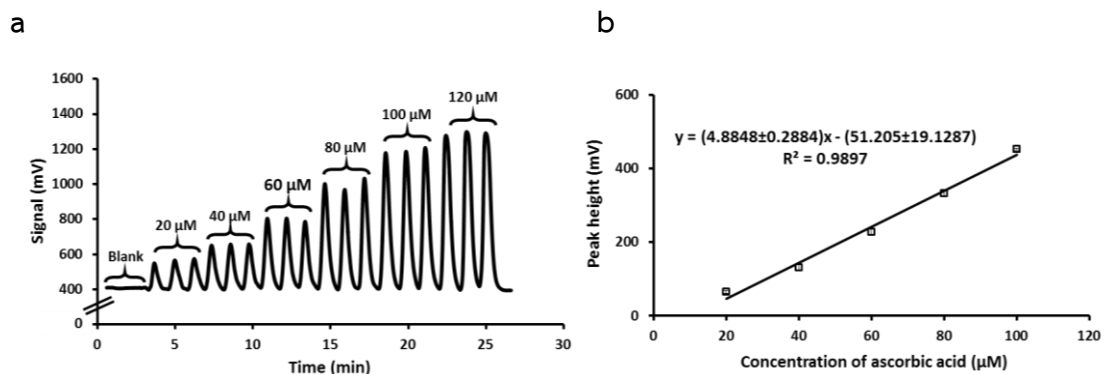
ผลของปริมาตรตัวอย่างที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของระบบการไหลโพลอินเจคชันอะนาลิซิส ทำการศึกษาปริมาตรตัวอย่างในช่วง 100-500 μL โดยจัดระบบการไหล FIA-PEDD เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.3.2.1 และใช้อัตราการไหล 1.0 mL/min ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.23 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรสารตัวอย่างมากขึ้น ความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้น โดยที่ปริมาตร 500 μL ให้ผลดีที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ปริมาตรมากขึ้นก็ส่งผลให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมากขึ้นด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 300 μL เนื่องจากให้ความไวในการวิเคราะห์เพียงพอ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 76 วินาทีต่อตัวอย่าง



รูปที่ 4.23 กราฟแสดงผลของปริมาณตัวอย่างของวิธี DPPH assay

4.3.2.3 คุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธี DPPH assay

เมื่อใช้ระบบ FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.4 และใช้สภาวะที่เหมาะสมคือหลอด LED-emitter และ LED-detector สีแดง (634 nm) อัตราการไหลของสาร 1.0 ml/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 µL และความยาวของท่อช่วยผสม 200 cm ศึกษาคุณลักษณะการวิเคราะห์ DPPH assay กับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก สัญญาณที่บันทึกได้แสดงในรูปที่ 4.24 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเพิ่มมากขึ้น จะเกิดปฏิกิริยাজับอนุมูลอิสระ DPPH มากขึ้น จึงเหลืออนุมูลอิสระ DPPH น้อยลง ทำให้สีของสารละลาย DPPH จางลง จึงมีแสงจากหลอด LED-emitter ส่องผ่านไปยังหลอด LED-detector มากขึ้น สัญญาณจึงสูงขึ้นนั่นเอง กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงในรูปที่ 4.24 ได้สมการเส้นตรงคือ $y = (4.8848 \pm 0.2884)x - (51.205 \pm 19.1287)$ และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9897 โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก 20-100 µM และค่าความเที่ยง (precision, %RSD) เท่ากับ 5.00 (40 µM, n = 10) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 10.49 µM (3S/N) และระบบนี้มีความเร็วในการวิเคราะห์ดีมาก โดยสามารถทำการวิเคราะห์ได้ถึง 47 ตัวอย่างใน 1 ชั่วโมง ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าระบบการไหล FIA-PEDD ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้ใช้วิธี DPPH assay ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง เนื่องจากพบว่าบางตัวอย่างเมื่อเตรียมในเอทานอลแล้วมีการตกตะกอน และการใช้เอทานอลในระบบการไหล FIA นั้นยังต้องใช้ท่อและอุปกรณ์ที่เฉพาะอีกด้วย



รูปที่ 4.24 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่างๆ กับสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH[•] ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD (a) (สภาวะที่ใช้: อัตราการไหลสาร 1.0 mL/min, ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 μL) และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคกับความสูงของสัญญาณ (b)

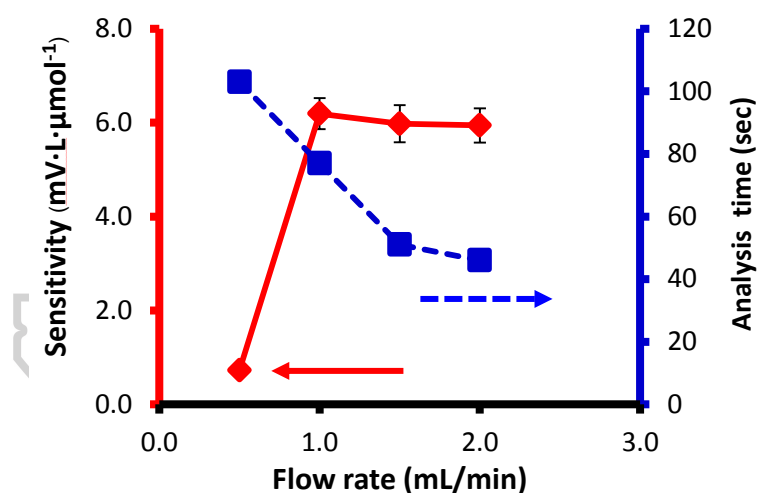
ตารางที่ 4.7 คุณลักษณะของวิธี DPPH assay

Feature	Value
1. Calibration equation	$y = (4.8848 \pm 0.2884)x - (51.205 \pm 19.1287)$
2. Sensitivity	4.8848
3. Linearity (r^2)	0.9897
4. Linear range (μM)	20-100
5. Precision (%RSD, 40 μM, n=10)	5.00
6. LOD (3S/N, μM)	10.49
7. Analysis time (sec)	76
8. Throughput (samples/h)	47

4.3.3 วิธี FRAP assay

4.3.3.1 ผลของอัตราการไหลเมื่อใช้วิธี FRAP assay

ผลของอัตราการไหลที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของระบบการไหลโพลอินเจคชันอะนาลิซิส ทำการศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.5-2.0 mL/min โดยจัดระบบ FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.4 ใช้น้ำเป็นกระแสตัวพา และสารละลาย FRAP เป็นรีเอเจนต์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.25 แสดงให้เห็นว่าเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นจาก 0.5 mL/min เป็น 1.0 mL/min ส่งผลให้ความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเนื่องจากที่อัตราการไหล 1.0 mL/min ท่อนโซนที่ตรวจวัดมีการกระจายตัว (dispersion) และเกิดการยืดยาวของท่อนโซน (elongation) น้อย เมื่อเทียบกับที่อัตราการไหล 0.5 mL/min แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลเป็น 1.5 และ 2.0 mL/min ความไวในการวิเคราะห์มีค่าไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ความแม่นยำในการวิเคราะห์ลดลงเล็กน้อยพิจารณาจากแถบความคลาดเคลื่อนที่กว้างขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหล 1.0 mL/min ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

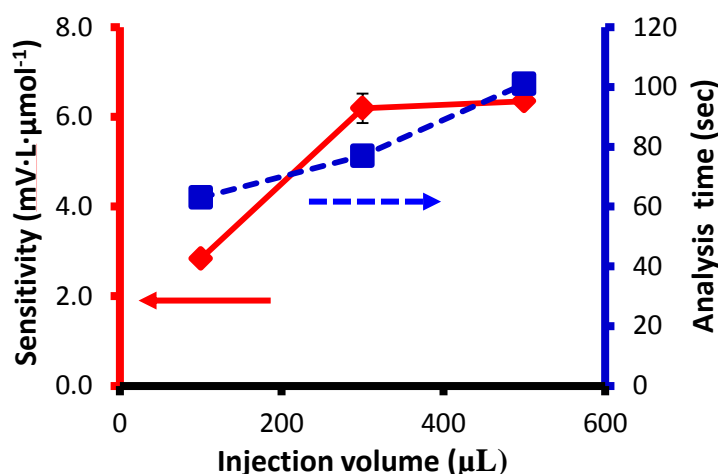


รูปที่ 4.25 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของวิธี FRAP assay

4.3.3.2 ผลของปริมาตรตัวอย่างเมื่อใช้วิธี FRAP assay

ผลของปริมาตรตัวอย่างที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของระบบการไหลโพลอินเจคชันอะนาลิซิส ทำการศึกษาปริมาตรตัวอย่างในช่วง 100-500 μL โดยจัดระบบการไหล FIA-PEDD เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.3.2.1 และใช้อัตราการไหล 1.0 mL/min ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.26 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรสารตัวอย่างจาก 100 μL เป็น 300 μL ความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรสารตัวอย่างจาก 300 μL เป็น 500 μL พบว่าความไวในการวิเคราะห์ไม่ต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ปริมาตรมากขึ้นก็ส่งผลให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมากขึ้นด้วยเช่นกัน

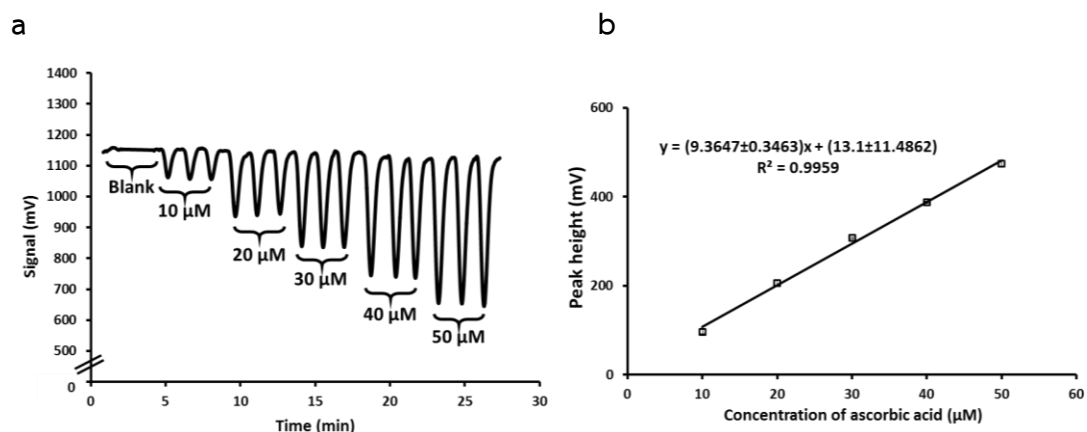
ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 300 μL เนื่องจากให้ความไวในการวิเคราะห์เพียงพอ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 76 วินาทีต่อตัวอย่าง



รูปที่ 4.26 กราฟแสดงผลของปริมาตรตัวอย่างของวิธี FRAP assay

4.3.3.3 คุณสมบัติการวิเคราะห์ของวิธี FRAP assay

เมื่อใช้ระบบ FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.4 และใช้สภาวะที่เหมาะสมคือหลอด LED-emitter และ LED-detector สีแดง (634 nm) อัตราการไหลของสาร 1.0 ml/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 μL และความยาวของท่อช่วยผสม 200 cm ศึกษาคุณสมบัติการวิเคราะห์ FRAP assay กับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก สัญญาณที่บันทึกได้แสดงในรูปที่ 4.27 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเพิ่มมากขึ้น จะเกิดการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ มากขึ้น ทำให้สีของสารละลายเข้มขึ้น จึงมีแสงจากหลอด LED-emitter ส่องผ่านไปยังหลอด LED-detector น้อยลง สัญญาณจึงต่ำลงนั่นเอง กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงในรูปที่ 4.27 ได้สมการเส้นตรงคือ $y = (9.3647 \pm 0.3463)x + (13.1 \pm 11.4862)$ และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9959 โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก 10-50 μM และค่าความเที่ยง (precision, %RSD) เท่ากับ 2.15 (40 μM , $n = 10$) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 1.39 μM (3S/N) และระบบนี้มีความเร็วในการวิเคราะห์ดีมาก โดยสามารถทำการวิเคราะห์ได้ถึง 47 ตัวอย่างใน 1 ชั่วโมง ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าระบบการไหล FIA-PEDD ที่พัฒนาขึ้นมานี้มีประสิทธิภาพดีและเหมาะกับการใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันในตัวอย่าง



รูปที่ 4.27 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่างๆ กับสารละลาย FRAP reagent ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD (a) (สภาวะที่ใช้: อัตราการไหลสาร 1.0 mL/min, ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 μL) และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับความสูงของสัญญาณ (b)

ตารางที่ 4.8 คุณลักษณะของวิธี FRAP assay

Feature	Value
1. Calibration equation	$y = (9.3647 \pm 0.3463)x + (13.1 \pm 11.4862)$
2. Sensitivity	9.3647
3. Linearity (r^2)	0.9959
4. Linear range (μM)	10-50
5. Precision(%RSD, 30 μM, n=10)	2.15
6. LOD (3S/N, μM)	1.40
7. Analysis time (sec)	77
8. Throughput (samples/h)	47

4.3.3.4 การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันในตัวอย่างด้วยวิธี FRAP

assay

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยระบบที่พัฒนาขึ้น แล้วเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีดั้งเดิมแบบ batch ซึ่งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรของทั้งวิธีโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสและวิธีดั้งเดิมแสดงดังตารางที่ 4.9 พบว่าทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ *t*-test (paired two sample for means) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่า t_{stat} มีค่าเท่ากับ 0.93 ซึ่งน้อยกว่า $t_{critical}$ ที่มีค่าเท่ากับ 2.26 ดังนั้นผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีนี้จึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ

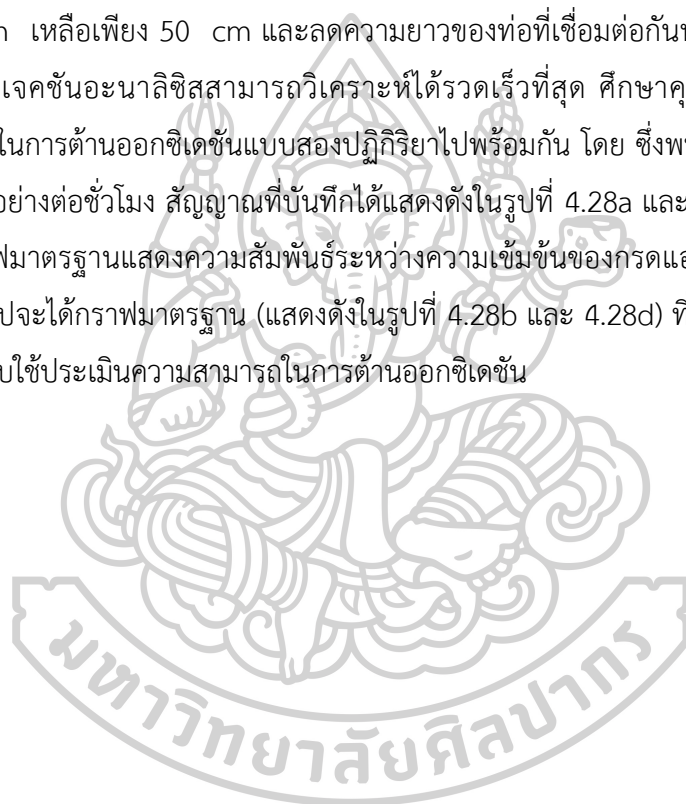
ตารางที่ 4.9 ค่า Ascorbic acid equivalent (AAE) ในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพร 10 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay ที่ใช้ระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสร่วมกับส่วนตรวจวัดฟลูออโรเมตริก (FIA-PEDD) เปรียบเทียบกับค่า AAE จากวิธีดั้งเดิม (Classical batch method)

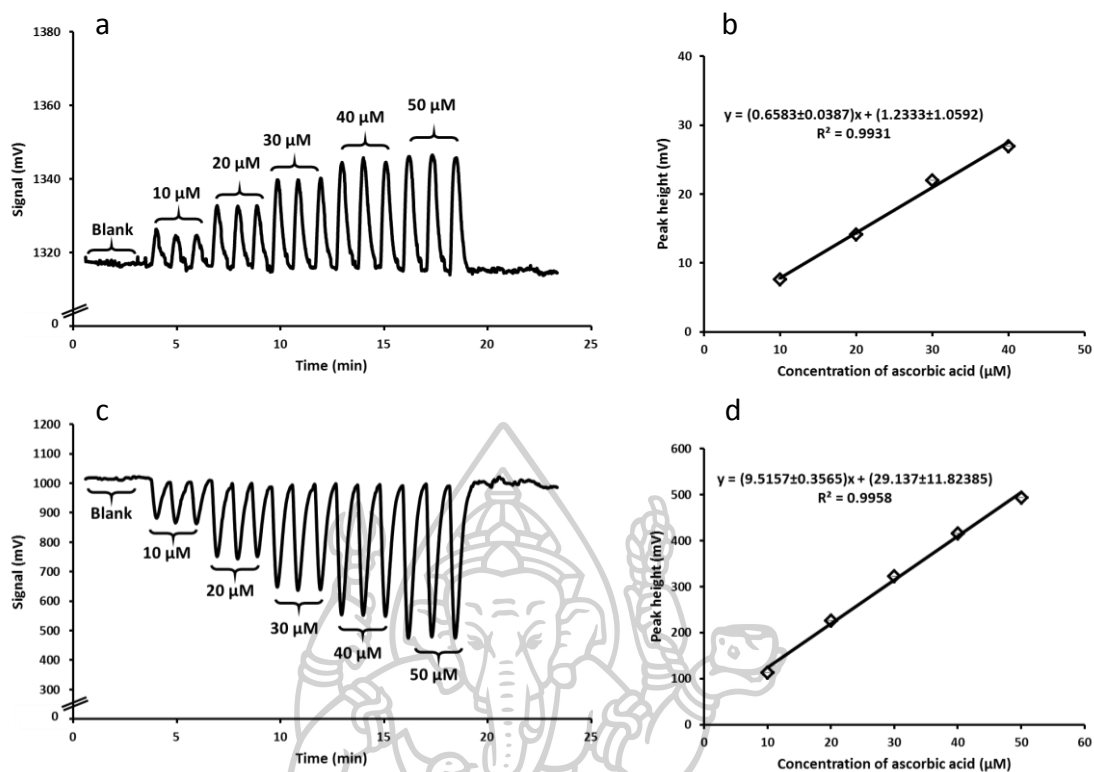
Sample	AAE (mg/g sample)	
	FIA-PEDD system	Classical batch method ^a
ชา 1	0.68±0.42	0.55±0.01
ชา 2	0.39±0.08	0.59±0.07
ชา 3	3.46±0.14	3.13 ±0.17
ชา 4	2.75±0.38	3.66±0.14
ชา 5	3.02±0.53	4.71±0.14
ชา 6	32.45±0.31	36.64±1.76
ชา 7	55.40±0.64	53.79±2.96
ชา 8	66.82±0.50	70.57±4.19
ชา 9	73.42 ±0.12	71.62±6.81
ชา 10	100.80±0.13	99.99±24.25

^a เตรียมสารละลายตัวอย่างตามภาคผนวก 7

4.4 การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยระบบ FIA-PEDD แบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน

สำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกันโดยเลือกวิธี ABTS assay และ FRAP assay เนื่องจากรีเอเจนท์ที่ใช้สามารถเตรียมได้ใน aqueous solution และสามารถใส่สารตัวพาเป็นน้ำร่วมกันได้ ออกแบบการทดลองโดยจัดระบบการไหล FIA-PEDD ดังรูปที่ 3.6 และใช้สภาวะที่เหมาะสมคือหลอด LED-emitter และ LED-detector สีแดง อัตราการไหลของสาร 1.0 ml/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 μ L ความยาวของท่อช่วยผสมลดลงจาก 200 cm เหลือเพียง 50 cm และลดความยาวของท่อที่เชื่อมต่อกันทุกท่อให้สั้นที่สุด เพื่อให้ระบบโพลินเจคชันอะนาลิซิสสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วที่สุด ศึกษาคุณลักษณะการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน โดย ซึ่งพบว่าสามารถวิเคราะห์ได้เร็วถึง 90 ตัวอย่างต่อชั่วโมง สัญญาณที่บันทึกได้แสดงดังในรูปที่ 4.28a และ 4.28c นำสัญญาณที่ได้ไปพล็อตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปจะได้กราฟมาตรฐาน (แสดงดังในรูปที่ 4.28b และ 4.28d) ที่มีค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีเหมาะสำหรับใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน





รูปที่ 4.28 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดด้วยระบบการไหล FIA-PEDD ของวิธี ABTS assay (a) และ FRAP assay (c) และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับความสูงของสัญญาณของวิธี ABTS assay (b) และ FRAP assay (d)

ตารางที่ 4.10 คุณลักษณะในการวิเคราะห์ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD แบบสองปฏิกิริยาไปพร้อมกัน

Analytical feature	ABTS assay	FRAP assay
Equation	$y = (0.6583 \pm 0.0387)x + (1.2333 \pm 1.0592)$	$y = (9.5157 \pm 0.3565)x + (29.137 \pm 11.8239)$
Sensitivity	0.6583	9.5157
Linearity (r^2)	0.9931	0.9958
Linear range	10–40 μM	10–50 μM
LOD (3S/N)	2.00 μM	1.40 μM
Analysis time (sec)	40	
Throughput (samples/h)	90	

4.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมของตัวอย่าง โดยระบบที่พัฒนาขึ้นกับวิธีดั้งเดิม (classical method)

ผลการทดลองการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้ง 18 ตัวอย่างของทั้งวิธีโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสและวิธีดั้งเดิมแสดงดังตารางที่ 4.11 พบว่าทั้งสองวิธีมีค่า AAE ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ t -test (paired two sample for means) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่า t_{stat} มีค่าเท่ากับ 0.75 และ 0.49 ซึ่งน้อยกว่า t_{critical} ที่มีค่าเท่ากับ 2.11 สำหรับวิธี ABTS assay และ FRAP assay ตามลำดับ ดังนั้นผลการวิเคราะห์จากระบบ dual assay ที่พัฒนาขึ้นนี้ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Miller & Miller, 2018) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมทั้งวิธี ABTS และวิธี FRAP จากนั้นนำผลที่วิเคราะห์ได้จากระบบ FIA - PEDD ที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบด้วยวิธีทางสถิติสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้พิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง TAC ที่วิเคราะห์ได้จากวิธี ABTS และ TAC ที่วิเคราะห์ได้จากวิธี FRAP จากผลการทดสอบพบว่าผลที่วิเคราะห์ได้จากวิธี ABTS assay และวิธี FRAP assay มีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ที่ดี ($r^2 = 0.934$) (รูป 4.29) นอกจากนี้ยังได้ทดสอบสหสัมพันธ์เชิงอันดับของสเปียร์แมน (Spearman's rank correlation) ซึ่งเป็นวิธีทางสถิติที่ใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างการจัดอันดับของผลที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีว่ามีการจัดอันดับที่สอดคล้องกันหรือไม่ ซึ่งผลการทดสอบทางสถิติพบว่าทั้งสองวิธีนี้ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ที่ดี ($r^2 = 0.927$) เช่นกัน (รูป 4.30) (Mukaka, 2012)

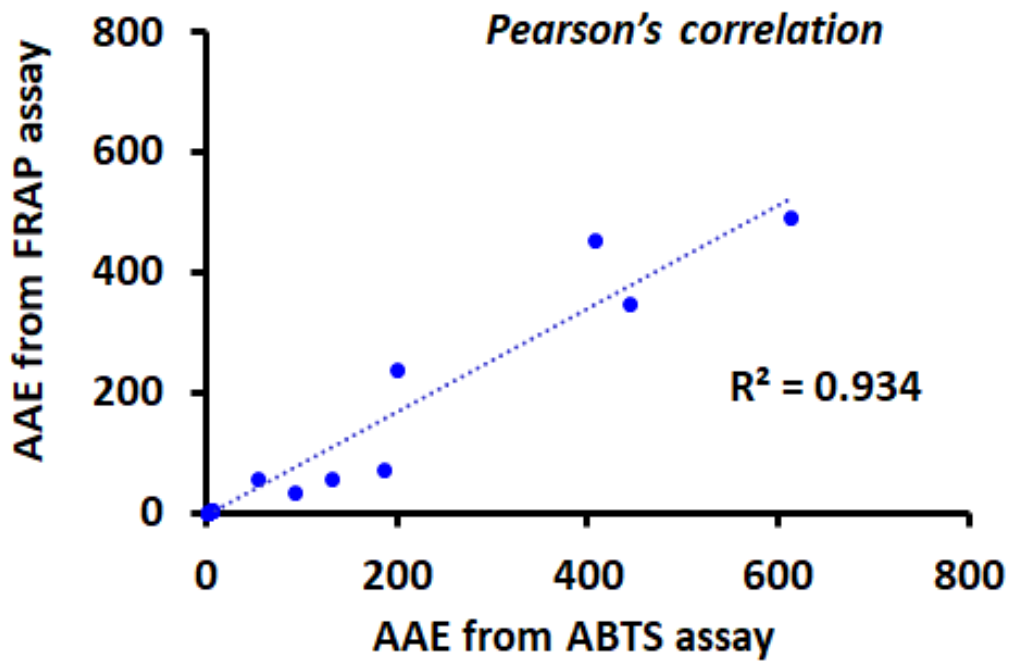
จากการทดสอบด้วยวิธีทางสถิติเหล่านี้ยืนยันได้ว่าผลที่วิเคราะห์ได้มีความน่าเชื่อถือ และวิธีการไหล FIA-PEDD ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมแบบสองวิธีพร้อมกันได้ ซึ่งให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.11 ค่า Ascorbic acid equivalent (AAE) ในตัวอย่าง 18 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยระบบการไหล FIA-PEDD ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดฟลูออโรมิเตอร์แบบสองปฏิกิริยาพร้อมกัน เปรียบเทียบกับ AAE จากวิธีดั้งเดิม (Classical batch method)

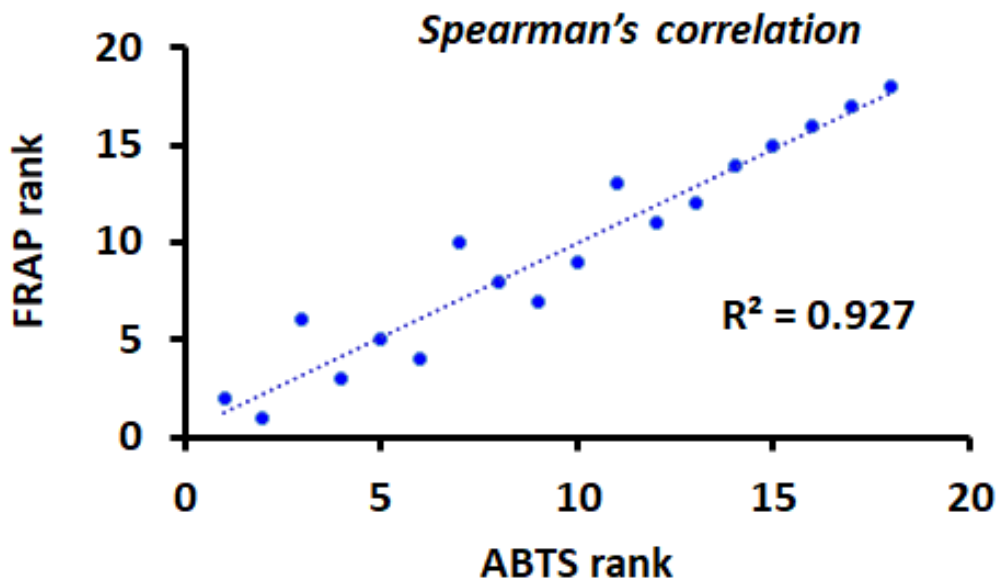
Sample	ABTS assay		FRAP assay	
	Classical batch method ^a	FIA-PEDD system	Classical batch method ^b	FIA-PEDD system
น้ำผลไม้ 1	0.63±0.04	0.47±0.77	0.46±0.01	0.20±0.47
น้ำผลไม้ 2	0.77±0.02	1.17±0.29	0.79±0.02	2.30±0.12
น้ำผลไม้ 3	0.85±0.02	1.48±0.59	1.83±0.06	0.90±0.37
น้ำผลไม้ 4	1.99±0.36	1.92±0.67	1.58 ±0.04	1.32±0.29
ชา 1	0.53±0.02	0.59±0.09	0.18±0.03	0.09±0.16
ชา 2	3.37±0.07	2.68±0.13	2.48±0.14	1.08±0.37
ชา 3	6.65±0.11	5.20±0.05	3.13±0.17	3.46±0.14
ชา 4	8.64±0.31	6.44±0.37	4.71±0.14	3.02±0.53
ชา 5	129.98±4.80	92.66±0.45	36.64±1.76	32.45±0.31
ชา 6	180.13±4.90	131.77±0.46	53.79±2.96	55.40±0.64
ชา 7	246.86±7.87	187.25±0.28	71.62±6.81	73.42±0.12
วิตามินซี 1	5.99±0.01	6.73±0.08	5.00±0.11	4.19±0.08
วิตามินซี 2	6.16±0.15	4.28±0.37	3.81±0.05	4.35±0.82
วิตามินซี 3	50.21±0.40	52.92±0.87	41.71±0.21	57.24±0.51
วิตามินซี 4	249.28±1.27	200.22±0.14	286.06±5.11	239.82±0.17
วิตามินซี 5	392.21±0.81	406.94±0.21	341.31±14.51	453.95±0.31
วิตามินซี 6	421.04±4.64	443.34±0.74	482.74±33.70	348.09±0.24
วิตามินซี 7	545.51±3.45	612.51±0.05	304.55±3.29	491.63±0.17

^a เตรียมสารละลายตัวอย่างตามภาคผนวก 8

^b เตรียมสารละลายตัวอย่างตามภาคผนวก 9



รูปที่ 4.29 กราฟแสดงสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน

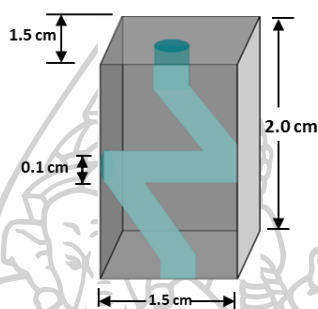


รูปที่ 4.30 กราฟแสดงสหสัมพันธ์แบบเชิงอันดับของสเปียร์แมน

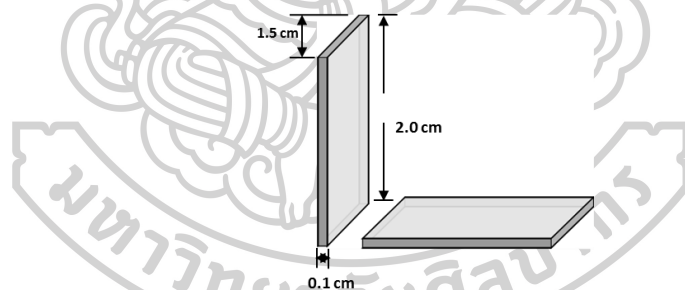
4.6 การสร้างและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ flow cell ร่วมกับระบบ FIA-PEDD

เนื่องจาก Commercial flow-through cell ที่ใช้มีราคาแพง ผู้วิจัยจึงได้ประดิษฐ์ in-house flow-through cell ขึ้นเพื่อลดค่าใช้จ่าย การประดิษฐ์ flow cell สามารถทำได้โดยเตรียมอุปกรณ์ดังนี้

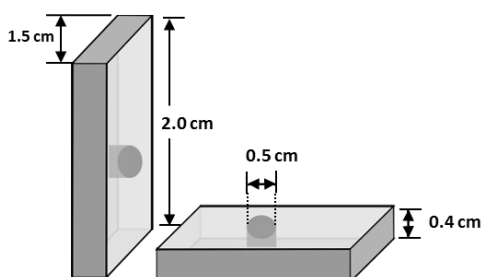
- A) แผ่นอะคริลิกทรงสี่เหลี่ยมพื้นผ้าที่มีความกว้าง 1.5 cm ความยาว 2.0 cm ความหนา 1.5 cm จำนวน 1 แผ่น เจาะช่องทางไหลของสารละลายเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm



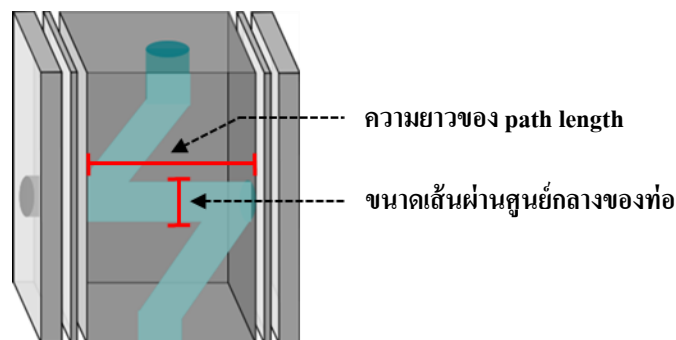
- B) แผ่นอะคริลิกทรงสี่เหลี่ยมพื้นผ้าขนาด ความกว้าง 1.5 cm. ความยาว 2.0 cm. ความหนา 0.1 cm. จำนวน 2 แผ่นเพื่อใช้เป็น window ให้แสงส่องผ่าน



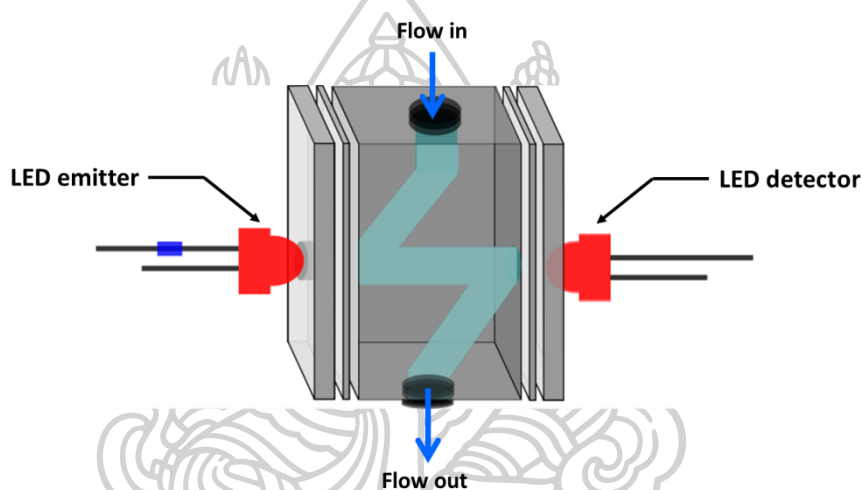
- C) แผ่นอะคริลิกทรงสี่เหลี่ยมพื้นผ้าขนาด ความกว้าง 1.5 cm. ความยาว 2.0 cm. ความหนา 0.4 cm. จำนวน 2 แผ่นเจาะรูตรงกลางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm เพื่อใช้ยึดหลอด LED ทั้งสองหลอด



นำแผ่นอะคริลิกทั้ง 3 แบบมาประกอบกันโดยเชื่อมด้วยกาว Epoxy โดยระวังอย่าให้กาวอุดตันช่องทางไหลของสาร



ประกอบท่อ, Flgls Nut , Flangeless Ferrule และตัว Flow cell เข้าด้วยกัน



นำ flow cell ที่ประดิษฐ์ได้มาต่อกับระบบการไหล FIA-PEDD แล้วศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ flow cell เช่น ความยาวของ path length, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อ และชนิดของอะคริลิก ทำการทดลองโดยใช้สารละลายน้ำสีฟ้าที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยไหลสารละลายเข้าสู่ flow cell แล้วอ่านค่าสัญญาณที่ได้โดย PEDD detector ใช้หลอด LED สีแดง แล้วนำไปพล็อตกราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกับสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไป ผลการทดลองการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ flow cell คือ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของ flow cell คือ ใช้อะคริลิกแบบใส ความยาวของ path length มีขนาดเท่ากับ 1.00 cm และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อ 0.10 cm

ตารางที่ 4.12 ผลของความยาวของ path length

ความยาวของ path length	สมการเส้นตรง	ความเป็นเส้นตรง (r^2)
1.00 cm	$y = -2.795x + 1.3971$	0.9830
2.00 cm	$y = -0.7817x + 1.3$	0.9965

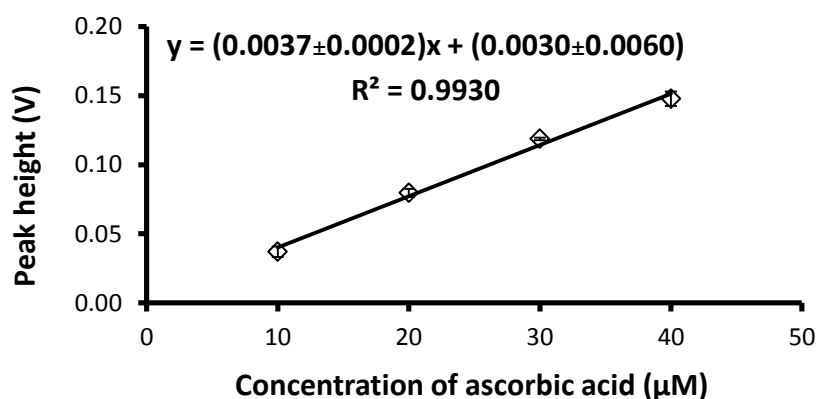
ตารางที่ 4.13 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อ

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อ	สมการเส้นตรง	ความเป็นเส้นตรง (r^2)
0.10 cm	$y = -2.795x + 1.3971$	0.9830
0.30 cm	$y = -0.728x + 1.4626$	0.9965

ตารางที่ 4.14 ผลของชนิดของอะคริลิก

ชนิดของอะคริลิก	สมการเส้นตรง	ความเป็นเส้นตรง (r^2)
แบบใส	$y = -2.795x + 1.3971$	0.9830
แบบทึบ	$y = -0.5807x + 1.3536$	0.9933

จากนั้นศึกษาความเป็นไปได้ของการนำ flow cell มาใช้งานสำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของระบบ FIA-PEDD โดยเลือกใช้วิธี ABTS assay จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปดังแสดงในรูปที่ 4.31 จะเห็นได้จากสัญญาณที่ได้มีลักษณะที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และมีความเป็นเส้นตรงดี แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการทำซ้ำหรือ precision ของการทดลองไม่ดีนัก เนื่องจากผู้วิจัยไม่สามารถควบคุมคุณภาพการผลิต flow cell แต่ละชิ้นงานได้ จึงส่งผลต่อ stray light ที่อาจรบกวนสัญญาณที่วิเคราะห์



รูปที่ 4.31 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับความสูงของสัญญาณ

4.7 การสร้างเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพา

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อทดสอบการใช้งานของเครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพาที่ประดิษฐ์ขึ้นกับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของวิธี ABTS assay, DPPH assay และ FRAP assay และทำการศึกษาอายุการใช้งาน



รูปที่ 4.32 เครื่องต้นแบบคัลเลอริมิเตอร์แบบพกพาที่ประดิษฐ์ขึ้นในงานวิจัยนี้

4.7.1 ทดสอบการใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

ผลการทดลองนำเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่ประดิษฐ์ขึ้นมาใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของวิธี ABTS assay, DPPH assay และ FRAP assay แสดงดังตาราง 4.15, 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่ประดิษฐ์ขึ้นมาทำให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการศึกษาสีหลอดแอลอีดีสำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันในระบบ FIA-PEDD ในหัวข้อที่ 3.6.2.2 พบว่าในวิธี ABTS assay นั้นหลอดแอลอีดีสีฟ้าให้ค่าความไวในการวิเคราะห์ที่สูงที่สุด ส่วนวิธี DPPH assay หลอดแอลอีดีสีแดงจะให้ค่าความไวในการวิเคราะห์ที่สูงที่สุด และสำหรับวิธี FRAP assay หลอดแอลอีดีสีแดงจะให้ค่าความไวในการวิเคราะห์ที่สูงที่สุดเช่นกัน ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้กล่าวมานั้นสอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.2 แสดงให้เห็นว่าเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่ประดิษฐ์ขึ้นมาสามารถใช้งานได้

ตารางที่ 4.15 ผลการทดสอบการใช้งานเครื่องคัดเลอริมิเตอร์ด้วยวิธี ABTS assay เมื่อใช้แอลกอฮอล์สีต่างๆ

สีของแสงของหลอดแอลกอฮอล์	สมการเส้นตรง	r^2	ช่วงความเป็นเส้นตรง
ฟ้า (463 nm)	$y = 0.0134x + 0.7881$	$r^2 = 0.9737$	2.5-12.5 μM
เขียว (520 nm)	$y = 0.0021x + 0.1505$	$r^2 = 0.8679$	2.5-12.5 μM
เหลือง (567 nm)	$y = 0.0040x + 0.0600$	$r^2 = 1$	2.5-12.5 μM
แดง (634 nm)	$y = 0.0086x + 0.0881$	$r^2 = 0.9941$	2.5-12.5 μM

ตารางที่ 4.16 ผลการทดสอบการใช้งานเครื่องคัดเลอริมิเตอร์ด้วยวิธี DPPH assay เมื่อใช้แอลกอฮอล์สีต่างๆ

สีของแสงของหลอดแอลกอฮอล์	สมการเส้นตรง	r^2	ช่วงความเป็นเส้นตรง
ฟ้า (463 nm)	$y = 1.500x + 0.0125$	$r^2 = 0.9890$	0.05-0.09 μM
เขียว (520 nm)	- ^a	- ^a	- ^a
เหลือง (567 nm)	$y = 1.6857x - 0.0966$	$r^2 = 0.9295$	0.06-0.10 μM
แดง (634 nm)	$y = 2.200x - 0.0615$	$r^2 = 0.9928$	0.05-0.09 μM

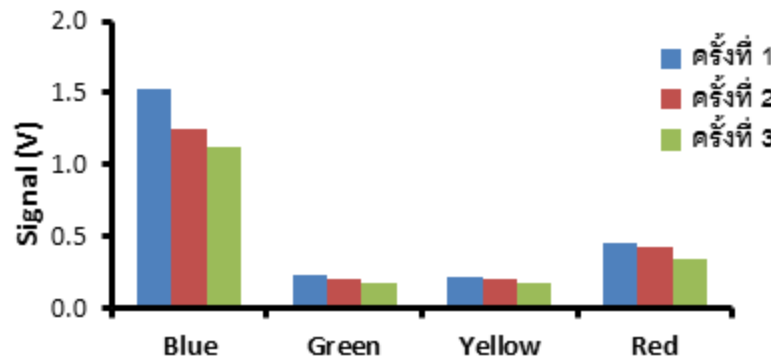
^a - หมายถึง ไม่สามารถอ่านสัญญาณได้ เนื่องจากเป็นค่าติดลบ

ตารางที่ 4.17 ผลการทดสอบการใช้งานเครื่องคัดเลอริมิเตอร์ด้วยวิธี FRAP assay เมื่อใช้แอลกอฮอล์สีต่างๆ

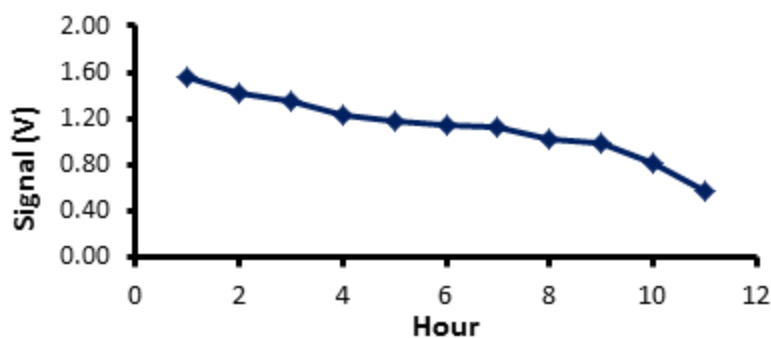
สีของแสงของหลอดแอลกอฮอล์	สมการเส้นตรง	r^2	ช่วงความเป็นเส้นตรง
ฟ้า (463 nm)	$y = -0.0158x + 1.1686$	$r^2 = 0.9857$	2.5-12.5 μM
เขียว (520 nm)	$y = -0.0071x + 0.1610$	$r^2 = 0.9578$	2.5-12.5 μM
เหลือง (567 nm)	$y = -0.0089x + 0.1124$	$r^2 = 0.9729$	2.5-12.5 μM
แดง (634 nm)	$y = -0.0143x + 0.2976$	$r^2 = 0.9505$	2.5-12.5 μM

4.7.2 ศึกษาอายุการใช้งาน

ศึกษาอายุการใช้งานของเครื่องต้นแบบคัลเลอร์มิเตอร์แบบพกพาที่ประดิษฐ์ ต่อการใช้งานทำการทดลองโดยเปิดใช้งานอย่างต่อเนื่องครั้งละ 3 ชั่วโมง แล้วบันทึกสัญญาณของอากาศที่อ่านได้โดยสัญญาณเริ่มต้นแสดงดังกราฟแท่งสีฟ้า เมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมงแสดงสัญญาณดังกราฟแท่งสีแดง และเมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมงแสดงสัญญาณดังกราฟแท่งสีเขียว ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.33 พบว่าค่าสัญญาณที่อ่านได้ลดลงหลังจากการใช้งานทุก 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ทำการทดลองใช้งานอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยบันทึกสัญญาณที่อ่านได้ในทุกๆ ชั่วโมง ในกรณีนี้จะเลือกอ่านค่าสัญญาณของหลอดแอลอีดีสีฟ้า ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.34 พบว่าความเสถียรของเครื่องคัลเลอร์มิเตอร์นี้ยังไม่ดีพอสำหรับทำการทดลองต่อเนื่องเป็นเวลานาน



รูปที่ 4.33 สัญญาณที่วัดได้จากเครื่องต้นแบบคัลเลอร์มิเตอร์เมื่อใช้งานครั้งละ 3 ชั่วโมง



รูปที่ 4.34 สัญญาณที่วัดได้จากเครื่องต้นแบบคัลเลอร์มิเตอร์เมื่อใช้งานต่อเนื่อง 12 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง (Conclusions)

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธีการผลิตอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} โดยอาศัยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคือ ให้กระแสไฟฟ้าตกคร่อมขั้วไฟฟ้าทั้งสองขั้วที่ความเข้มข้น 2 mA เป็นเวลา 10 นาทีโดยใช้สารละลายตั้งต้น ABTS ที่ความเข้มข้น 0.4 mM และสารละลาย Zinc acetate ที่เข้มข้นเป็น supporting electrolyte ทำให้ได้สารละลาย ABTS^{•+} ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm มีค่าประมาณ 0.7 ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปเป็นรีเอเจนต์สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS assay ข้อดีของวิธีการผลิตอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} โดยอาศัยวิธีทางเคมีไฟฟ้า คือ ลดการใช้เวลาในการเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ลดการใช้สารเคมีประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และสามารถนำไปใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้จริง มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีผลิต ABTS^{•+}

การสร้างและพัฒนาเซลล์เรอิมิตเตอร์โดยอาศัยหลักการฟิสิกส์เพื่อใช้ทดแทนเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีราคาแพง สามารถนำเซลล์เรอิมิตเตอร์นี้ไปใช้เป็นส่วนตรวจวัดของระบบวิเคราะห์การไหล FIA เพื่อให้การวิเคราะห์เป็นอัตโนมัติมากขึ้น ใช้ปริมาณรีเอเจนต์น้อยลง แม้ความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) จะน้อยกว่าเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แต่ยังคงเพียงพอสำหรับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

มีการนำระบบ FIA-PEDD ที่พัฒนาขึ้นนี้มาประยุกต์ใช้สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมในตัวอย่งน้ำผลไม้ วิตามินซี และเครื่องดื่มสมุนไพรที่มีขายตามท้องตลาด ซึ่งสามารถประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ให้ผลการวิเคราะห์มากกว่าหนึ่งวิธีในเวลาเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบผลที่วิเคราะห์ได้กับการทดลองแบบดั้งเดิมด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์พบว่าผลที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อดีของงานวิจัยนี้คือสามารถประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้อย่างรวดเร็วโดยได้ข้อมูลของการวิเคราะห์ตัวอย่างครบถ้วน ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกลงทั้งราคาสารเคมีและราคาอุปกรณ์ตรวจวัด

ในส่วนของเครื่องเซลล์เรอิมิตเตอร์แบบพกพานั้น ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าสามารถใช้งานเพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS วิธี DPPH และวิธี FRAP ได้ แต่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเรื่องความเสถียรของอุปกรณ์ที่ใช้ เช่น ความเสถียรของถ่านไฟฉายซึ่งใช้เป็นแหล่งจ่ายไฟให้กับอุปกรณ์ทั้งหมด หรือความต้านทานภายในของโวลต์มิเตอร์อาจยังไม่เพียงพอ เป็นต้น

รายการอ้างอิง

- Alonso, Á. M., Domínguez, C., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2002). Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3112-3115.
- Alonso, Á. M., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2003). Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *European Food Research and Technology*, 216(5), 445-448.
- Arts, M. J., Dallinga, J. S., Voss, H.-P., Haenen, G. R., & Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88(4), 567-570.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Benzie, I. F., & Szeto, Y. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(2), 633-636.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M., & Arnao, M. B. (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 9(4), 196-202.
- Chan-Eam, S., Teerasong, S., Damwan, K., Nacapricha, D., & Chaisuksant, R. (2011). Sequential injection analysis with electrochemical detection as a tool for economic and rapid evaluation of total antioxidant capacity. *Talanta*, 84(5), 1350-1354.
- de Vargas-Sansalvador, I. P., Fay, C., Phelan, T., Fernandez-Ramos, M., Capitan-Vallvey, L., Diamond, D., & Benito-Lopez, F. (2011). A new light emitting diode-light

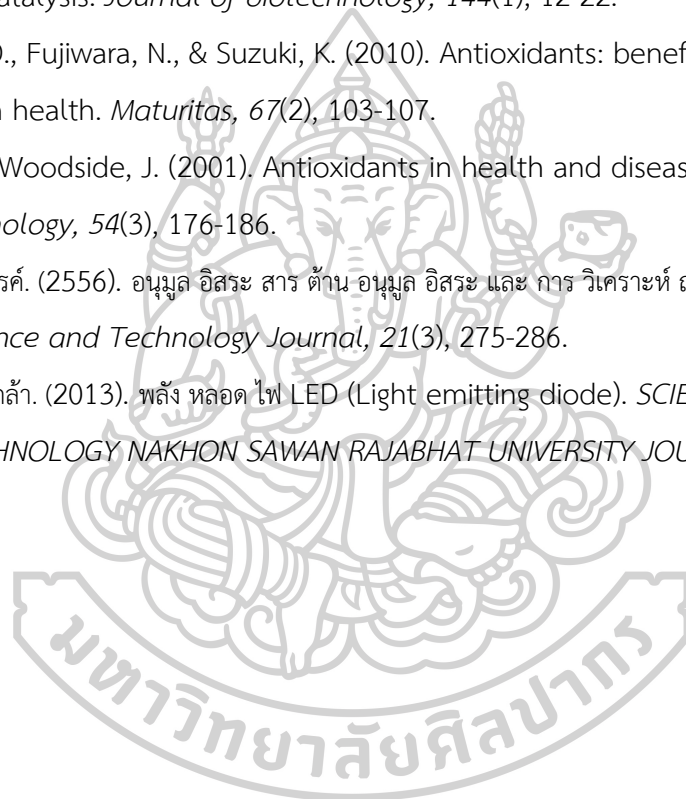
- emitting diode portable carbon dioxide gas sensor based on an interchangeable membrane system for industrial applications. *Analytica chimica acta*, 699(2), 216-222.
- Fiedoruk-Pogrebniak, M., & Koncki, R. (2015). Multicommutated flow analysis system based on fluorescence microdetectors for simultaneous determination of phosphate and calcium ions in human serum. *Talanta*, 144, 184-188.
- Fiedoruk, M., Cocovi-Solberg, D. J., Tymecki, Ł., Koncki, R., & Miró, M. (2015). Hybrid flow system integrating a miniaturized optoelectronic detector for on-line dynamic fractionation and fluorometric determination of bioaccessible orthophosphate in soils. *Talanta*, 133, 59-65.
- Fiedoruk, M., Mieczkowska, E., Koncki, R., & Tymecki, Ł. (2014). A bimodal optoelectronic flow-through detector for phosphate determination. *Talanta*, 128, 211-214.
- 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.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.
- Kalinowski, S., & Koronkiewicz, S. (2017). Double-beam photometric direct-injection detector for multi-pumping flow system. *Sensors and Actuators A: Physical*, 258, 146-155.
- Kolacinska, K., & Koncki, R. (2014). A novel optoelectronic detector and improved flow analysis procedure for ammonia determination with Nessler's reagent. *Analytical Sciences*, 30(10), 1019-1022.
- Kongkedsuk, J., Hongwitayakorn, A., Bootnapang, W., Boonto, N., & Chaisuksant, R. (2013). Development of sequential injection analysis using peristaltic pump and electrochemical detection for antioxidant capacity test by ABTS assay. *Chiang Mai J. Sci*, 40(2), 224-231.
- Lau, K.-T., McHugh, E., Baldwin, S., & Diamond, D. (2006). Paired emitter-detector light emitting diodes for the measurement of lead (II) and cadmium (II). *Analytica chimica acta*, 569(1-2), 221-226.

- Magalhães, L. M., Santos, M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2009). Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77(5), 1559-1566.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L., Tóth, I. V., & Rangel, A. O. (2007). Automatic flow system for sequential determination of ABTS+ scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: a comparative study in food products. *Analytica chimica acta*, 592(2), 193-201.
- Michalec, M., Granica, M., Bzura, J., Koncki, R., Matuszkiewicz-Rowińska, J., & Tymecki, Ł. (2016). Optoelectronic detectors and flow analysis systems for determination of dialysate urea nitrogen. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 226, 563-569.
- Mieczkowska, E., Koncki, R., & Tymecki, Ł. (2011). Hemoglobin determination with paired emitter detector diode. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(9), 3293-3297.
- Miller, J., & Miller, J. C. (2018). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*: Pearson Education.
- Mukaka, M. M. (2012). A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24(3), 69-71.
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (ABTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139-148.
- O'Toole, M., Lau, K. T., & Diamond, D. (2005). Photometric detection in flow analysis systems using integrated PEDDs. *Talanta*, 66(5), 1340-1344.
- O'Toole, M., Lau, K. T., Shepherd, R., Slater, C., & Diamond, D. (2007). Determination of phosphate using a highly sensitive paired emitter–detector diode photometric flow detector. *Analytica chimica acta*, 597(2), 290-294.
- Orpen, D., Beirne, S., Fay, C., Lau, K. T., Corcoran, B., & Diamond, D. (2011). The optimisation of a paired emitter–detector diode optical pH sensing device. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 153(1), 182-187.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease

- and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Pokrzywnicka, M., Fiedoruk, M., & Koncki, R. (2012). Compact optoelectronic flow-through device for fluorometric determination of calcium ions. *Talanta*, 93, 106-110.
- Pokrzywnicka, M., Koncki, R., & Tymecki, Ł. (2010). A concept of dual optical detection using three light emitting diodes. *Talanta*, 82(1), 422-425.
- Pokrzywnicka, M., Tymecki, Ł., & Koncki, R. (2012). Low-cost optical detectors and flow systems for protein determination. *Talanta*, 96, 121-126.
- Rabeta, M., & Faraniza, R. N. (2013). Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *International Food Research Journal*, 20(4).
- 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.
- Rozum, B., & Koncki, R. (2011). Analytical study on cofactor biorecognition by immobilized alkaline apophosphatase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155(1), 323-330.
- Rybkowska, N., Koncki, R., & Strzelak, K. (2017). Optoelectronic iron detectors for pharmaceutical flow analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 145, 504-508.
- Rybkowska, N., Strzelak, K., & Koncki, R. (2018). A comparison of photometric methods for serum iron determination under flow analysis conditions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 254, 307-313.
- Saetear, P., Khamtau, K., Ratanawimarnwong, N., Sereenonchai, K., & Nacapricha, D. (2013). Sequential injection system for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks using paired emitter-detector diode sensor. *Talanta*, 115, 361-366.
- Strzelak, K., & Koncki, R. (2013). Nephelometry and turbidimetry with paired emitter detector diodes and their application for determination of total urinary protein. *Analytica chimica acta*, 788, 68-73.
- Strzelak, K., Koncki, R., & Tymecki, Ł. (2012). Serum alkaline phosphatase assay with

- paired emitter detector diode. *Talanta*, *96*, 127-131.
- Strzelak, K., Misztal, J., Tymecki, Ł., & Koncki, R. (2016). Bioanalyte multicommutated flow analysis system for microproteinuria diagnostics. *Talanta*, *148*, 707-711.
- Strzelak, K., Rybkowska, N., Wiśniewska, A., & Koncki, R. (2017). Photometric flow analysis system for biomedical investigations of iron/transferrin speciation in human serum. *Analytica chimica acta*, *995*, 43-51.
- Strzelak, K., Wiśniewska, A., Bobilewicz, D., & Koncki, R. (2014). Multicommutated flow analysis system for determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Talanta*, *128*, 38-43.
- Tymecki, Ł., Brodacka, L., Rozum, B., & Koncki, R. (2009). UV-PEDD photometry dedicated for bioanalytical uses. *Analyst*, *134*(7), 1333-1337.
- Tymecki, Ł., & Koncki, R. (2009). Simplified paired-emitter-detector-diodes-based photometry with improved sensitivity. *Analytica chimica acta*, *639*(1-2), 73-77.
- Tymecki, Ł., Korszun, J., Strzelak, K., & Koncki, R. (2013). Multicommutated flow analysis system for determination of creatinine in physiological fluids by Jaffe method. *Analytica chimica acta*, *787*, 118-125.
- Tymecki, Ł., Pokrzywnicka, M., & Koncki, R. (2008). Paired emitter detector diode (PEDD)-based photometry—an alternative approach. *Analyst*, *133*(11), 1501-1504.
- Tymecki, Ł., Pokrzywnicka, M., & Koncki, R. (2011). Fluorometric paired emitter detector diode (FPEDD). *Analyst*, *136*(1), 73-76.
- Tymecki, Ł., Rejnis, M., Pokrzywnicka, M., Strzelak, K., & Koncki, R. (2012). Fluorimetric detector and sensor for flow analysis made of light emitting diodes. *Analytica chimica acta*, *721*, 92-96.
- Tymecki, Ł., Strzelak, K., & Koncki, R. (2013). Biparametric multicommutated flow analysis system for determination of human serum phosphoesterase activity. *Analytica chimica acta*, *797*, 57-63.
- 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*, *66*(4), 511-517.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M., Troncoso, A., & Garcia-Parrilla, M. (2004). The

- antioxidant activity of wines determined by the ABTS+ method: Influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64(2), 501-509.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217-224.
- Yang, Z. (2009). Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of biotechnology*, 144(1), 12-22.
- Yoshihara, D., Fujiwara, N., & Suzuki, K. (2010). Antioxidants: benefits and risks for long-term health. *Maturitas*, 67(2), 103-107.
- Young, I., & Woodside, J. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *Thai Science and Technology Journal*, 21(3), 275-286.
- หทัยชนก หมื่นกล้า. (2013). พลังหลอดไฟ LED (Light emitting diode). *SCIENCE AND TECHNOLOGY NAKHON SAWAN RAJABHAT UNIVERSITY JOURNAL*, 5(5), 36-40.



ภาคผนวก
(Appendices)

1. ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ค่า EC50 จากวิธี ABTS assay

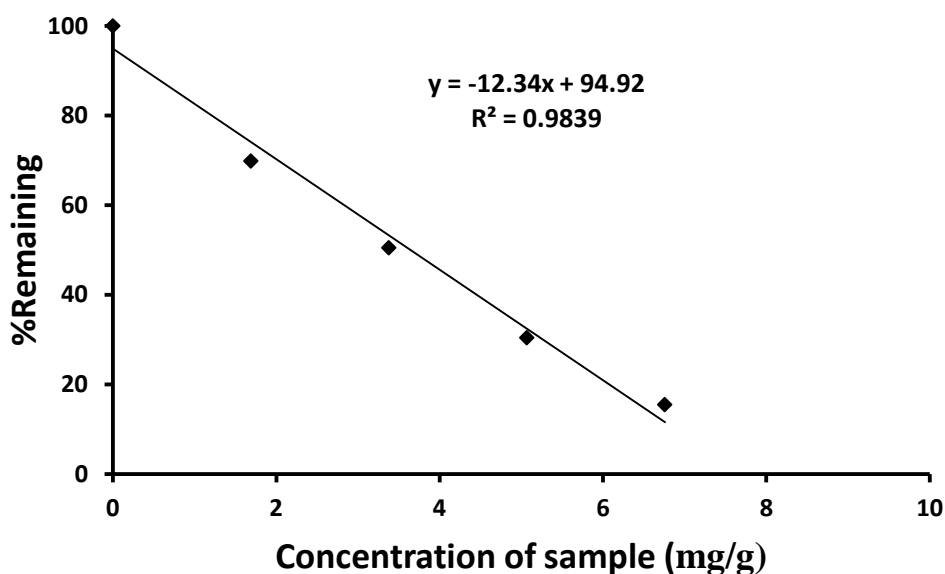
หลอด	ปริมาตร ABTS (mL)	ปริมาตร ตัวอย่าง (mL)	ปริมาตรน้ำกลั่น (mL)	ปริมาตรรวม (mL)
1	3.50	0.50	0.00	4.00
2	3.50	0.40	0.10	4.00
3	3.50	0.30	0.20	4.00
4	3.50	0.20	0.30	4.00
5	3.50	0.10	0.40	4.00
control	3.50	0.00	0.50	4.00

คำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างในสารละลายที่แตกต่างกัน แล้วนำสารละลายของตัวอย่างที่ 1 แต่ละความเข้มข้นไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm นำค่า absorbance ที่ได้จากมาคำนวณ %remaining radical ตามสูตร

$$\% \text{Remaining radical} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100$$

หลอด	ความเข้มข้นตัวอย่าง (mg/g)	Absorbance	%Remaining
1	8.45	0.57770	100.00
2	6.76	0.40334	69.82
3	5.07	0.29128	50.42
4	3.38	0.17546	30.37
5	1.69	0.08929	15.46
control	0.00	0.02889	5.00

จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับ %remaining (แกน y) เพื่อคำนวณค่า EC50



แทนค่า $y = 50$ ในสมการเส้นตรงจากนั้นแก้สมการ คำนวณค่า x

$$y = -12.34x + 94.92$$

$$50 = -12.34x + 94.92$$

$$x = 3.64$$

จะทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของตัวอย่างหรือก็คือปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $ABTS^{•+}$ เหลืออยู่ 50% คือ 3.64 mg/g

เนื่องจาก gallic acid มีค่า EC50 เท่ากับ 0.51 mg/g

ตัวอย่าง 1 หนัก 3.64 mg เทียบเท่ากับ gallic acid 0.51 mg

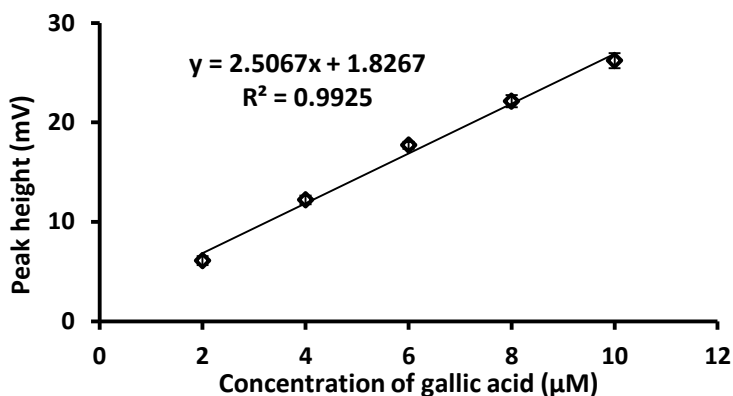
ถ้าตัวอย่าง 1 หนัก 1 mg เทียบเท่ากับ gallic acid $(0.51 \times 1)/3.64 = 0.14$ mg

ดังนั้น ตัวอย่าง 1 จะมีค่า GAE = 0.14 mg/g sample

ผลการทดลองตัวอย่างอื่นๆ คำนวณในทำนองเดียวกัน

2. ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ External calibration curve จากวิธี ABTS assay

สร้างกราฟมาตรฐานโดยพล็อตระหว่างความสูงของสัญญาณ (แกน Y) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X)



แทนค่าความสูงของสัญญาณของตัวอย่างที่ 1 ในสมการเส้นตรงจากนั้นแก้สมการคำนวณค่า x

$$y = 2.5067x + 1.8267$$

$$17.1 = 2.5067x + 1.8267$$

$$x = 7.55 \mu\text{M}$$

สารละลาย 1000 mL มีความเข้มข้น gallic acid 7.55 µmol

สารละลาย 10 mL มีความเข้มข้น gallic acid $(7.55 \times 10) / 1000 = 0.0755 \mu\text{mol}$

เนื่องจากปิเปตตัวอย่างมา 2 mL

ดังนั้น ตัวอย่าง 2 mL มีความเข้มข้น gallic acid เท่ากับ 0.0755 µmol

ถ้าตัวอย่าง 50 mL จะมีความเข้มข้น gallic acid เท่ากับ $(0.0755 \times 50) / 2 = 1.89 \mu\text{mol}$

เนื่องจากชั่งตัวอย่างมา 3.3799 g ในน้ำ 50.00 mL

ดังนั้นตัวอย่างหนัก 3.3799 g จะมีความเข้มข้น gallic acid เท่ากับ 1.89 µmol

ถ้าตัวอย่างหนัก 1 g จะมีความเข้มข้น gallic acid เท่ากับ $(1.89 \times 1) / 3.3799 = 0.559 \mu\text{mol}$

ถ้าตัวอย่างหนัก 1 g มีความเข้มข้น gallic acid เท่ากับ $0.559 \mu\text{mol} \times 188.14 \text{ g/mol} = 0.11 \text{ mg}$

เพราะฉะนั้น ตัวอย่างหนัก 1 g จะมีความเข้มข้นเทียบเท่า gallic acid 0.11 mg

หรือตัวอย่าง 1 มีค่า GAE = 0.11 mg/g sample

ผลการทดลองตัวอย่างอื่นๆ คำนวณในทำนองเดียวกัน

3. การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบทดสอบประสิทธิภาพของฟีนอลิกกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในการทดลองที่ 3.6.2.1

วิธี ABTS assay

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)
	ABTS ⁺⁺ reagent	Ascorbic acid	Water		
1	10.00	0.00	15.00	25.00	0.00
2	10.00	0.40	14.60	25.00	1.67
3	10.00	0.80	14.20	25.00	3.33
4	10.00	1.20	13.80	25.00	5.00
5	10.00	1.60	13.40	25.00	6.67
6	10.00	2.40	12.60	25.00	10.00
7	10.00	3.30	11.70	25.00	13.33

วิธี DPPH assay

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)
	DPPH [•] reagent	Ascorbic acid	Water		
1	2.00	0.00	23.00	25.00	0.00
2	2.00	0.40	22.60	25.00	1.67
3	2.00	0.80	22.20	25.00	3.33
4	2.00	1.20	21.80	25.00	5.00
5	2.00	1.60	21.40	25.00	6.67
6	2.00	2.40	20.60	25.00	10.00
7	2.00	3.30	19.70	25.00	13.33

วิธี FRAP assay

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)
	FRAP reagent	Ascorbic acid	Water		
1	5.00	0.00	20.00	25.00	0.00
2	5.00	0.40	19.60	25.00	1.67
3	5.00	0.80	19.20	25.00	3.33
4	5.00	1.20	18.80	25.00	5.00
5	5.00	1.60	18.40	25.00	6.67
6	5.00	2.40	17.60	25.00	10.00
7	5.00	3.30	16.70	25.00	13.33

4. การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบการใช้งานของเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่ประดิษฐ์ ตามการทดลองที่ 3.6.6

วิธี ABTS assay

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)
	ABTS ⁺ reagent	Ascorbic acid	Water		
1	3.50	0.50	0.00	4.00	12.50
2	3.50	0.40	0.10	4.00	10.00
3	3.50	0.30	0.20	4.00	7.50
4	3.50	0.20	0.30	4.00	5.00
5	3.50	0.10	0.40	4.00	2.50
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00

วิธี DPPH assay

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)
	DPPH [•] reagent	Ascorbic acid	Ethanol		
1	3.50	0.040	0.460	4.00	0.10
2	3.50	0.035	0.465	4.00	0.09
3	3.50	0.030	0.470	4.00	0.08
4	3.50	0.025	0.475	4.00	0.06
5	3.50	0.020	0.480	4.00	0.05
control	3.50	0.000	0.500	4.00	0.00

วิธี FRAP assay

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)
	FRAP reagent	Ascorbic acid	Water		
1	1.00	0.50	2.50	4.00	12.50
2	1.00	0.40	2.60	4.00	10.00
3	1.00	0.30	2.70	4.00	7.50
4	1.00	0.20	2.80	4.00	5.00
5	1.00	0.10	2.90	4.00	2.50
control	1.00	0.00	3.00	4.00	0.00

5. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS แบบ batch (แสดงผลการวิเคราะห์ค่า GAE ในตารางที่ 4.1)

สารมาตรฐานกรดแกลลิก (stock gallic acid = 0.1 mM)

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น Gallic acid (μ M)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Gallic acid	Water			
1	3.50	0.20	0.30	4.00	5.00	0.06645
2	3.50	0.16	0.34	4.00	4.00	0.17472
3	3.50	0.12	0.38	4.00	3.00	0.27636
4	3.50	0.08	0.42	4.00	2.00	0.38340
5	3.50	0.05	0.45	4.00	1.25	0.47942
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.63713

ตัวอย่างชา 1

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	8449.75	0.04277
2	3.50	0.40	0.10	4.00	6759.80	0.08875
3	3.50	0.30	0.20	4.00	5069.85	0.16641
4	3.50	0.20	0.30	4.00	3379.90	0.27404
5	3.50	0.10	0.40	4.00	1689.95	0.40478
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.58412

ตัวอย่างชา 2

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	3096.70	0.03514
2	3.50	0.40	0.10	4.00	2477.36	0.08759
3	3.50	0.30	0.20	4.00	1858.02	0.16952
4	3.50	0.20	0.30	4.00	1238.68	0.27250
5	3.50	0.10	0.40	4.00	619.34	0.41394
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.60226

ตัวอย่างชา 3

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	1430.77	0.02961
2	3.50	0.40	0.10	4.00	1144.62	0.06985
3	3.50	0.30	0.20	4.00	858.46	0.14769
4	3.50	0.20	0.30	4.00	572.31	0.25929
5	3.50	0.10	0.40	4.00	286.15	0.40258
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.60041

ตัวอย่างชา 4

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	325.90	0.26163
2	3.50	0.40	0.10	4.00	260.72	0.32367
3	3.50	0.30	0.20	4.00	195.54	0.37697
4	3.50	0.20	0.30	4.00	130.36	0.44306
5	3.50	0.10	0.40	4.00	65.18	0.51041
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.57510

ตัวอย่างชา 5

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	565.30	0.00517
2	3.50	0.40	0.10	4.00	452.24	0.05106
3	3.50	0.30	0.20	4.00	339.18	0.15672
4	3.50	0.20	0.30	4.00	226.12	0.26776
5	3.50	0.10	0.40	4.00	113.06	0.41626
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.61211

ตัวอย่างชา 6

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.40	0.10	4.00	31.38	0.02395
2	3.50	0.30	0.20	4.00	23.54	0.12445
3	3.50	0.20	0.30	4.00	15.69	0.27479
4	3.50	0.10	0.40	4.00	7.85	0.42169
5	3.50	0.05	0.45	4.00	3.92	0.51798
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.62391

ตัวอย่างชา 7

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.20	0.30	4.00	22.23	0.02751
2	3.50	0.16	0.34	4.00	17.78	0.11316
3	3.50	0.12	0.38	4.00	13.34	0.21771
4	3.50	0.08	0.42	4.00	8.89	0.34028
5	3.50	0.05	0.45	4.00	5.56	0.38607
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.61086



6. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS แบบ batch (แสดงผลการวิเคราะห์ค่า AAE ในตารางที่ 4.6)

สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (stock ascorbic acid = 0.1 mM)

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Ascorbic acid	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	12.50	0.32807
2	3.50	0.40	0.10	4.00	10.00	0.40037
3	3.50	0.30	0.20	4.00	7.50	0.47302
4	3.50	0.20	0.30	4.00	5.00	0.54345
5	3.50	0.10	0.40	4.00	2.50	0.61417
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.68110

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 1

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (%(v/v))	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.20	0.30	4.00	1.00	0.68128
2	3.50	0.15	0.35	4.00	0.75	0.54015
3	3.50	0.12	0.38	4.00	0.60	0.46363
4	3.50	0.08	0.42	4.00	0.40	0.37016
5	3.50	0.05	0.45	4.00	0.25	0.30473
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.18972

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 2

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (%(v/v))	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.16	0.34	4.00	2.00	0.05858
2	3.50	0.12	0.38	4.00	1.50	0.13126
3	3.50	0.08	0.42	4.00	1.00	0.23141
4	3.50	0.04	0.46	4.00	0.50	0.39257
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.58888

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 3

No	ปริมาณ (mL)			ปริมาณรวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	1.25	0.61916
2	3.50	0.40	0.10	4.00	1.00	0.39829
3	3.50	0.30	0.20	4.00	0.75	0.29865
4	3.50	0.20	0.30	4.00	0.50	0.17888
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.25	0.18426
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.06088

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 4

No	ปริมาณ (mL)			ปริมาณรวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	1.25	0.17980
2	3.50	0.40	0.10	4.00	1.00	0.22859
3	3.50	0.30	0.20	4.00	0.75	0.26307
4	3.50	0.20	0.30	4.00	0.50	0.31743
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.25	0.43338
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.63668

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 5

No	ปริมาณ (mL)			ปริมาณรวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	2.50	0.12913
2	3.50	0.40	0.10	4.00	2.00	0.20910
3	3.50	0.30	0.20	4.00	1.50	0.27831
4	3.50	0.20	0.30	4.00	1.00	0.35405
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.50	0.44561
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.63959

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 6

No	ปริมาณ (mL)			ปริมาณรวม (mL)	ความเข้มข้นตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	1.25	0.04875
2	3.50	0.40	0.10	4.00	1.00	0.10853
3	3.50	0.30	0.20	4.00	0.75	0.18259
4	3.50	0.20	0.30	4.00	0.50	0.28709
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.25	0.41397
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.61433

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 7

No	ปริมาณ (mL)			ปริมาณรวม (mL)	ความเข้มข้นตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	1.25	0.12174
2	3.50	0.40	0.10	4.00	1.00	0.18978
3	3.50	0.30	0.20	4.00	0.75	0.27050
4	3.50	0.20	0.30	4.00	0.50	0.40658
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.25	0.53346
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.72148

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 8

No	ปริมาณ (mL)			ปริมาณรวม (mL)	ความเข้มข้นตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	2.50	0.16631
2	3.50	0.40	0.10	4.00	2.00	0.21913
3	3.50	0.30	0.20	4.00	1.50	0.29058
4	3.50	0.20	0.30	4.00	1.00	0.37328
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.50	0.47706
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.62505

7. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP แบบ batch (แสดงผลการวิเคราะห์ค่า AAE ในตารางที่ 4.9)

สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (stock ascorbic acid = 0.1 mM)

No	ปริมาณ (mL)			ปริมาณรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Ascorbic acid	Water			
1	1.00	0.00	3.00	4.00	0.00	0.30984
2	1.00	0.05	2.95	4.00	1.25	0.36673
3	1.00	0.10	2.90	4.00	2.50	0.43675
4	1.00	0.15	2.85	4.00	3.75	0.48322
5	1.00	0.20	2.80	4.00	5.00	0.53888
6	1.00	0.25	2.75	4.00	6.25	0.57820

ตัวอย่าง

Sample	ปริมาณ (mL)			ปริมาณรวม (mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 nm
	FRAP reagent	Sample	Water		
ชา 1	1.00	0.30	0.00	4.00	0.49641
ชา 2	1.00	0.25	0.10	4.00	0.51527
ชา 3	1.00	0.30	0.20	4.00	0.46301
ชา 4	1.00	0.15	0.30	4.00	0.50913
ชา 5	1.00	0.20	0.40	4.00	0.45839
ชา 6	1.00	0.10	0.20	4.00	0.45749
ชา 7	1.00	0.08	0.20	4.00	0.46976
ชา 8	1.00	0.30	0.30	4.00	0.46958

8. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้ เครื่องดื่มสมุนไพร และวิตามินซีที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS แบบ batch (แสดงผลการวิเคราะห์ค่า AAE ในตารางที่ 4.11)

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 1

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้นตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.15	0.35	4.00	3.75	0.10223
2	3.50	0.12	0.38	4.00	3.00	0.16168
3	3.50	0.09	0.41	4.00	2.25	0.24666
4	3.50	0.06	0.44	4.00	1.50	0.37233
5	3.50	0.03	0.47	4.00	0.75	0.48966
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.65712

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 2

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้นตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	2.50	0.15504
2	3.50	0.40	0.10	4.00	2.00	0.22575
3	3.50	0.30	0.20	4.00	1.50	0.31552
4	3.50	0.20	0.30	4.00	1.00	0.42267
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.50	0.52561
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.63502

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 3

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้นตัวอย่าง % (v/v)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	2.50	0.16631
2	3.50	0.40	0.10	4.00	2.00	0.21913
3	3.50	0.30	0.20	4.00	1.50	0.29058
4	3.50	0.20	0.30	4.00	1.00	0.37328
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.50	0.47706
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.62505

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 4

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง %(v/v)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	1.25	0.13912
2	3.50	0.40	0.10	4.00	1.00	0.19315
3	3.50	0.30	0.20	4.00	0.75	0.22064
4	3.50	0.20	0.30	4.00	0.50	0.39952
5	3.50	0.10	0.40	4.00	0.25	0.51152
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.75352

ตัวอย่างชา 1

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	8449.75	0.04277
2	3.50	0.40	0.10	4.00	6759.80	0.08875
3	3.50	0.30	0.20	4.00	5069.85	0.16641
4	3.50	0.20	0.30	4.00	3379.90	0.27404
5	3.50	0.10	0.40	4.00	1689.95	0.40478
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.58412

ตัวอย่างชา 2

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	1430.77	0.02961
2	3.50	0.40	0.10	4.00	1144.62	0.06985
3	3.50	0.30	0.20	4.00	858.46	0.14769
4	3.50	0.20	0.30	4.00	572.31	0.25929
5	3.50	0.10	0.40	4.00	286.15	0.40258
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.60041

ตัวอย่างชา 3

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	325.90	0.27761
2	3.50	0.40	0.10	4.00	260.72	0.32726
3	3.50	0.30	0.20	4.00	195.54	0.38391
4	3.50	0.20	0.30	4.00	130.36	0.44832
5	3.50	0.10	0.40	4.00	65.18	0.51171
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.57673

ตัวอย่างชา 4

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	565.30	0.00397
2	3.50	0.40	0.10	4.00	452.24	0.05874
3	3.50	0.30	0.20	4.00	339.18	0.16294
4	3.50	0.20	0.30	4.00	226.12	0.28539
5	3.50	0.10	0.40	4.00	113.06	0.42528
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.60429

ตัวอย่างชา 5

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.40	0.10	4.00	31.38	0.04523
2	3.50	0.30	0.20	4.00	23.54	0.14117
3	3.50	0.20	0.30	4.00	15.69	0.27235
4	3.50	0.10	0.40	4.00	7.85	0.42732
5	3.50	0.05	0.45	4.00	3.92	0.51433
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.61333

ตัวอย่างชา 6

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.20	0.30	4.00	22.23	0.03276
2	3.50	0.16	0.34	4.00	17.78	0.11829
3	3.50	0.12	0.38	4.00	13.34	0.21671
4	3.50	0.08	0.42	4.00	8.89	0.35436
5	3.50	0.05	0.45	4.00	5.56	0.41237
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.60188

ตัวอย่างชา 7

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.30	0.20	4.00	9.41	0.26398
2	3.50	0.25	0.25	4.00	7.85	0.31398
3	3.50	0.20	0.30	4.00	6.28	0.36581
4	3.50	0.15	0.35	4.00	4.71	0.41899
5	3.50	0.10	0.40	4.00	3.14	0.47500
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.60965

ตัวอย่างวิตามินซี 1

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	393.40	0.23916
2	3.50	0.40	0.10	4.00	314.72	0.29969
3	3.50	0.30	0.20	4.00	236.04	0.36055
4	3.50	0.20	0.30	4.00	157.36	0.43037
5	3.50	0.10	0.40	4.00	78.68	0.50563
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.59343

ตัวอย่างวิตามินซี 2

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	393.40	0.23738
2	3.50	0.40	0.10	4.00	314.72	0.29173
3	3.50	0.30	0.20	4.00	236.04	0.35509
4	3.50	0.20	0.30	4.00	157.36	0.42403
5	3.50	0.10	0.40	4.00	78.68	0.50503
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.58122

ตัวอย่างวิตามินซี 3

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.50	0.00	4.00	54.09	0.18775
2	3.50	0.40	0.10	4.00	43.27	0.26172
3	3.50	0.30	0.20	4.00	32.45	0.33858
4	3.50	0.20	0.30	4.00	21.64	0.41878
5	3.50	0.10	0.40	4.00	10.82	0.49772
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.57876

ตัวอย่างวิตามินซี 4

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.10	0.40	4.00	5.26	0.25543
2	3.50	0.08	0.42	4.00	4.21	0.32651
3	3.50	0.06	0.44	4.00	3.16	0.39677
4	3.50	0.04	0.46	4.00	2.10	0.45111
5	3.50	0.02	0.48	4.00	1.05	0.50603
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.57979

ตัวอย่างวิตามินซี 5

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.10	0.40	4.00	5.59	0.25697
2	3.50	0.08	0.42	4.00	4.47	0.32717
3	3.50	0.06	0.44	4.00	3.36	0.38734
4	3.50	0.04	0.46	4.00	2.24	0.44954
5	3.50	0.02	0.48	4.00	1.12	0.51254
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.57847

ตัวอย่างวิตามินซี 6

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.10	0.40	4.00	5.26	0.24940
2	3.50	0.08	0.42	4.00	4.21	0.31735
3	3.50	0.06	0.44	4.00	3.16	0.38320
4	3.50	0.04	0.46	4.00	2.10	0.44405
5	3.50	0.02	0.48	4.00	1.05	0.50615
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.57444

ตัวอย่างวิตามินซี 7

No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตร รวม (mL)	ความเข้มข้น ตัวอย่าง (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 734 nm
	ABTS ⁺⁺ reagent	Sample	Water			
1	3.50	0.15	0.35	4.00	8.07	0.09849
2	3.50	0.12	0.38	4.00	6.46	0.19304
3	3.50	0.09	0.41	4.00	4.84	0.29103
4	3.50	0.06	0.44	4.00	3.23	0.38896
5	3.50	0.03	0.47	4.00	1.61	0.48098
control	3.50	0.00	0.50	4.00	0.00	0.57782

9. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้ เครื่องดื่มสมุนไพร และวิตามินซีที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP แบบ batch (แสดงผลการวิเคราะห์ค่า AAE ในตารางที่ 4.11)

สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (stock ascorbic acid = 0.1 mM)

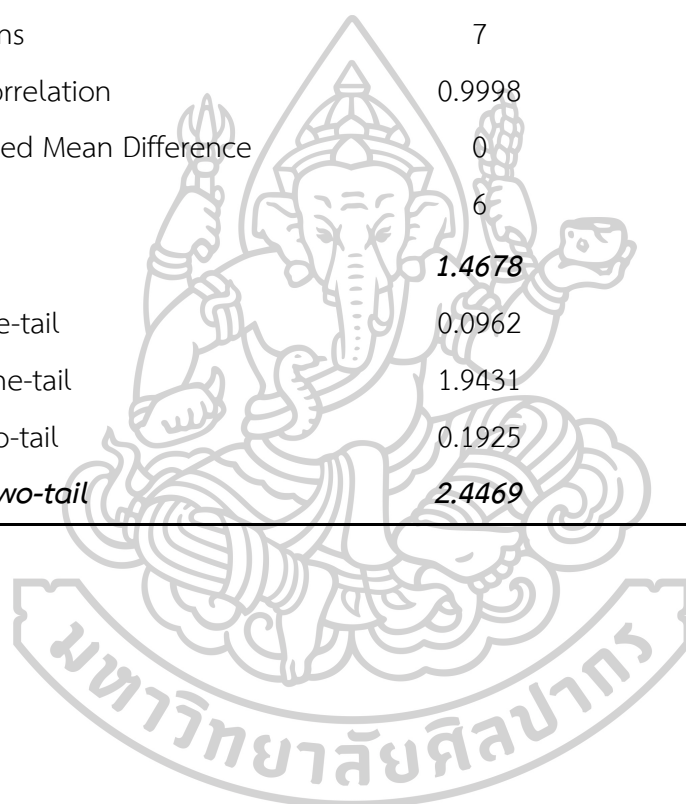
No	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ความเข้มข้น Ascorbic acid (μM)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 nm
	FRAP reagent	Ascorbic acid	Water			
1	1.00	0.00	3.00	4.00	0.00	0.31766
2	1.00	0.05	2.95	4.00	1.25	0.37285
3	1.00	0.10	2.90	4.00	2.50	0.42750
4	1.00	0.15	2.85	4.00	3.75	0.47632
5	1.00	0.20	2.80	4.00	5.00	0.53995
6	1.00	0.25	2.75	4.00	6.25	0.58302

ตัวอย่าง

Sample	ปริมาตร (mL)			ปริมาตรรวม (mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 nm
	FRAP reagent	Sample	Water		
น้ำผลไม้ 1	1.00	1.20	1.80	4.00	0.436020
น้ำผลไม้ 2	1.00	1.00	2.00	4.00	0.488873
น้ำผลไม้ 3	1.00	0.30	2.70	4.00	0.436583
น้ำผลไม้ 4	1.00	0.80	2.20	4.00	0.590497
ชา 1	1.00	0.30	2.70	4.00	0.489743
ชา 2	1.00	0.15	2.85	4.00	0.517683
ชา 3	1.00	0.30	2.70	4.00	0.473848
ชา 4	1.00	0.15	2.85	4.00	0.517273
ชา 5	1.00	0.20	2.80	4.00	0.464232
ชา 6	1.00	0.10	2.90	4.00	0.469833
ชา 7	1.00	0.30	2.70	4.00	0.493822
วิตามินซี 1	1.00	0.30	2.70	4.00	0.54241
วิตามินซี 2	1.00	0.30	2.70	4.00	0.53719
วิตามินซี 3	1.00	0.20	2.80	4.00	0.54113
วิตามินซี 4	1.00	0.03	2.97	4.00	0.52158
วิตามินซี 5	1.00	0.05	2.95	4.00	0.55397
วิตามินซี 6	1.00	0.03	2.97	4.00	0.49865
วิตามินซี 7	1.00	0.05	2.95	4.00	0.56510

10. *t*-test สำหรับชุดผลการทดลองตัวอย่าง ตารางที่ 4.1

	Chemical generation with batch method	Electrochemical generation with FIA method
Mean	12.99	12.11
Variance	432.14	370.21
Observations	7	7
Pearson Correlation	0.9998	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	6	
<i>t Stat</i>	1.4678	
P(T<=t) one-tail	0.0962	
t Critical one-tail	1.9431	
P(T<=t) two-tail	0.1925	
<i>t Critical two-tail</i>	2.4469	



11. *t*-test สำหรับชุดผลการทดลองตัวอย่าง ตารางที่ 4.6

	Classical batch method	FIA-PEDD system
Mean	2.57	2.47
Variance	8.13	8.18
Observations	8	8
Pearson Correlation	0.9990	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	7	
<i>t Stat</i>	2.1859	
P(T<=t) one-tail	0.0325	
t Critical one-tail	1.8945	
P(T<=t) two-tail	0.0650	
<i>t Critical two-tail</i>	2.3646	

12. *t*-test สำหรับชุดผลการทดลองตัวอย่าง ตารางที่ 4.9

	Classical batch method	FIA-PEDD system
Mean	34.525	33.919
Variance	1385.519	1406.944
Observations	10	10
Pearson Correlation	0.9985	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	9	
<i>t Stat</i>	0.9291	
P(T<=t) one-tail	0.1885	
t Critical one-tail	1.8331	
P(T<=t) two-tail	0.3770	
<i>t Critical two-tail</i>	2.2621	

13. *t*-test สำหรับชุดผลการทดลองตัวอย่าง ตารางที่ 4.11

ABTS assay

	Classical batch method	FIA-PEDD system
Mean	125.04	119.92
Variance	30729.03	34265.2
Observations	18	18
Pearson Correlation	0.9883	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	17	
<i>t Stat</i>	0.7459	
P(T<=t) one-tail	0.2329	
t Critical one-tail	1.7396	
P(T<=t) two-tail	0.4658	
<i>t Critical two-tail</i>	2.1098	

FRAP assay

	Classical batch method	FIA-PEDD system
Mean	98.48146	91.24373
Variance	27337.71	22673.07
Observations	18	18
Pearson Correlation	0.9248	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	17	
<i>t Stat</i>	0.4880	
P(T<=t) one-tail	0.3158	
t Critical one-tail	1.7396	
P(T<=t) two-tail	0.6317	
<i>t Critical two-tail</i>	2.1098	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นันทยา ม่านทอง
วัน เดือน ปี เกิด	4 กรกฎาคม 2535
สถานที่เกิด	อ.เมือง จ.ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	<p>ปีการศึกษา 2550 สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมต้น จากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ จังหวัดราชบุรี</p> <p>ปีการศึกษา 2553 สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมปลาย จากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ จังหวัดราชบุรี</p> <p>ปีการศึกษา 2557 สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร</p> <p>ปีการศึกษา 2560 สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร</p> <p>ประสบการณ์ : ผู้ช่วยคุมปฏิบัติการรายวิชา Analytical chemistry laboratory I (513 233), II (513 234) General chemistry laboratory (513 105)</p>
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 12 หมู่ 5 ตำบลวัดยางงาม อำเภอปากท่อ จังหวัดราชบุรี 70140
ผลงานตีพิมพ์	<p>Manthong N. and Chaneam S. (2019) Application of LED-based colorimetric detector for evaluation of total antioxidant capacity using ferric reducing antioxidant power assay. Thai Journal of Science and Technology, 27(3).</p> <p>Chaneam S., Manthong N., Phoonsawad K, Nitikornnusorn S, Chaisuksant R. and Nacapricha D. (2016) Evaluation of antioxidant capacity using flow injection analysis with low-cost PEDD detection. Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University, 3(5): 82-92.</p> <p>Chaisuksant R., Chomsook T., Manthong N. and Kalcher K. (2016) Low cost hydrogen peroxide sensor from manganese oxides</p>

modified pencil graphite electrode. *Procedia Chemistry*, 20: 81-84.

การนำเสนอผลงาน

Chaneam S., Sukaram T., Manthong N., Sirisakwisut P., Utilization of orchid extract for on-line and on-site green analysis of copper (II) ion. Oral and poster presentation at Workshop on PiCOANALYSIS II, 28-29 July, 2017 at Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Manthong N. and Chaneam S., Development of a flow injection analysis with dual colorimetric assay for evaluation of total antioxidant capacity. Oral presentation at The 9th National Science Research Conference, 25-26 May, 2017 at Burapha University, Chonburi, Thailand

Manthong N. and Chaneam S., Development of flow injection analysis system with colorimetric detector for dual antioxidant assays. Poster presentation at Pure and Applied Chemistry International Conference 2017, Bangkok, Thailand, 2 -3 February 2017.

รางวัลที่ได้รับ

Best presentation award from the Workshop on PiCOANALYSIS II, entitled utilization of orchid extract for on-line and on-site green analysis of copper (II) ion, 28-29 July, 2017 at Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand