A Novel Method For Measuring Total Antioxidant Capacity And its Application To monitoring The Antioxidant Status In Thai Herbs.

Sirirat Panich

This Research is Funded by Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

Year 2011

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง "การพัฒนาวิธีใหม่ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการประยุกต์ใช้ในสมุนไพรไทย" ประสบความสำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากหลาย ๆ หน่วยงานและหลาย ๆ บุคคล ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและบุคคลต่อไปนี้ซึ่งมีส่วนช่วยผู้วิจัยทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยจนเสร็จสิ้นภายในระยะเวลาที่กำหนด

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

กลุ่มเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย และอุปกรณ์ต่าง ๆ

ดร.มะลิวรรณ อมตธงไชย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สำหรับคำปรึกษาในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ในงานวิจัย

นางสาวกฤษณา ปีวสาร ผู้ช่วยนักวิจัยสำหรับการช่วยเหลือในงานวิจัยอันดียิ่ง

เพื่อน ๆ และอาจารย์ที่คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำหรับกำลังใจและคำปรึกษาต่าง ๆ

ประโยชน์ใด ๆ จากงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยของมอบแก่คณาจารย์ทุกท่านจากมหาวิทยาลัยบูรพาและมหาวิทยาลัยมหิดลที่ได้ให้ความรู้แก่คณะผู้ทำการวิจัย และครอบครัวที่เข้าใจทำให้คณะผู้วิจัยสามารถสละเวลาส่วนตัวเพื่องานวิจัย ถ้าหากมีข้อผิดพลาดประการใดที่เกิดขึ้นผู้วิจัยขอน้อมรับไว้เพื่อปรับปรุงในงานวิจัยครั้งต่อไป

สิริรัตน์ พานิช
ผู้วิจัย
กันยายน 2554

ชื่อเรื่อง : การพัฒนาวิธีใหม่ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมและการประยุกต์ใช้ในสมุนไพรไทย

ผู้วิจัย : นางสาวสิริรัตน์ พานิช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโนยี มทร.พระนคร

พ.ศ. : 2554

บทคัดย่อ

วิธีใหม่ที่ง่ายต่อการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมถูกพัฒนาขึ้นและนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ในสมุนไพรไทย โดยมีหลักการวิเคราะห์คืออนุมูลอิสระที่มีสีฟ้าของอิมิพลามีนจะถูกสร้างขึ้นจากการออกซิไดส์อิมิพลามีนด้วยแอมโมเนียมเตตระวานาเดตในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะถูกจับด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งทำจะทำให้เกิดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรและจะสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม เทคนิคที่นำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดคือเทคนิคสเปคโทโฟโตเมทรี ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีราคาถูก สามารถพัฒนาเป็นตัวตรวจวัดที่ให้จำนวนตัวอย่างต่อการวิเคราะห์สูง โดยใช้ควบคู่กับเทคนิคการไหล ปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ได้แก่ พีเอช ความเข้มข้นของรีเอเจนต์และความเป็นเส้นตรง ถูกศึกษาเพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุด โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้มีความเป็นเส้นตรงถึง 2,800 mg Trolox equivalent/L การวิเคราะห์มีความเที่ยงตรงโดย % RSD น้อยกว่า 1 นอกจากนี้ยังไม่ถูกรบกวนจากสารประกอบหลายชนิดได้แก่ NaOH, NaCl และ Na_2CO_3 วิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก G. sootepensis. ทั้ง 3 ส่วนสกัด ซึ่งผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 ส่วนสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันโดยส่วนสกัดที่ 1 มีความสามาถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดรองลงมาคือส่วนสกัดที่ 2 และส่วนสกัดที่ 3 ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้มีความสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานคือ DPPH และ Follin Ciocalteu reagent แต่วิธีใหม่นี้มีความง่าย เสถียรและถูกกว่า ที่สำคัญไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และการวิเคราะห์เป็นแบบอัตโนมัติ

คำสำคัญ : วิธีใหม่, สารต้านอนุมูลอิสระ, ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม, อิมิพลามีน

Title : A novel method for measuring total antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in Thai herbs.

Researcher : Sirirat Panich, Faculty of Science and Technology, RMUTP

Year : 2011

ABSTRACT

A novel and simple method for measuring total antioxidant capacity or TAC in Thai herb extracts has been developed. The principle is based on generating free radical, the deep blue Imipramine radical is generated by oxidizing Imipramine by ammonium tetravanadate in acid medium that can be easily scavenged by antioxidant compounds in the sample. Decreasing in the absorption spectrum at 620 nm, related with antioxidant capacity, was detected by spectrophotometer method in the proposed of practicable and low-cost, However improvement of the throughput, Flow injection analysis (FIA) was applied. The variables affecting the signal such as pH, reagent concentrations, linear relationship was optimized. The novel assay is linear up to 2,800 mg Trolox equivalent/L, its precision value is lower than 1% RSD and these are no interference from NaOH, NaCl and Na_2CO_3. The method was applied for determination of three extract fractions of G. sootepensis. The results show the different of antioxidant capacity in each fraction with S1 has the most TAC following S2 and S3, respectively. Although a good correlation of the present method was observed between two methods, DPPH and Follin Ciocalteu reagent, Finally the developed method was easy, stable, inexpensive, environmental friendly and automated measures total antioxidant capacity.

Keywords A novel method, Antioxidant, Total antioxidant capacity, Imipramine

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 อนุมูลอิสระ	5
2.2 โรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ	5
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ	7
2.4 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ	7
2.5 คำมอกหลวง	8
2.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Antioxidant Capacity)	9
2.7 ปฏิกิริยาและเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	10
2.8 การวิเคราะห์โดยระบบโฟลอินเจคชัน (Flow injection analysis,FIA)	12
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	14
3.2 วิธีการทดลอง	16
3.3 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	26
3.4 ระยะเวลาการทดลอง	27
3.5 สถานที่ทำการทดลอง	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมเบื้องต้น (Preliminary test)	24
4.2 การศึกษาความเสถียรของอนุมูล IMI	32
4.3 วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Method validation)	33
4.4 การพัฒนาการวิเคราะห์ในระบบโฟลอินเจคชัน (Flow injection analysis)	36

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	42
5.2 อภิปรายผล	44
5.3 ข้อเสนอแนะ	45

สารบัญรูป

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 ดอกและต้นของคำมอกหลวง	8
รูปที่ 2 ปฏิกิริยาของ ABTS ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม	10
รูปที่ 3 ปฏิกิริยาของ DPPH ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม	11
รูปที่ 4 โครงสร้างของอนุมูลอิมิพลามีน	11
รูปที่ 5 a) การวิเคราะห์ในระบบ Batch b) การวิเคราะห์ในระบบ Batch แบบ Autosample และ c) การวิเคราะห์ในระบบ FIA ซึ่งมีความเป็นอัตโนมัติมากที่สุด	12
รูปที่ 6 Manifold ที่มีการใช้ระบบ FIA	12
รูปที่ 7 ระบบโฟลอินเจคชันที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม	26
รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาของอนุมูล IMI กับ Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	28
รูปที่ 9 การหายไปของอนุมูล IMI radical เมื่อเติม ascorbic acid ที่ 0-80 μM	29
รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกแตกต่างกัน	30
รูปที่ 11 สเปคตรัมจากการเติมสารรบกวน NaCl ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	31
รูปที่ 12 สเปคตรัมจากการเติมสารรบกวน Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	31
รูปที่ 13 สเปคตรัมจากการเติมสารรบกวน NaOH ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	32
รูปที่ 14 ค่า Absorbance ของ IMI radical โดยการเติม 1 ml Stock solution ของ NH_4VO_3 6 ml ของ Stock solution ของ H_2SO_4 และ 1 ml Stock solution ของ IMI	32
รูปที่ 15 สเปคตรัมของ DPPH นำจาก Stock มา 25 ml ปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วย 80 % $MeOH/H_2O$	33
รูปที่ 16 สเปคตรัมการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH เมื่อเติม Ascorbic acid 0-100 ppm	33
รูปที่ 17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Ascorbic acid	34
รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid	34
รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูล DPPH เมื่อเติม gallic acid ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	34
รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูล DPPH เมื่อเติมสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด	35

รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงสีของ Folin Ciocalteu เมื่อเติม Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 36

รูปที่ 22 ระบบโฟลอินเจคชันที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 37

รูปที่ 23 % Radical Scavenging ของ Ascorbic acid 38

รูปที่ 24 % Radical Scavenging ของ Gallic acid 39

สารบัญรูป

หน้า

เรื่อง

รูปที่ 25 % Radical Scavenging ของ Caffeic acid 40

รูปที่ 26 % Radical Scavenging ของ Trolox 40

รูปที่ 27 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) 43

รูปที่ 28 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย Ciocalteu Reagent (FCR) 43

รูปที่ 29 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยอนุมูลอิมิพลามีน 44

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 เวลาการเติมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยเทคนิค DPPH	22
ตารางที่ 2 เวลาการเติมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยเทคนิค Folin Ciocalteu Reagent (FCR)	24
ตารางที่ 3 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Ascorbic acid และ% Radical Scavenging	29
ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง pH และค่าการดูดกลืนแสง	29
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ NH_4VO_3 กับค่าการดูดกลืนแสง	30
ตารางที่ 6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างโดยวิธีมาตรฐาน DPPH	35
ตารางที่ 7 % Polyphenol ในตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง	35
ตารางที่ 8 สถาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมโดยเทคนิคโฟลอินเจคชัน	36
ตารางที่ 9 % Radical Scavenging ของ Ascorbic acid	37
ตารางที่ 10 % Radical Scavenging ของ Ascorbic acid	38
ตารางที่ 11 % Radical Scavenging ของ Caffeic acid	39
ตารางที่ 12 % Radical Scavenging ของ Trolox	39
ตารางที่ 13 สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด	40
ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูล IMI เมื่อเติมสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด	41
ตารางที่ 15 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด	41

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

อนุมูลอิสระคือ อะตอม โมเลกุลที่เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนไป 1 ตัว หรือสารประกอบที่มีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่ ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายจะทำให้เซลล์ต่างๆ ถูกทำลายทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ซึ่งเป็นที่มาของโรคต่างๆ เช่น การแก่ก่อนวัย โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ สารต้านอนุมูลอิสระจึงได้รับความสนใจจากนักวิจัยและผู้ที่รักสุขภาพเป็นอย่างมาก [1] ซึ่งพืช ผักและผลไม้หลาย ๆ ชนิดในประเทศไทยก็มักจะอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระไม่ว่าจะเป็น โพลีฟีนอล วิตามินเอ วิตามินอี และวิตามินซี เป็นต้น

การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ ในปัจจุบันสามารถทำได้หลากหลายวิธีเช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี หรือสารประกอบฟีนอลิก [2] แต่ในความเป็นจริงสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างหนึ่งๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลาย ๆ ชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งรวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่ทราบว่าเป็นสารชนิดใดที่แน่นอน และสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าคือสารใด นอกจากนี้บางชนิดอาจส่งผลเสริมหรือหักล้างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระกันได้ ดังนั้นการที่จะประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดและแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างและมีปริมาณเป็นเท่าใด จึงเป็นการยากและไม่จำเป็น

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) จะเป็นการวัดความสามารถโดยรวมของตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระโดยไม่สนใจว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใดและปริมาณเท่าใดผสมอยู่ในตัวอย่าง แต่จะวัดเป็นความสามารถของตัวอย่างในการที่จะดักจับกับอนุมูลอิสระ ซึ่งการประเมินค่า TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า [3]

การวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจวัด โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือก็ได้ สารที่นิยมใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระมักจะใช้สารประกอบกลุ่มเอโซ เช่น 2, 2′-Azobis 2-Amidopropane (ABTS) ทำให้เกิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ในการวิเคราะห์จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ข้อดีของวิธีนี้คือทำได้ง่าย การวิเคราะห์ทำได้ทั้งในน้ำ

และตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งทำให้การวิเคราะห์มีความยุ่งยากมากยิ่งขึ้น สารอีกตัวที่นิยมใช้เช่นกันคือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) การวิเคราะห์ก็จะทำในทำนองเดียวกับการวิเคราะห์ $ABTS^{\bullet+}$แต่อนุมูล DPPH ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในร่างกายจริง ๆ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าความเป็นจริง [4] ถึงแม้ว่าเทคนิคทั้งสองจะทำได้ง่ายแต่ว่าปัญหาที่สำคัญอีกประการคือสีของตัวอย่างอาจจะรบกวนการวิเคราะห์ได้โดยเฉพาะสีม่วงของ $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งเป็นสีของตัวอย่างที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงได้แก่ องุ่นและไวน์ชนิดต่างๆ เป็นต้น

จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยจะทำการคิดค้นปฏิกิริยาใหม่ซึ่งใช้สารประกอบซึ่งมีชื่อว่า “อิมิพลามีน” (Imipramine) ซึ่งง่ายต่อการทำให้เป็นอนุมูลเพียงแค่ละลายในน้ำ สีของอนุมูลอิมิพลามีนเป็นสีฟ้า ซึ่งเป็นสีที่ไม่พบในตัวอย่างจึงไม่รบกวนการวิเคราะห์ นอกจากนี้อิมิพลามีนยังไม่เป็นอันตรายต่อผู้วิจัย สิ่งแวดล้อมและราคาไม่แพง นอกจากนี้ในการวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติจะมีปริมาณจำกัดที่แต่ละส่วนแยก (Fraction) โดยเฉพาะสารสกัดบริสุทธิ์ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นวิธีที่นำมาวิเคราะห์ควรจะมีความสามารถในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว สะดวก มีความไวในการวิเคราะห์เพื่อตอบสนองข้อจำกัดดังกล่าว จึงได้นำเทคนิคโฟลอินเจคชัน (Flow Injection Analysis) มาใช้ควบคู่กับปฏิกิริยาของอิมิพลามีนในการวิเคราะห์หาค่า TAC ดังกล่าว

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคิดค้นปฏิกิริยาใหม่ที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมที่ยังไม่เคยมีใครทำมาก่อน (จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล Sciencedirect และ Scorpus)

1.2.2 เพื่อทดสอบปฏิกิริยาใหม่จากข้อ 1 ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

1.2.3 เพื่อนำปฏิกิริยาใหม่จากข้อ 1 ไปทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยควบคู่กับเทคนิคโฟลอินเจคชัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ทดสอบปฏิกิริยาใหม่โดยใช้อิมิพลามีนเป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระเพื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

1.3.2 ทดสอบปฏิกิริยาใหม่โดยใช้อิมิพลามีนเป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่มีอยู่ดังเดิมแล้วเช่น DPPH$^{\bullet}$, Folin-Ciocalteu รีเอเจนต์

1.3.3 ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากส่วนแยก (fraction) จากพืชสมุนไพรโดยใช้ปฏิกิริยาของอิมิพลามีนควบคู่กับเทคนิคโฟลอินเจคชัน

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

อนุมูลอิสระเป็นแหล่งของโรคร้ายแรงต่าง ๆ หลายชนิดเช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ ซึ่งปัจจุบันสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ ควันบุหรี่ ความเครียดล้วนแต่เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายและยากแก่การหลีกเลี่ยง สารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น สมุนไพรไทยเป็นที่รู้จักกันมาช้านาน ซึ่งหลาย ๆ ชนิดอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระนานาชนิด แต่เนื่องจากกระบวนการสกัดสารที่ได้จากสมุนไพรเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะมีหลาย ๆ ส่วน (fraction) ที่จะต้องทดสอบ ดังนั้นวิธีในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง นอกจากจะต้องเป็นวิธีที่บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แท้จริงของตัวอย่างแล้ว วิธีการวิเคราะห์จะต้องทำได้อย่างรวดเร็ว สะดวก เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่มาก จึงเป็นที่มาของการวิจัยที่จะพัฒนาวิธีใหม่ที่บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็วกว่าวิธีแบบดังเดิม เช่น DPPH โดยศึกษาหาอนุมูลอิสระที่มีสีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระก็จะทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระลดลง นั่นคือสีที่ลดลงด้วย โดยเลือกใช้เทคนิค

สเปกโทโฟโตเมทรีซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย อุปกรณ์ที่ใช้มีอยู่ตามห้องปฏิบัติการทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือแบบอัตโนมัติและพกพาได้ โดยเฉพาเมื่อใช้ควบคู่กับเทคนิคโฟลอินเจคชั่นจะทำให้การวิเคราะห์มีความสะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระคือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบ ที่มีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่ ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายจะทำให้เซลล์ต่างๆ ถูกทำลาย อนุมูลอิสระมีที่มาจากทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ภายในเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ ส่วนภายนอกได้แก่มลพิษจากสิ่งแวดล้อม ควันบุหรี่ รังสี หรือแสงแดด โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะมีการรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมด้วยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ถ้าร่างกายเสียสมดุลโดยมีปริมาณของอนุมูลอิสระมากกว่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์อันเป็นที่มาของโรคต่างๆ เช่น การแก่ก่อนวัย โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น [1]

2.2 โรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

2.2.1 หลอดเลือดแดงแข็ง โดยปกติในร่างกายของมนุษย์จะมีโคเลสเตอรอลที่เรียกว่าโคเลสเตอรอลที่ดี และโคเลสเตอรอลที่ไม่ดี โคเลสเตอรอลที่ดีจะสามารถจับไขมันได้ ซึ่งเรียกว่าเอชดีแอล (HDL- ไลโพโปรตีน ความหนาแน่นสูง) ส่วนโคเลสเตอรอลที่ไม่ดีนั้นจะสามารถจับกับแอลดีแอล (LDL- ไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ) โคเลสเตอรอลชนิดนี้สามารถก่อตัวเป็นคราบจับผนังหลอดเลือดแดง ซึ่งคราบมักจะไม่จับในหลอดเลือดดำเนื่องจากในหลอดเลือดดำมีออกซิเจนอยู่น้อย เมื่อคราบดังกล่าวเกิดหลุดลอกออกจากผนังหลอดเลือดหรือจับตัวกันหนาขึ้นจะทำให้เลือดเดินผ่านหลอดเลือดในช่วงนั้นได้ยากขึ้น ส่งผลให้เลือดจับตัวกันเป็นก้อน ปิดกั้นทางเดินของเลือดในหลอดเลือดแดง (หลอดเลือดตีบตันหรืออุดตัน) ถ้าก้อนเลือดนี้ไปอุดที่หลอดเลือดที่เป็นหลอดเลือดซึ่งนำไปเลี้ยงหัวใจ จะส่งผลให้เลือดไม่สามารถไปหล่อเลี้ยงหัวใจส่วนปลายหลอดเลือดที่อุดตันได้ ส่งผลให้เกิดโรคหัวใจกำเริบ กล้ามเนื้อหัวใจตาย ถ้าก้อนเลือดไปอุดตันที่หลอดเลือดซึ่งนำไปหล่อเลี้ยงสมอง จะทำให้เกิดโรคลม หรือโรควูบชั่วคราว ในปัจจุบันมีเหตุการณ์ปรากฏชัดเจนว่า อนุมูลอิสระที่เติมออกซิเจนให้แก่ แอลดีแอล เป็นตัวการสำคัญในกระบวนการที่ทำให้เกิดคราบไขมัน แต่แอลดีแอลในผนังหลอดเลือดแดงสามารถจับออกซิเจนเข้ามารวมกับแอลดีแอลได้ เมื่อแอลดีแอลทำปฏิกิริยากับอนุมูลออกซิเจน ระบบป้องกันของร่างกายจะเห็นว่าคราบไขมันที่เกิดขึ้นนั้นเป็นสิ่งแปลกปลอมที่ต้องขจัดออก แต่แทนที่จะให้ผลในทางที่ดีกลับกลายเป็นผลเสียเนื่องจากว่าแอลดีแอล

เมื่อได้รับการเติมออกซิเจนจะทำให้เกิดการอักเสบที่ผนังด้านใน ส่วนนอกของหลอดเลือดแดง และเกิดเป็นกลุ่มไขมันขึ้น ซึ่งกลายเป็นตะกรันเกาะอยู่ในผนังหลอดเลือดแดง สารเคมีหลายอย่างรวมทั้งวิตามินและสารต้านอนุมูลอิสระจะจับออกซิเจนส่งผลให้อนุมูลอิสระเป็นกลาง ซึ่งสามารถช่วยสกัดกั้นการเกิดตะกรันและช่วยลดความเสี่ยงที่จะเกิดโรคหัวใจและโรคแทรกซ้อนได้

2.2.2 มะเร็ง สาเหตุที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรคมะเร็งคือความผิดปกติของดีเอ็นเอ (DNA) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ที่สัมผัสกับอนุมูลอิสระซึ่งอาจทำให้สายดีเอ็นเอขาด หรือ เกิดการเปลี่ยนรูปขึ้น เรียกว่า การกลายพันธุ์ การอักเสบหรือการอักเสบเรื้อรัง เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมีการปลดปล่อยอนุมูลอิสระออกมาเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างที่สำคัญของความผิดปกติของดีเอนเอ (DNA) คือ เชื้อไวรัสที่ทำให้ตับอักเสบ มักเป็นโรคที่ติดเชื้อเรื้อรังของตับ ซึ่งเพิ่มความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดโรคมะเร็งตับขึ้น สารจับออกซิเจนมีศักยภาพที่จะลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งโดยการทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นกลาง

2.2.3 การอักเสบ เซลล์ร่างกายซึ่งมีหน้าที่ล้อมจับและทำลายแบคทีเรีย รวมถึงเนื้อเยื่อที่เสียหายแล้ว ซึ่งเซลล์ร่างกายสามารถทำหน้าที่นี้ได้โดยการผลิตระเบิดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และซูเปอร์ออกไซด์ แต่จะด้วยเหตุผลใดยังไม่เป็นที่ทราบได้ กระบวนการดังกล่าวกลับทำงานเกินเลยไปจนควบคุมไม่ได้ ทำให้สารที่ผลิตขึ้นเหล่านี้ไปก่อปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดการบาดเจ็บขึ้นแก่เนื้อเยื่อ สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้ตรวจพบได้ในน้ำไขข้อ ปฏิกิกิริยาลูกโซ่ดังกล่าวจึงอาจเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบและความเสียหายขยายตัว เช่น โรคไขข้ออักเสบ ดังนั้นสารจับออกซิเจนที่มีศักยภาพสามารถช่วยป้องกันการเกิดการอักเสบได้

2.2.4 การบาดเจ็บซ้ำซ้อน ถ้าเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะหรือเนื้อเยื่อเกิดการขัดข้องขึ้นชั่วคราว แล้วกลับไปเลี้ยงใหม่ได้ การคลั่งของเลือดที่มีออกซิเจนจะทำให้เกิดการบาดเจ็บเพิ่มขึ้น เพราะการขาดออกซิเจนเป็นช่วงๆ จะทำให้ความสามารถในการทำให้อนุมูลอิสระของเนื้อเยื่อเป็นกลางลดลง เมื่ออนุมูลอิสระที่ปลดปล่อยออกมาจากการคลั่งของออกซิเจนเกิดขึ้น ผลที่ตามมาก็คือ ความเสียหายซ้ำเติม เช่น การปลูกถ่ายอวัยวะและการผ่าตัดหัวใจ ซึ่งระหว่างกระบวนการปลูกถ่ายหรือผ่าตัด การส่งเลือดไปหล่อเลี้ยงอวัยวะดังกล่าวจำเป็นต้องหยุดไปชั่วขณะ ส่งผลให้เกิดอาการบาดเจ็บซ้ำซ้อนขึ้น ในกรณีของอาการแก่ก่อนวัยเป็นผลมาจากระบบความต้านทานของร่างกายอ่อนแอลง หลอดเลือดต่างๆ แข็งตัวและเกิดการอุดตัน อวัยวะต่างๆ พากันเริ่มเสื่อม ส่งผลให้เกิดเซลล์มะเร็ง การสูบบุหรี่ กัมมันตภาพรังสีที่เกิดจากประจุไฟฟ้า และสารเคมีบางอย่าง ล้วนแต่เป็นตัวเพิ่มอนุมูลอิสระและเร่งกระบวนการที่ทำให้แก่ เกิดรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า ซึ่งสารจับออกซิเจนที่มีศักยภาพสามารถลดผลบางประการที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้

2.2.5 โรคตา ทารกที่คลอดก่อนกำหนดและมีน้ำหนักตัวน้อยซึ่งต้องใช้ออกซิเจนเพื่อช่วยชีวิต บางรายจอตาเกิดความเสียหายอันเนื่องมาจากระบบป้องกันซึ่งทำให้อนุมูลอิสระออกซิเจนเป็นกลางยังไม่มี การเกิดจอตาเสื่อม ซึ่งพบได้บ่อยสำหรับผู้สูงอายุ คาดว่าส่วนหนึ่งเกิดจาก

ความสามารถในการทำให้อนุมูลอิสระเป็นกลางของเนื้อเยื่อภายในลูกตาลดลง สารจับออกซิเจนที่มีศักยภาพสามารถช่วยป้องกันโรคตาบางชนิดได้

2.2.6 โรคอื่นๆ เราอาจยกตัวอย่างโรคหรือภาวะที่อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญได้อย่างมากมาย ซึ่งถ้าเราสามารถลดหรือสกัดกั้นปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระลงได้ จะด้วยยาหรือวิตามินก็ตาม เราก็น่าจะสามารถรักษาโรคหรือภาวะดังกล่าวได้ แต่เราจำเป็นต้องมีกลยุทธ์ที่ดีในการป้องกันและรักษาโรคหรือภาวะดังกล่าวด้วย

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

"สารต้านอนุมูลอิสระ" ในปัจจุบันกำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างสูงเนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย โดยที่ "สารต้านอนุมูลอิสระ" คือกลุ่มสารซึ่งเมื่อปรากฏในความเข้มข้นต่ำ ๆ แต่สามารถออกซิไดส์หรือยับยั้งการเกิดสภาวะ Oxidative stress ได้ [5] ซึ่งในที่นี้สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ [6]

2.3.1 สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย (Endogenous antioxidants)

ในกลไกของสิ่งมีชีวิตมักจะมีระบบที่ใช้สำหรับต่อต้านอนุมูลซึ่งเป็นต้นเหตุทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านั้นได้แก่ Glutathione peroxidase, catalase, และ superoxide dismutases (SOD) เป็นต้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวมานี้เป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ช่วยรักษาสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระไม่ให้มีมากจนเกิดความเสียหายต่อเซลล์ในร่างกาย

2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย (Exogenous antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ได้จากการบริโภคอาหาร โดยสารที่เป็นที่รู้จักกันดีได้แก่ vitamin C, vitamin E และ β-carotene ซึ่งวิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญโดยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายได้ในน้ำ ทำให้สามารถกำจัดอนุมูลอิสระในส่วนที่ละลายน้ำ ในทางเดียวกันวิตามินอีก็มีบทบาทสำคัญในส่วนของสารที่สามารถละลายได้ในน้ำมัน นอกจากสารทั้ง 2 ตัวนี้แล้วยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอีกมากมายซึ่งอยู่ในผักและผลไม้

2.4 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ

วิตามินซี (Vitamin C) พบมากในผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ส้ม ฝรั่ง มะนาว สตรอเบอรี่ กีวี หรือในผัก บล็อคโคลี่ ผักโขม มะเขือเทศ มีคุณสมบัติ เสริมสร้าง collagen เสริมการซ่อมแซมบาดแผล เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน

วิตามินอี (Vitamin E) พบมากใน น้ำมันเมล็ด ผักใบเขียว ตับ ธัญพืช จมูกข้าวสาลี ไข่แดง เนย ถั่ว มีคุณสมบัติป้องกันโรคหัวใจ หลอดเลือดในสมองตีบ เสริมภูมิต้านทานโรค บำรุงระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์

วิตามินเอ (Vitamin A) พบมากในตับ ปลา ไข่แดง ผลิตภัณฑ์นม เครื่องใน แหล่งอาหารที่ให้ beta-carotene มีคุณสมบัติ บำรุงสายตา ผิวหนัง กระดูก และอวัยวะสืบพันธุ์ เสริมภูมิต้านทานป้องกันมะเร็ง

เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) พบมากในผักสีสดๆ เช่น แครอท ฟักทอง มะละกอสุก ผักเขียวเข้ม เช่น ผักโขม บร็อคโคลี่ มะละกอ ส้ม และแอพริคอท มีส่วนสำคัญที่ช่วยในการเจริญเติบโตและการทำงานของเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น กระดูก ระบบภูมิคุ้มกันโรค อาจลดความเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็ง

โคเอ็นไซม์คิวเท็น (Coenzyme Q10) พบมากในไข่ เครื่องใน ปลา ช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจ ส่งเสริมภูมิต้านทาน ทำให้สดชื่นกระฉับกระเฉง ป้องกันโรคสมองเสื่อมและลดความดัน

อัลฟ่าไลโพอิกแอสิด (Alpha-lipoic acid) ร่างกายสังเคราะห์เอง หรือมาจาก เนื้อแดง ตับ ผักโขม มันฝรั่ง มีคุณสมบัติ ปกป้องเซลล์ประสาท ป้องกันมะเร็งและโรคหัวใจ

2.5 คำมอกหลวง

คำมอกหลวงเป็นไม้พื้นเมืองของไทยที่มีกลิ่นหอม เป็นไม้ต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง อยู่ในวงศ์เข็ม ลักษณะของคำมอกหลวงแสดงดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 ดอกและต้นของคำมอกหลวง [7]

ข้อมูลของคำมอกหลวง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Gardenia sootepensis Hutch.

ชื่อวงศ์ : Rubiaceae

ชื่อพื้นเมือง : ไข่เน่า คำมอกช้าง ผ่าด้าม ยางมอกใหญ่ แสลงหอมไก๋ หอมไก๋

ชนิดพืช: ไม้ต้น

ขนาด: สูงถึง 15 เมตร

สีดอก: สีขาวนวลแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม

ฤดูที่ดอกบาน: มี.ค.-ก.ค.

ใบ : ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรีหรือรูปขอบขนาน กว้าง 4-15 เซนติเมตร ยาว 9-28 เซนติเมตร ปลายแหลมหรือมน โคนใบมนหรือสอบ ขอบใบเรียบ หูใบอยู่ระหว่างก้านใบ ลักษณะเป็นปลอกที่บริเวณ รอบกิ่ง แผ่นใบเหนียวและสาก

ดอก : สีขาวนวลเปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีกลิ่นหอม ออกเป็นดอกเดี่ยวตามซอกใบ กลีบเลี้ยงเป็นหลอดรูปกรวย ยาว 1.2-2 เซนติเมตร ปลายเป็นพูด้านหนึ่งแยกลึก ด้านนอกมีขนละเอียดเหนียว โคนเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวยปลายแยกเป็น 5 แฉก กลีบดอกหนา ขอบกลีบม้วนและบิด ดอกบานเต็มที่กว้าง 8-10 เซนติเมตร

ผล : ผลแห้ง ไม่แตก รูปทรงรีหรือไข่ กว้าง 1.8-2.5 เซนติเมตร ยาว 2.2-4 เซนติเมตร มีสันตื้น 5-6 เส้น ผลแก่สีน้ำตาลเข้ม เปลือกหุ้มเมล็ดแข็ง เมล็ดกลมถึงแบน มีจำนวนมาก [8]

2.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Antioxidant Capacity)

การวัดและตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีอยู่หลายแบบและหลากหลายความหมายได้แก่ "capacity" (หรือ efficiency, power, parameter, potential, potency และ activity) "antioxidant activity" จะใช้สำหรับการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ปรากฏอยู่เดี่ยว ๆ ซึ่งจะแตกต่างกับ Total Antioxidant Capacity [9] ที่จะวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมมากกว่า

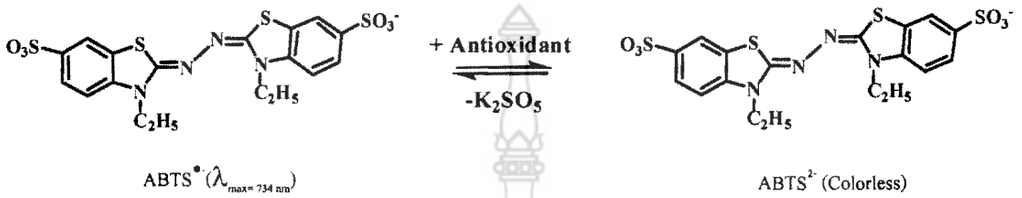
เนื่องจากความซับซ้อนของสารประกอบที่มีอยู่ในอาหารที่เรารับประทานและความสามารถในการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic) ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในอาหารเหล่านั้น นักวิจัยส่วนมากจึงสนใจความสามารถโดยรวมของตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าที่จะไปแยกและทำการวิเคราะห์หาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ซึ่งนอกจากจะเสียเวลา และมีความยุ่งยากแล้วยังไม่ได้บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างแท้จริงตามที่ได้กล่าวไปแล้วอีกด้วย เช่น quercetin และ rutin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่มากในผลไม้เช่น ทับทิม เมื่อสารทั้ง 2 ชนิดอยู่ร่วมกันจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าปรากฏอยู่เดี่ยว ๆ เสียอีก [10]

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Total antioxidant capacity (TAC) จึงเป็นการวัดจำนวนโมลของอนุมูลอิสระที่ถูกจับด้วยสารอนุมูลอิสระทั้งหมดที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง [11]

2.7 ปฏิกิริยาและเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.7.1 วิธี ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

เทคนิคของ ABTS จะทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรายงานในรูปของ Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay (TEAC) ซึ่งถูกรายงานเป็นครั้งแรกโดย Miller *et al.* และต่อมาถูกพัฒนาขึ้นโดย Re *et al.* [12] วิธีนี้จะอาศัยหลักการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระที่เป็นบวกของ 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) ($ABTS^{\bullet+}$) ที่ความยาวคลื่น 660, 734 และ 820 nm โดยการทำออกซิเดชันด้วย potassium persulfate



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาของ ABTS ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

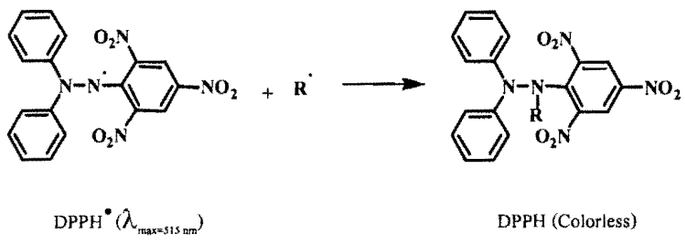
ข้อดีของวิธี ABTS เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย จึงถูกนำมาใช้อย่างมากมายในห้องปฏิบัติการทั่วไปเพราะสามารถวิเคราะห์ในช่วง pH ที่กว้าง $ABTS^{\bullet+}$ สามารถละลายได้ทั้งใน aqueous และ organic solvents จึงสามารถวิเคราะห์ได้ทั้ง hydrophilic และ lipophilic antioxidant แต่วิธีนี้ก็มีข้อเสียคือต้องมีการเติมสารเคมีบางชนิดลงไปเพื่อกระตุ้นให้เกิดอนุมูลขึ้นทำให้การวิเคราะห์ยุ่งยากและซับซ้อนมากขึ้น

2.7.2 วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl)

อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลที่ค่อนข้างเสถียร มีสีม่วงและไม่ต้องมีสารมาทำการออกซิเดชันก่อนเหมือนกับ $ABTS^{\bullet+}$ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งมีสีม่วงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่น Trolox หรือวิตามินซี โดยคำนวณเป็น % $DPPH^{\bullet}_{REM}$

$$\% \ DPPH^{\bullet}_{REM} = 100 \times [DPPH^{\bullet}]_{REM}/[DPPH^{\bullet}]_{T=0}$$

ข้อดีและข้อเสียของวิธี DPPH วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และใช้อุปกรณ์เพียงเครื่อง UV-vis spectrophotometer อย่างไรก็ตามสีม่วงของอนุมูลอิสระก็มักจะถูกรบกวนด้วย Carotenoids ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่หลัก ๆ ในผักและผลไม้ความเกะกะของโครงการทำให้การเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างช้า ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างกับ $DPPH^{\bullet}$ เป็นไปได้ยาก [9]



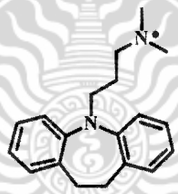
รูปที่ 3 ปฏิกิริยาของ DPPH ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

2.7.3 วิธี Folin Ciocalteu Reagent (FCR)

วิธี Folin-Ciocalteu reagent (FCR) ในบางครั้งจะเรียกว่าวิธี Gallic Acid Equivalence method (GAE) เกิดจากสารละลายระหว่าง phosphomolybdate และ phosphotungstate ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกโดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic Acid สารประกอบฟีนอลิกได้รับความสนใจในการวิเคราะห์เนื่องจากมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร หรือใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มักพบเป็นปริมาณในผลไม้ที่มีสีแดง เช่น องุ่น การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกมีหลายวิธีได้แก่ วิธีการวัดสีแบบสเปกโตรโฟโตเมทรี วิธีโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง วิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง วิธีโครมาโตกราฟีแบบก๊าซ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลเป็นอีกแฟคเตอร์หนึ่งที่สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี

2.7.4 วิธีอิมิพลามีน (Imipramine)

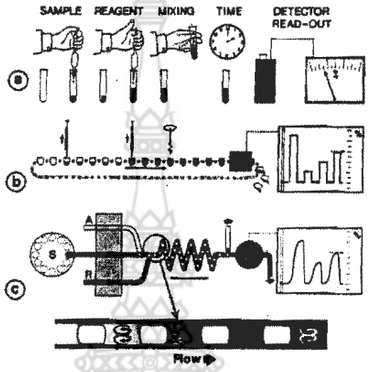
อิมิพลามีนเป็นสารประกอบประเภท tricyclic ซึ่งมีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 4 อิมิพลามีนเมื่อละลายน้ำจะอยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคของ Electron spin resonance (ESR) โดยจะมีสีเป็นสีฟ้า ซึ่งโมเลกุลของอิมิพลามีนนี้จะให้สัญญาณของ ESR ซึ่งจะเสถียรอยู่ถึง 20 วินาที ซึ่งสัญญาณนี้จะสามารถเสถียรอยู่ได้นานขึ้น เมื่อเตรียมในสารละลายกรดซัลฟูริก



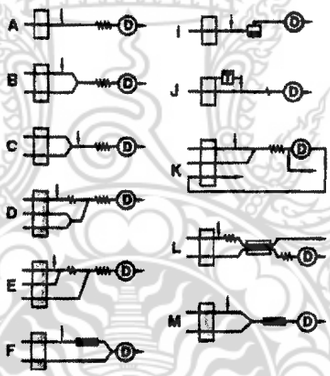
รูปที่ 4 โครงสร้างของอนุมูลอิมิพลามีน

2.8 การวิเคราะห์โดยระบบโฟลอินเจคชัน (Flow injection analysis, FIA)

ในปี ค.ศ. 1975 Ruzicka และ Hansen ได้นำเสนอระบบการวิเคราะห์แบบใหม่คือการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการไหลหรือ Flow injection analysis, FIA หลักการวิเคราะห์จะอาศัยการฉีดสารตัวอย่างลงไปในของเหลวที่มีการไหล ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาและเกิดสารผลิตภัณฑ์ขึ้น และถูกส่งไปยังตัวตรวจวัดอย่างตัวเนื่อง เช่น ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือคุณสมบัติทางกายภาพต่าง ๆ การวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการไหลนี้มีข้อดีอยู่หลายประการได้แก่ เป็นการวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงตรงสูง สามารถลดเวลาในการวิเคราะห์ การควบคุมสภาวะต่าง ๆ ในการทดลองทำได้ง่ายกว่าในระบบ Batch เป็นต้น



รูปที่ 5 a) การวิเคราะห์ในระบบ Batch b) การวิเคราะห์ในระบบ Batch แบบ Autosample และ c) การวิเคราะห์ในระบบ FIA ซึ่งมีความเป็นอัตโนมัติมากที่สุด



รูปที่ 6 Manifold ที่มีการใช้ระบบ FIA

นอกจากนี้ระบบ FIA ยังได้มีการวิวัฒนาการอย่างหลากหลายเพื่อให้การวิเคราะห์มีความเหมาะสมกับปฏิกิริยาหรือเทคนิคที่นำมาวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ หรือนำไปต่อกับอุปกรณ์การวิเคราะห์ชนิดอื่น ๆ เพื่อให้การวิเคราะห์มีความเป็นอัตโนมัติมากยิ่งขึ้นได้แก่ Inductively coupled plasma mass spectrometry –FIA, Atomic absorption spectroscopy–FIA เป็นต้น [13]

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Minioti และคณะได้พัฒนาระบบการวิเคราะห์แบบโฟลอินเจคชันซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความอัตโนมัติ การวิเคราะห์สามารถทำได้อย่างสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของน้ำมันมะกอก โดยใช้ปฏิกิริยาของ horseradish peroxidase (HRP) เป็นตัวเร่งการเกิดออกซิเดชันของ luminol กับ hydrogen peroxide ซึ่งจะทำให้เกิดการเรืองแสง สารสกัด 80-20% (ปริมาตรโดยปริมาตรของ methanol และน้ำ) ของน้ำมันมะกอกปริมาตร 17 µL จะถูกฉีดเข้าสู่ระบบเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากน้ำมันมะกอกจะทำให้ได้สัญญาณการเรืองแสงที่ลดลง เนื่องจากปริมาณของ hydrogen peroxide ที่ลดลงจากการถูกจับกับสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากน้ำมันมะกอก ซึ่งการทดลองจะทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ อัตราเร็วในการไหล ความยาวของ coil และความเข้มข้นของ HRP ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์อยู่ที่ 1.5×10^{-7} M gallic acid และมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 1.0×10^{-6} - 1×10^{-4} M ความเที่ยงของการวิเคราะห์โดยดูจากค่า RSD อยู่ที่ 2.8% และสามารถวิเคราะห์ได้ 180 ตัวอย่างต่อชั่วโมง [14]

L.P. Leong และ G. Shui วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ในประเทศสิงค์โปร์ทั้ง 27 ชนิด โดยใช้เทคนิค ABTS โดยวัดการลดลงของการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ 414 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ด้วยสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้แก่ Ascorbic acid, Trolox hydroquinone และ Pyrogallol และทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างผลไม้เพื่อเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ [15]

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 ชนิดได้แก่ Quercetin, Ascorbic acid และ Trolox ถูกวิเคราะห์โดย Parejo และคณะโดยใช้ปฏิกิริยา Co(II)/ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) เป็นตัวเร่งการเรืองแสงของ luminol และทำการเปรียบเทียบกับปฏิกิริยา 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกันเรียงลำดับดังนี้คือ Quercetin >Trolox>Ascorbic acid [16]

Ukeda และคณะได้ทำการศึกษาวิธีการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่มีความเจาะจง โดยการพัฒนาระบบโฟลอินเจคชันโดยใช้ Electron Spin Resonance (ESR) เป็นตัวตรวจวัดและใช้ปฏิกิริยาของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระโดยใช้สนามแม่เหล็กที่ 335.3 mT ซึ่งเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ DPPH เข้มข้น 0.15 mM จะถูกฉีดเข้าไปใน cell หลังจากที่มีการผสมกับตัวอย่างแล้ว สัญญาณแบบลบจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เท่ากับ 0.01 mM และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 13 ตัวอย่างต่อชั่วโมง [17]

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องแก้ว

- ขวดวัดปริมาตร
- หลอดทดลอง
- บีกเกอร์
- แท่งแก้วคนสาร
- ช้อนตักสารเคมี
- ขวดแก้วทึบแสง
- ขวดเก็บสารตัวอย่างแบบทึบแสง
- ขวดก้นกลม

เครื่องมือ

- เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer รุ่น UV-1700 ยี่ห้อ SHIMADZU
- เครื่องเขย่าสารเคมีในหลอดทดลอง (Vortex) รุ่น VM-300 ยี่ห้อ Gemmy Industrial
- เครื่องชั่งสารเคมี รุ่น GR-200 ยี่ห้อ Diethelm
- Micropipette ยี่ห้อ Brand
- เครื่องทำน้ำปราศจากไอออน รุ่น TKA ยี่ห้อ TKA-GenPure
- เตาอบรุ่น 100-800 ยี่ห้อ Hemmert
- ปั๊มดูด-จ่ายสารละลาย รุ่น BT100-2J ยี่ห้อง longerpump
- Flow though cell
- Ultrasonicate รุ่น 690D ยี่ห้อ CREST
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) รุ่น PLC-012E ยี่ห้อ K university Centrifuge
- Rotary evaporator รุ่น 210/R-215 ยี่ห้อ Buchi

สารเคมี

- Trolox
- Ascorbic acid
- Gallic acid
- DPPH

- Caffeic acid
- H_2SO_4
- Folin-ciocalteu reagent

3.2 วิธีการทดลอง

การเตรียมสารเคมี

ขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมเบื้องต้น (Preliminary test)

3.2.1.1 การศึกษาปฏิกิริยาการใช้ Imipramine (IMI) เป็น probe โดยใช้ NH_4VO_3 เป็นตัวออกซิไดส์

ก. การเตรียมสารเคมี

- Stock solution ของ NH_4VO_3 $1x10^{-2}$ M (Mw=116.98)

ชั่งสารมา 0.0292 g ละลายใน H_2SO_4 10 M 6 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยน้ำ

- Stock solution ของ IMI $4x10^{-3}$ M (Mw=316.87)

ชั่งสารมา 0.0127 g ละลายน้ำเป็น 10 ml

- Stock solution ของ H_2SO_4 10 M (Mw 98.08 d= 1.84 g/ml)

ตวง H_2SO_4 98% w/w มา 136 ml เติมน้ำเป็น 250 ml

- Stock solution ของ Ascorbic acid $2x10^{-3}$ M (Mw=176.13)

ชั่ง 0.0088 g ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น10 ml

ข. วิธีการทดลอง

1. เตรียมอนุมูล IMI โดยการเติม 1 ml ของ Stock solution ของ NH_4VO_3 6 ml ของ Stock solution ของ H_2SO_4 และ 1 ml Stock solution ของ IMI บันทึก spectrum ดูความเสถียร

2. ทดลองปฏิกิริยาระหว่าง IMI กับ Ascorbic acid โดยเติมสารดังตาราง เขย่าเป็นเวลา 5 วินาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่วินาทีที่ 15

หลอดที่	IMI radical (ml)	10 M H_2SO_4 (ml)	Ascorbic acid (ml)
1.	1.0	4.0	0.0
2.	1.0	3.9	0.1
3.	1.0	3.8	0.2
4.	1.0	3.7	0.3
5.	1.0	3.6	0.4

3. แปลผลการทดลอง

ค. ศึกษาความเสถียรของ IMI probe

1. เติม 1 ml ของ IMI radical (1 ml Stock solution ของ NH_4VO_3 6 ml ของ Stock solution ของ H_2SO_4 และ 1 ml Stock solution ของ IMI) ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 10 ml

2. วัดค่าการดูดกลืนแสงจนกระทั่งอนุมูล IMI สลายตัวและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm

3.2.1.2 การศึกษา Parameter ต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อ IMI probe

ก. การศึกษา pH ที่ดีที่สุดต่อความเสถียรของ IMI

การเตรียมสารเคมี

1. เตรียมบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ กันได้แก่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0

2. ชั่ง Na_2SO_4 1.103 g และ NaH_sO_4 0.264 g ละลายน้ำประมาณ 60 ml ปรับ pH แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml

วิธีการทดลอง

1. เตรียมบัฟเฟอร์ตามที่คำนวณ แล้วปรับ pH ด้วย 0.1 M H_2SO_4 และ NaOH ให้ได้ pH ตามต้องการ

2. ทดลองหา pH ที่เหมาะสมที่สุด โดยผสมสารดังตาราง เลือก pH ให้ค่า Abs ที่ 620 nm ที่มากที่สุดและเสถียรที่สุด โดยผสมสารต่าง ๆ เขย่า 15 s วัดที่ 30 s

หลอดที่	pH	IMI radical (ul)	Buffer (ml)	NH_4VO_3 (ml)	Abs
1.	1.0	50	3.75	1.2	0.154
2.	1.5	50	3.75	1.2	0.168
3.	2.0	50	3.75	1.2	0.164
4.	2.5	50	3.75	1.2	0.166
5.	3.0	50	3.75	1.2	0.185

3. แปลผลการทดลอง

ข. ศึกษาความเข้มข้นของ NH_4VO_3

วิธีการทดลอง

1. ทดลองหาเข้มข้นของ NH_4VO_3 ที่เหมาะสมที่สุด โดยผสมสารดังตาราง เลือก pH 3 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ที่มากที่สุดและเสถียรที่สุด โดยผสมสารต่าง ๆ เขย่า 15 s วัดที่ 30 s

หลอดที่	Stock IMI (ul)	Buffer (ml)	$[NH_4VO_3]$ (M)
1.	50	3.75	$4x10^{-5}$
2.	50	3.75	$20x10^{-5}$
3.	50	3.75	$40x10^{-5}$
4.	50	3.75	$60x10^{-5}$
5.	50	3.75	$80x10^{-5}$

2. แปลผลการทดลอง

ค. ศึกษาหาความเข้มข้นของ H_2SO_4

วิธีการทดลอง

1. ทดลองหาเข้มข้นของ H_2SO_4 ที่เหมาะสมที่สุด โดยผสมสารดังตาราง แล้วพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ที่มากที่สุด โดยผสมสารต่าง ๆ เขย่า 15 s วัดที่ 30 s

หลอดที่	Stock IMI (ul)	$[H_2SO_4]$	H_2O (ml)
1.	50	4	2.95
2.	50	5	2.45
3.	50	6	1.95
4.	50	7	1.45
5.	50	8	0.95

2. แปลผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.2.1.3 การศึกษา Parameter ต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อ IMI probe

ก. ศึกษาปริมาณของ NaCl ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

1. ผสมสารดังตาราง ดูค่า Abs ที่ 620 nm เปรียบเทียบกับที่ไม่มีสารรบกวนโดยผสมสารต่าง ๆ เขย่า 15 s วัดที่ 30 s

หลอดที่	[NaCl]	IMI radical (ul)	10 M H_2SO_4 (ml)	H_2O (ml)
1.	0.00	50	3.5	1.45
2.	0.01	50	3.5	0.95
3.	0.05	50	3.5	0.95
4.	0.10	50	3.5	0.95
5.	0.10	50	3.5	0.95
6.	1.00	50	3.5	0.95

2. แปลผลการทดลอง

ข. ศึกษาปริมาณของ Na_2CO_3 ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

1. ผสมสารดังตาราง ดูค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm เปรียบเทียบกับที่ไม่ม่สารรบกวนโดยผสมสารต่าง ๆ เขย่า 15 s วัดที่ 30 s

หลอดที่	[$NaCO_3$]	IMI radical (ul)	10 M H_2SO_4 (ml)	H_2O (ml)
1.	0.00	50	3.5	1.45
2.	0.01	50	3.5	0.95
3.	0.05	50	3.5	0.95
4.	0.10	50	3.5	0.95
5.	0.10	50	3.5	0.95
6.	1.00	50	3.5	0.95

2. แปลผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ค. ศึกษาปริมาณของ NaOH ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

1. ผสมสารดังตาราง ดูค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm เปรียบเทียบกับที่ไม่มีสารรบกวนโดยผสมสารต่าง ๆ เขย่า 15 s วัดที่ 30 s

หลอดที่	[NaOH]	IMI radical (ul)	10 M H_2SO_4 (ml)	H_2O (ml)
1.	0.00	50	3.5	1.45
2.	0.01	50	3.5	0.95
3.	0.05	50	3.5	0.95
4.	0.10	50	3.5	0.95
5.	0.10	50	3.5	0.95
6.	1.00	50	3.5	0.95

2. แปลผลการทดลอง

3.2.2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมจากปฏิกิริยาที่เลือกไว้

ก. ทดลองหา % Radical Scavenging ของ Ascorbic acid โดยใช้ IMI เป็น probe

วิธีการทดลอง

1. ผสมสารดังตาราง ดูค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm เปรียบเทียบกับที่ไม่มีสารรบกวนโดยผสมสารต่าง ๆ เขย่า 15 s วัดที่ 30 s

หลอดที่	[Asc]	IMI radical (ul)	10 M H_2SO_4 (ml)	H_2O (ml)	Asc (ml)
1.	0.00	50	3.5	0.95	0.5
2.	1.25	50	3.5	0.95	0.5
3.	2.50	50	3.5	0.95	0.5
4.	3.50	50	3.5	0.95	0.5
5.	6.00	50	3.5	0.95	0.5

2. คำนวณ % Radical Scavenging จากสูตร

$$\% \text{ Radical Scavenging} = [(A_{control}-A_{sample})/A_{control}]x100$$

$A_{control}$ =ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มี antioxidant

A_{sample}=ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมี antioxidant ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.2.3 การทดสอบความเสถียรของอนุมูล IMI

วิธีการทดลอง

1. ผสม 1 ml ของ Stock solution ของ NH_4VO_3 และ 6 ml ของ 10 M H_2SO_4 ตามด้วย 1 ml ของ Stock solution ของ IMI วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ทันทีเทียบกับเวลา

3.2.4 วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Method validation)

3.2.4.1 วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH)

ก. การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย 1 mM DPPH (Mw=394.32)

ชั่ง DPPH 0.0400 g ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย 80% v/v (เมทานอล 80 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 ml) เมทานอล คนสารละลายเป็นเวลา 40 นาทีวัดค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ประมาณ 1.000 ที่ 517 nm โดยการปิเปต 1 mM DPPH 25 ml ปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วย 80% v/v เมทานอล

2. สารละลาย Ascorbic acid 100 mg vitamin C/L (Mw 176.13)

ชั่ง Ascorbic acid 0.0250 g ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 250 ml เก็บไว้ในขวดทึบแสง เตรียมสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 100 ppm ดังตารางโดยการปิเปต Ascorbic acid 100 ppm 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 10 ml

ข. วิธีการทดลอง

1. วัดสเปคตรัมของสารละลาย DPPH เพื่อหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนสูงสุด (λ_{max})

2. เติม 50 µL ของสารละลาย Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือสารตัวอย่าง ในสารละลาย DPPH 2.95 mL คนสารละลาย 15 วินาที ทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืดแล้ววัดค่าการดูดกลืนดังตารางเวลาการเติมสารต่อไปนี้

ตารางที่ 1 เวลาการเติมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยเทคนิค DPPH

ตัวอย่างที่	นาทีที่		
	เติม Ascorbic acid/ ตัวอย่าง	หยุดคนสารละลาย	วัดค่าการดูดกลืนแสง
1	1.15	1.30	31.15
2	3.15	3.30	33.15
3	5.15	5.30	35.15
4	7.15	7.30	37.15
5	9.15	9.30	39.15
6	11.15	11.30	41.15
7	13.15	13.30	43.15
8	15.15	15.30	45.15
9	17.15	17.30	47.15
10	19.15	19.30	49.15
11	21.15	21.30	51.15
12	23.15	23.30	53.15
13	25.15	25.30	55.15
14	27.15	27.30	57.15
15	29.15	29.30	59.15

3.2.4.2 วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย Folin Ciocalteu Reagent (FCR)

ก. การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย Folin ciocalteu reagent 10 % v/v

ปิเปต Folin ciocalteu reagent 20 ml ปรับปริมาตรเป็น 200 ml

2. สารละลาย Sodium carbonate

ชั่ง Na_2CO_3 37.5095 $\pm$ 0.01 g ในขวดปริมาตร 500 ml เติมน้ำอุ่นประมาณ 250 ml ละลาย Na_2CO_3 จนหมด ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 500 ml (เก็บไว้ใช้ได้ 1 เดือน)

3. สารละลาย Stock ของ gallic acid

ชั่ง gallic acid (Mw= 188.14) จำนวน 0.110$\pm$0.001 ในขวดวัดปริมาตร 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำ เตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ขวดที่	ปริมาตร (ml)	ความเข้มข้น as gallic equivalent
A	1	11
B	2	22
C	3	33
D	4	44
E	5	55

ขั้นตอนการทดลอง

1. เติมสารเคมี A-E และน้ำกลั่นเพื่อทำเป็น blank ในแต่ละหลอดทดลองอย่างละ 1 ml
2. เติมสารละลาย Folin ciocalteu reagent 5 ml เขย่า
3. จับเวลา 5 นาที
4. เติม Na_2CO_3 4 ml ตั้งทิ้งไว้ 1 ช.ม. สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าถึงสีน้ำเงินตามปริมาณของฟีนอลิก แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ลำดับเวลาในการเติมสารเป็นดังตาราง

ตารางที่ 2 เวลาการเติมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยเทคนิค Folin Ciocalteu Reagent (FCR)

นาทีที่				
ตัวอย่างที่	**เติม Folin**		**เติม Na_2CO_3**	**วัดค่าการดูดกลืนแสง**
1	0	2	7	67
2	4	6	11	71
3	8	10	15	75
4	12	14	19	79
5	16	18	23	83
6	20	22	27	87
7	24	26	31	91
8	28	30	35	95
9	32	34	39	99
10	36	38	43	103
11	40	42	47	107
12	44	46	51	111
13	48	50	55	115
14	52	54	59	119
15	56	58	63	123
16	60	62	67	127
17	64	66	71	131
18	68	70	75	135
19	72	74	79	139
20	76	78	83	143
21	80	82	87	147
22	84	86	91	151
23	88	90	95	155
24	92	94	99	159
25	96	98	103	163

3.2.5 การพัฒนาการวิเคราะห์ในระบบโฟลอินเจคชัน (Flow injection analysis, FIA)

3.2.5.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม

ก. การเตรียมสารเคมี

- Stock solution ของ IMI

ชั่ง imipramine มา 0.0127 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 10 ml

เจือจาง Stock solution ของ IMI 10 เท่าด้วยน้ำแล้วนำไปใช้ในการวิเคราะห์

- Stock solution ของ 10 M H_2SO_4

ตวง 98% H_2SO_4 มา 136 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 250 ml

- Stock solution ของ Gallic acid 10,000 ppm

ชั่ง Gallic acid มา 0.2500 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 25 ml

- Stock solution ของ Ascorbic acid 10,000 ppm

ชั่ง Ascorbic acid มา 0.2500 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 25 ml

- Stock solution ของ Caffeic acid 1,000 ppm

ชั่ง Ascorbic acid มา 0.2500 g เติม MeOH 50 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 ml

- Stock solution ของ Catechin 1,000 ppm

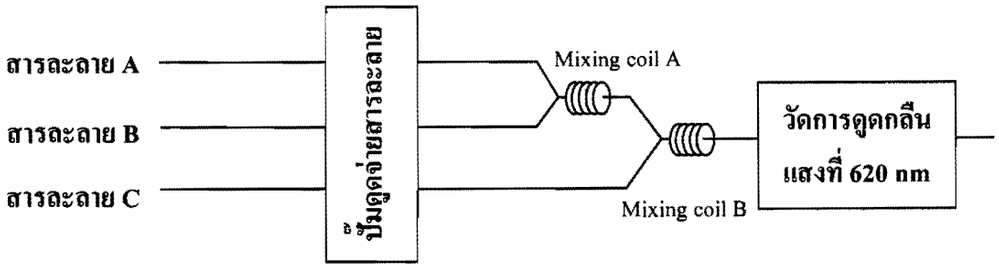
ชั่ง Catechin มา 0.2500 g เติม MeOH 50 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 ml

- Stock solution ของ Trolox 1,000 ppm

ชั่ง Trolox มา 0.2500 g เติม MeOH 50 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 ml

ข. การวิเคราะห์

ระบบโฟลอินเจคชันที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 7 ซึ่งประกอบไปด้วยปั๊มดูดจ่ายสารละลาย และเครื่องยูวีสเปคโตรมิเตอร์เพื่อใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดยเมื่อเริ่มการวิเคราะห์ปั๊มดูดจ่ายสารละลายจะทำการดูดสารละลายทั้ง 3 ชนิดคือสารละลาย A คือสารละลาย NH_4VO_3 ซึ่งเตรียมในกรดซัลฟูริกสารละลาย B คือสารละลายอิมิพลามีน และสารละลาย C คือน้ำกลั่นหรือสารตัวอย่าง โดยเมื่อสารละลาย A และสารละลาย B เกิดการผสมกันจะเกิดอนุมูลอิสระของอิมิพลามีนซึ่งมีสีฟ้าและเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างในสารละลาย C อนุมูลอิสระของอิมิพลามีนจะถูกจับทำให้สีฟ้าจางหายไปโดยการตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ก็จะสามารถวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้



รูปที่ 7 ระบบโฟลอินเจคชันที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

3.2.5.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้แก่ Gallic acid, Trolox, Ascorbic acid, Caffeic acid แล้วฉีดเข้าสู่ระบบ พลอตความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging และความเข้มข้นของสารมาตรฐานและเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมกับ Ascorbic acid

3.2.5.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์คือสารสกัดจากต้นคำมอกหลวงที่ส่วนสกัด (Fraction) 3 ส่วนเพื่อช่วยในการตัดสินใจในการเลือกส่วนสกัดในการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานานการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่างเป็นดังนี้

ก. การสกัดสารตัวอย่าง

วิธีการสกัดแสดงตาม *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1161–1164 โดยนำมาสกัดด้วยเมทานอล เป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาระเหยเอาเมทานอลออก ทำการเติมน้ำแล้วนำส่วนสกัดที่ได้ไปแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

S_1 นำสารละลายมา 1 ml เจือจางด้วยเมทานอล 10 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 25 ml

S_2 นำสารละลายมา 1 ml เจือจางด้วยเมทานอล 4 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 10 ml

S_3 นำสารละลายมา 2.5 ml เจือจางด้วยเมทานอล 4 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 10 ml

ข. การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

นำสารสกัดที่ได้มาฉีดเข้าสู่ระบบโฟลอินเจคชัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm

3.3 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.3.1 ค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$)

3.3.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

3.3.3 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

3.4 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2553- 30 กันยายน 2554

3.5 สถานที่ทำการทดลอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

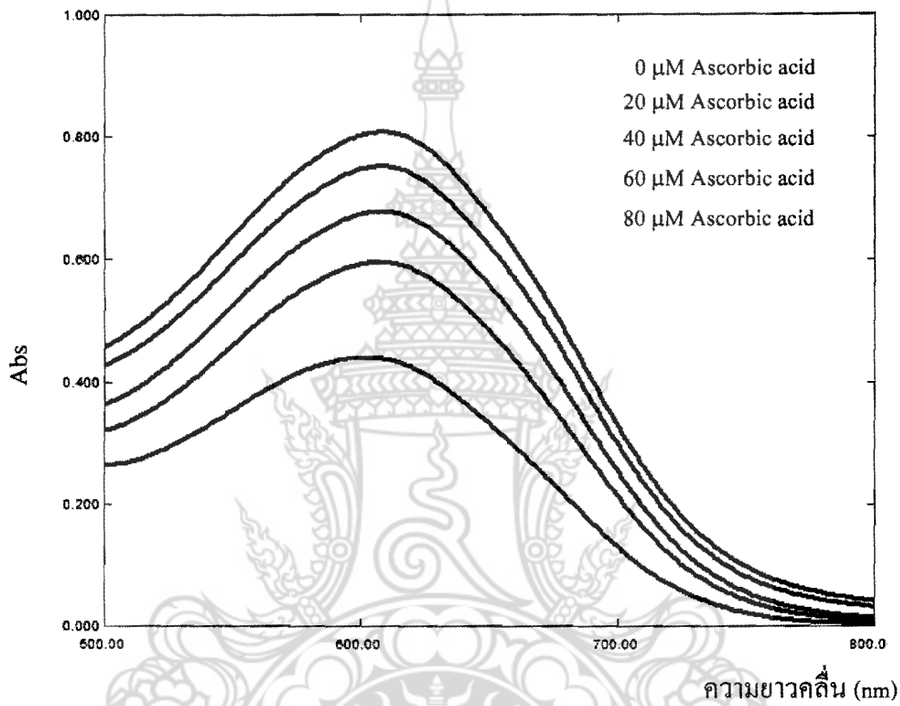
บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมเบื้องต้น (Preliminary test)

4.1.1 การศึกษาปฏิกิริยาการใช้ Imipramine (IMI) เป็น probe โดยใช้ NH_4VO_3 เป็นตัวออกซิไดส์

ก. ศึกษาความเสถียรของ IMI probe

ผลการทดลองปฏิกิริยาระหว่างอนุมูล IMI กับ ascorbic acid เป็นดังแสดงตามในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาของอนุมูล IMI กับ Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยพิจารณาจาก % Radical Scavenging ซึ่งหาได้จากสมการต่อไปนี้

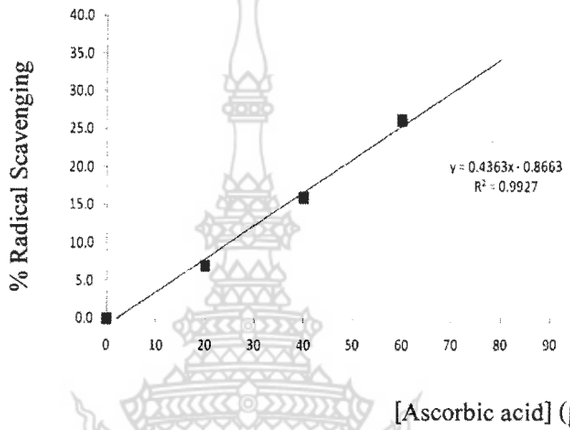
$$\% \text{ Radical Scavenging} = [(A_{control}-A_{sample})/A_{control}]x100$$

$A_{control}$ =ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มี antioxidant

A_{sample}=ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมี antioxidant ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 3 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Ascorbic acid และ% Radical Scavenging

Ascorbic acid (uM)	Abs	% Radical Scavenging
0.00	0.81	0.00
20.00	0.75	6.90
40.00	0.68	15.80
60.00	0.60	26.10
80.00	0.44	45.70



รูปที่ 9 การหายไปของอนุมูล IMI radical เมื่อเติม ascorbic acid ที่ 0-80 μM

4.1.2 การศึกษา Parameter ต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อ IMI probe

ก. การศึกษา pH ที่ดีที่สุดต่อความเสถียรของอนุมูล IMI

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง pH และค่าการดูดกลืนแสง

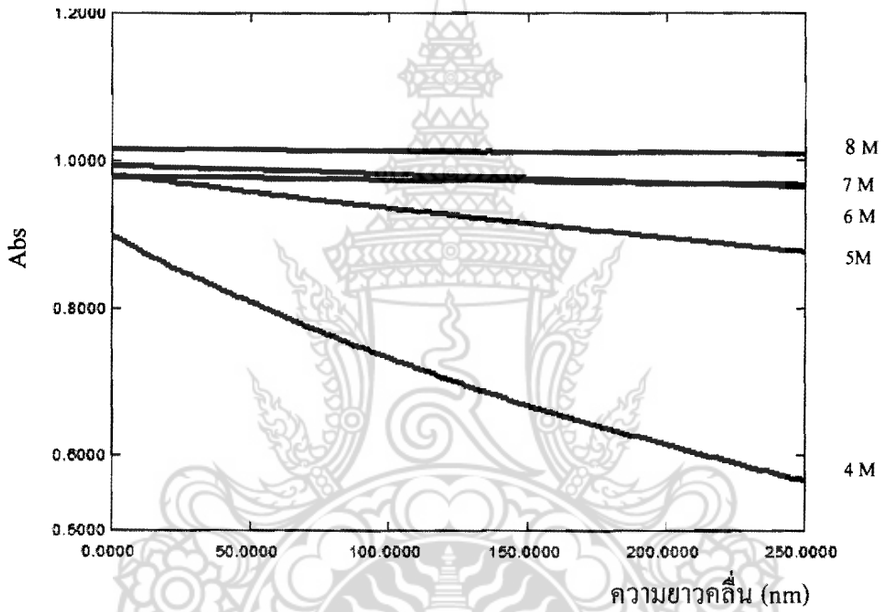
pH	Abs
1.0	0.154
1.5	0.168
2.0	0.164
2.5	0.166
3.0	0.185

ข. ศึกษาความเข้มข้นของ NH_4VO_3

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ NH_4VO_3 กับค่าการดูดกลืนแสง

หลอดที่	Stock IMI (ul)	Buffer (ml)	$[NH_4VO_3]$ (M)	Abs
1.	50	3.75	$4x10^{-5}$	0.079
2.	50	3.75	$20x10^{-5}$	0.064
3.	50	3.75	$40x10^{-5}$	0.065
4.	50	3.75	$60x10^{-5}$	0.061
5.	50	3.75	$80x10^{-5}$	0.067

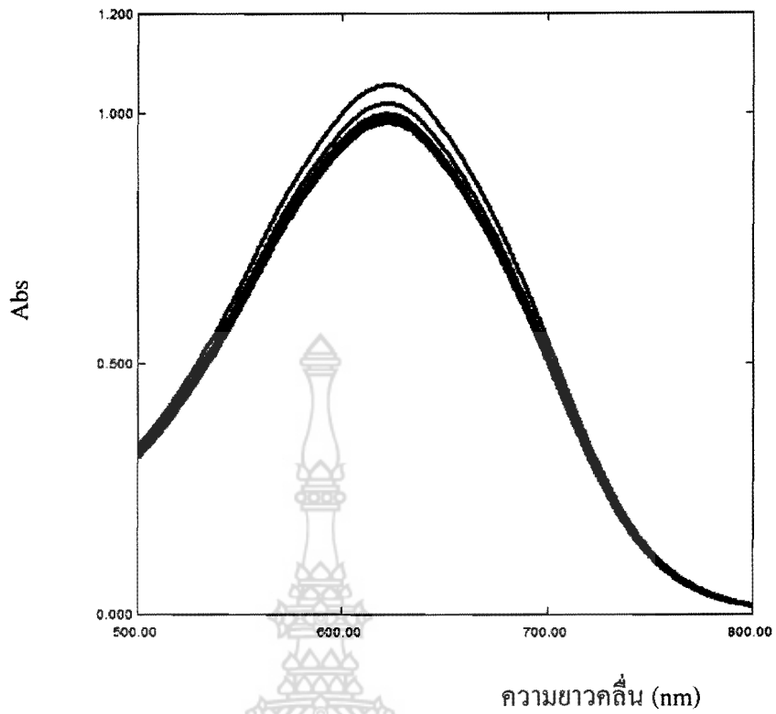
ค. ศึกษาหาความเข้มข้นของ H_2SO_4



รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกแตกต่างกัน

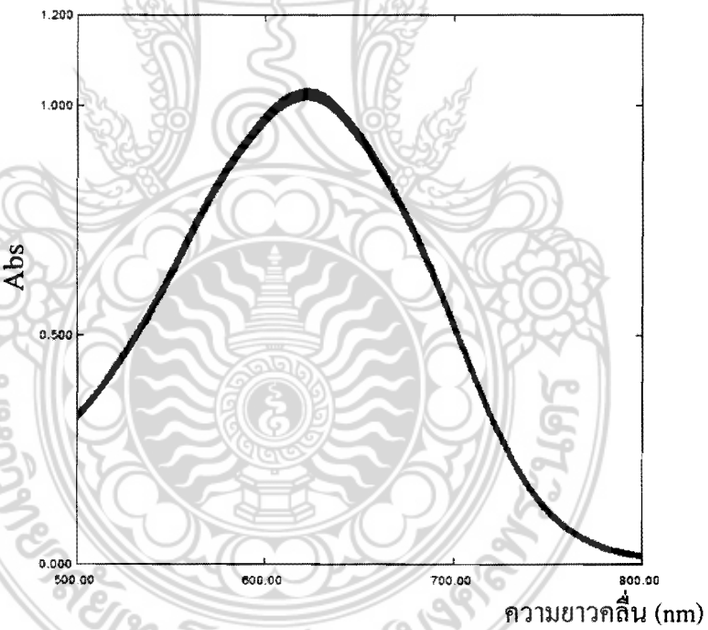
4.1.3 การศึกษา Parameter ต่าง ๆ ที่ส่งผลต่ออนุมูล IMI probe

ก. ศึกษาปริมาณของ NaCl ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์



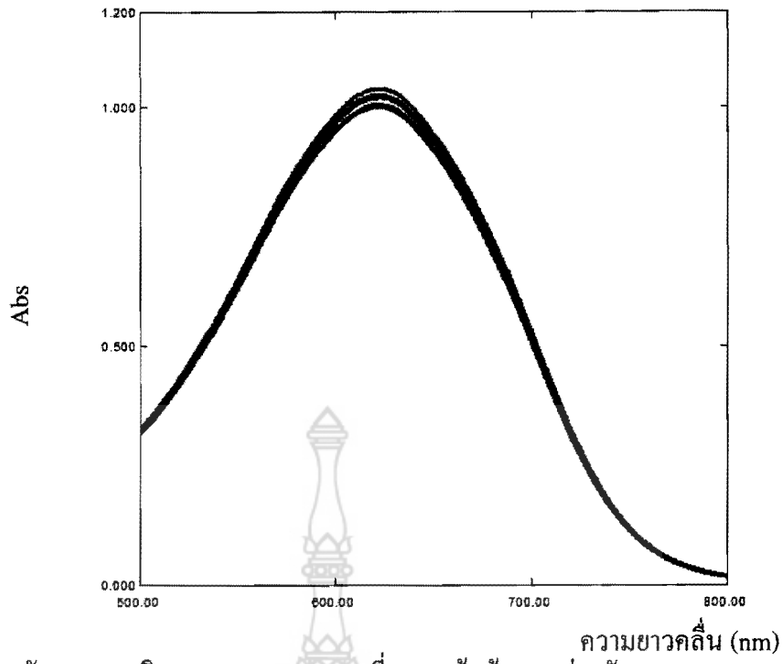
รูปที่ 11 สเปคตรัมจากการเติมสารรบกวน NaCl ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ข. ศึกษาปริมาณของ Na_2CO_3 ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์



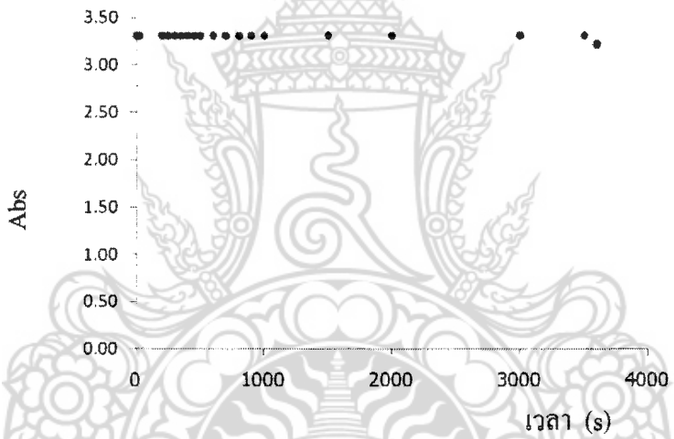
รูปที่ 12 สเปคตรัมจากการเติมสารรบกวน Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ค. ศึกษาปริมาณของ NaOH ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์



รูปที่ 13 สเปคตรัมจากการเติมสารรบกวน NaOH ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

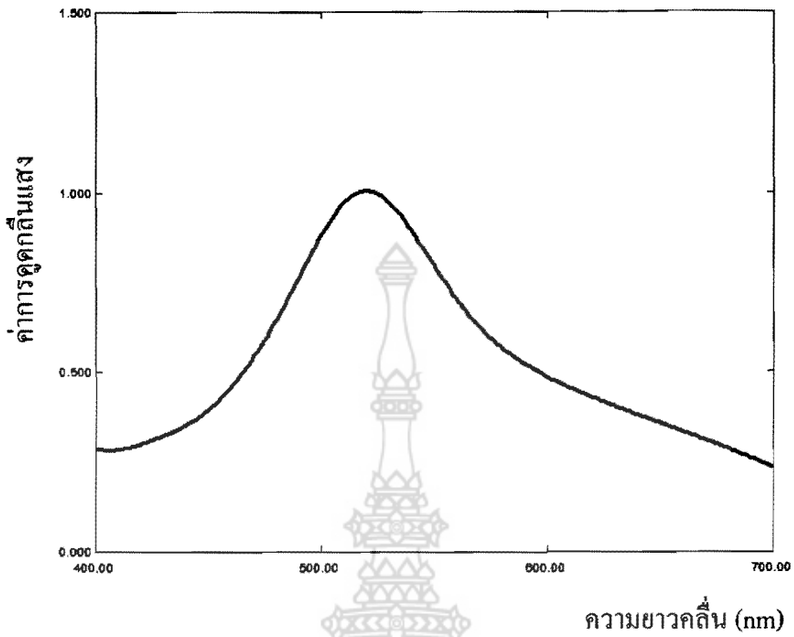
4.2 การศึกษาความเสถียรของอนุมูล IMI



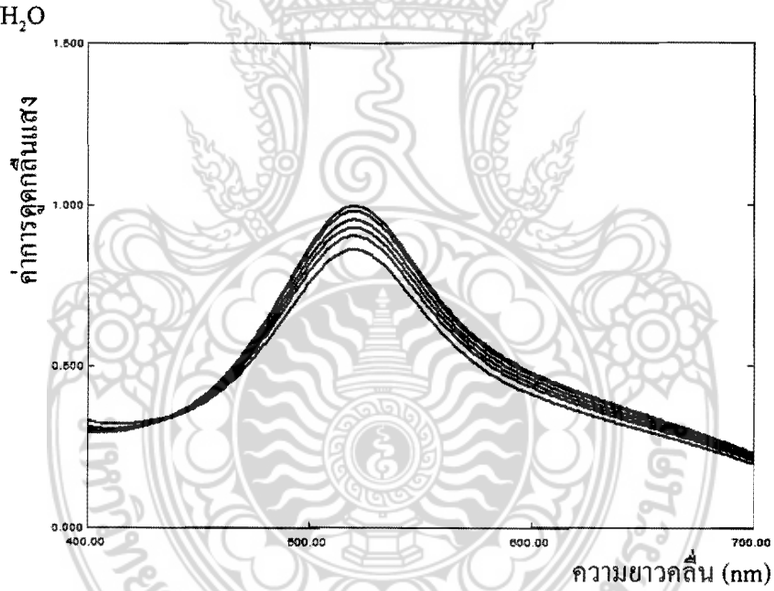
รูปที่ 14 ค่า Absorbance ของ IMI radical โดยการเติม 1 ml Stock solution ของ NH_4VO_3 6 ml ของ Stock solution ของ H_2SO_4 และ 1 ml Stock solution ของ IMI

4.3 วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Method validation)

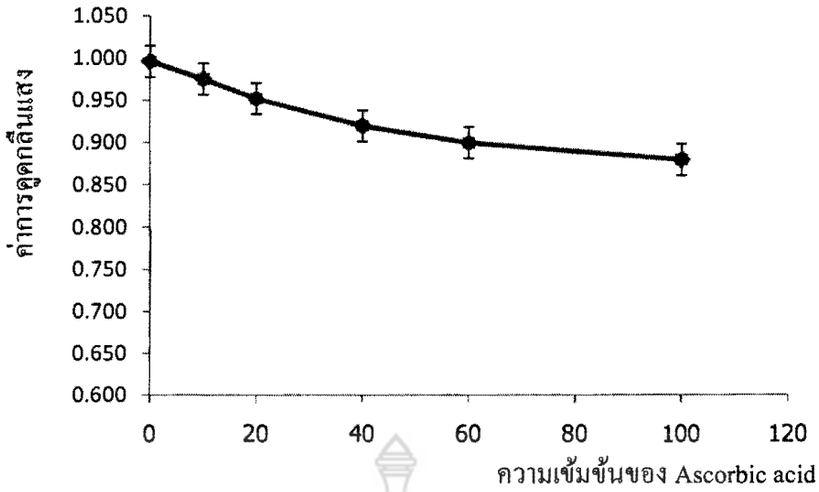
4.3.1 วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH)



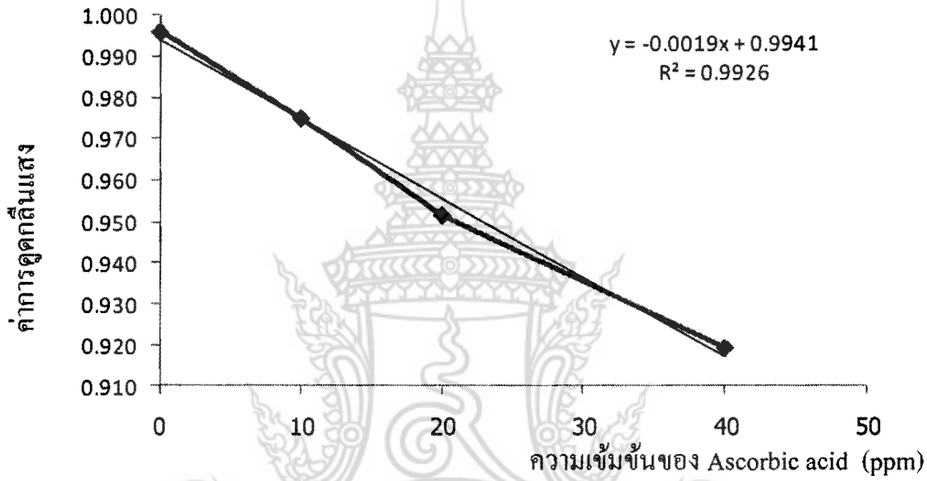
รูปที่ 15 สเปคตรัมของ DPPH นำจาก Stock มา 25 ml ปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วย 80 % MeOH/H_2O



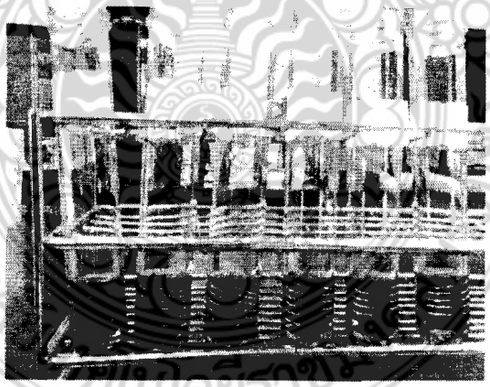
รูปที่ 16 สเปคตรัมการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH เมื่อเติม Ascorbic acid 0-100 ppm



รูปที่ 17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Ascorbic acid



รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid



รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูล DPPH เมื่อเติม Gallic acid ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูล DPPH เมื่อเติมสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด

ตารางที่ 6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างโดยวิธีมาตรฐาน DPPH

ตัวอย่าง	as mg Asc/L
S1	321.32±25.92
S2	43.04±2.90
S3	39.35±4.78

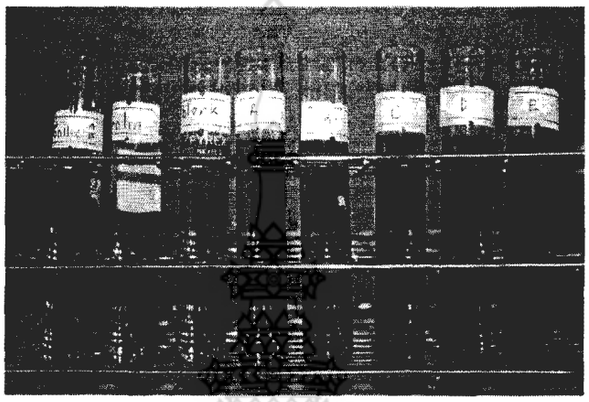
4.3.2 วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย Folin Ciocalteu Reagent (FCR)

ตารางที่ 7 ผลการทดลองการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดย Folin Ciocalteu

ตัวอย่างที่	Abs			Average	SD	%RSD
s1	0.844	0.862	0.861	0.86	0.01	1.18
s2	0.422	0.423	0.431	0.43	0.00	1.16
s3	0.380	0.354	0.360	0.36	0.01	3.73
(S1 dil 5 fold)	0.497	0.506	0.515	0.51	0.01	1.78

ตารางที่ 8 % Polyphenol ในตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง

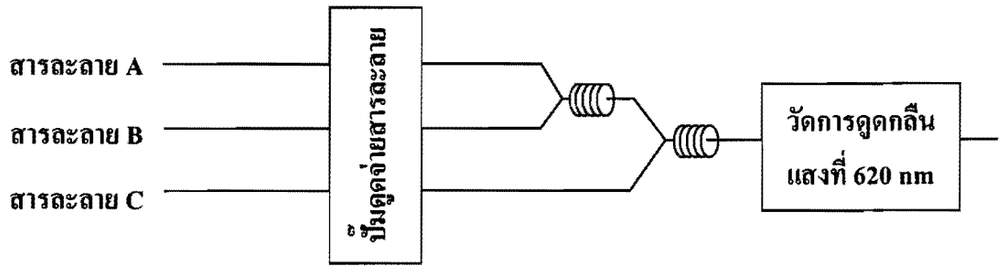
ตัวอย่างที่	% polyphenol as ug gallic acid/L					
	1	2	3	Average	SD	%RSD
s1	68737.32	70018.14	71298.96	70018.14	1280.82	1.83
s2	11612.76	11641.23	11868.93	11707.64	140.40	1.20
s3	10417.33	9677.30	9848.08	9980.91	387.48	3.88



รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงสีของ Folin Ciocalteu เมื่อเติม Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

4.4 การพัฒนาการวิเคราะห์ในระบบโฟลอินเจคชัน (Flow injection analysis)

ระบบโฟลอินเจคชันที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 20 ซึ่งประกอบไปด้วยปั๊มดูดจ่ายสารละลาย และเครื่องยูวีสเปคโตรมิเตอร์เพื่อใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดยเมื่อเริ่มการวิเคราะห์ปั๊มดูดจ่ายสารละลายจะทำการดูดสารละลายทั้ง 3 ชนิดคือสารละลาย Aคือ สารละลาย NH_4VO_3 ในกรดซัลฟูริกสารละลาย B คือสารละลายอิมิพลามีน และสารละลาย C คือน้ำกลั่นหรือสารตัวอย่าง โดยเมื่อสารละลาย A และสารละลาย B เกิดการผสมกันจะเกิดอนุมูลอิสระของอิมิพลามีนซึ่งมีสีฟ้าและเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างในสารละลาย C อนุมูลอิสระของอิมพิพลามีนจะถูกจับทำให้สีฟ้าจางหายไปโดยการตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ก็จะสามารถวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้



รูปที่ 22 ระบบโฟลอินเจคชันที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

4.4.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม

จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองเป็นดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สถาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมโดยเทคนิคโฟลอินเจคชัน

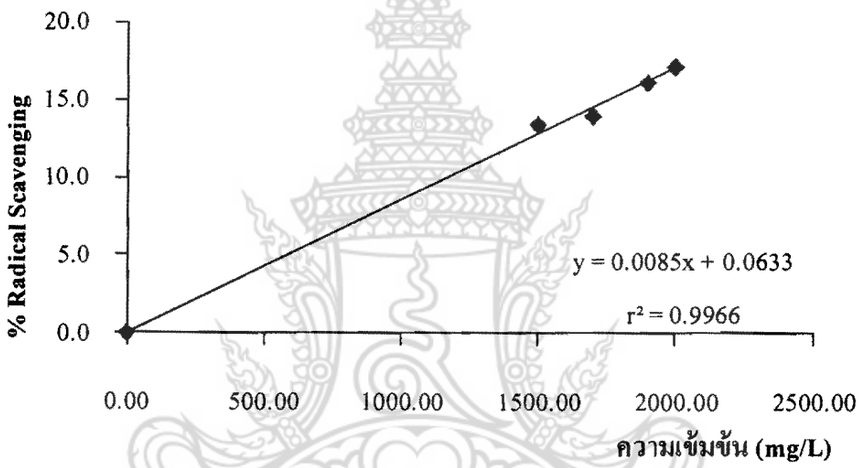
พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
ความเข้มข้นของสารละลาย A (NH_4VO_3)	2,000 mg/L
ความเข้มข้นของสารละลาย B (Imipramine)	100 mg/L
ความเข้มข้นของสารละลาย C (mg/L)	
Ascorbic acid	0-2000
Gallic acid	0-1700
Caffeic acid	0-150
Trolox	0-2800
อัตราเร็วในการไหลของสารละลาย (ml/min)	
-สารละลาย A	1.5
-สารละลาย B	1.5
-สารละลาย C	2.0
ความยาวของ mixing coil A (cm^3)	30
mixing coil B (cm^3)	30

4.4.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของสารมาตรฐาน

วิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดได้แก่ Ascorbic acid, Gallic acid, Caffeic acid และ Trolox ผลการทดลองเป็นดังแสดง

ตารางที่ 10 % Radical Scavenging ของ Ascorbic acid

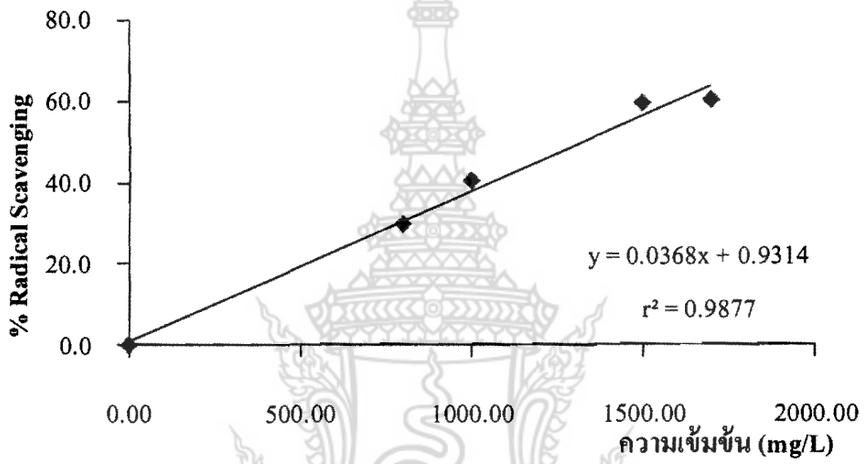
ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง			เฉลี่ย	SD	%RSD	% Radical Scavenging
0.00	0.509	0.613	0.613	0.578	0.060	10.38	0.00
1500	0.499	0.501	0.503	0.501	0.002	0.40	13.37
1700	0.498	0.497	0.498	0.498	0.001	0.12	13.95
1900	0.484	0.486	0.486	0.485	0.001	0.24	16.08
2000	0.476	0.481	0.481	0.479	0.003	0.60	17.12



รูปที่ 23 % Radical Scavenging ของ Ascorbic acid

ตารางที่ 11 % Radical Scavenging ของ Ascorbic acid

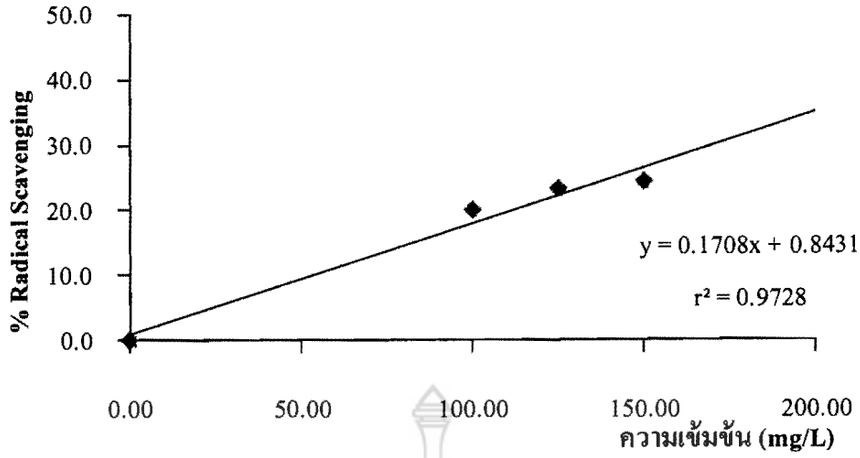
ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง			เฉลี่ย	SD	%RSD	% radical scavenging
0.00	0.613	0.613	0.613	0.6130	0.000	0.00	0.00
800	0.434	0.430	0.431	0.4317	0.000	0.48	29.60
1000	0.345	0.355	0.399	0.3663	0.030	7.84	40.20
1500	0.247	0.250	0.254	0.2503	0.000	1.40	59.20
1700	0.245	0.246	0.247	0.2460	0.001	0.41	59.90



รูปที่ 24 % Radical Scavenging ของ Gallic acid

ตารางที่ 12 % Radical Scavenging ของ Caffeic acid

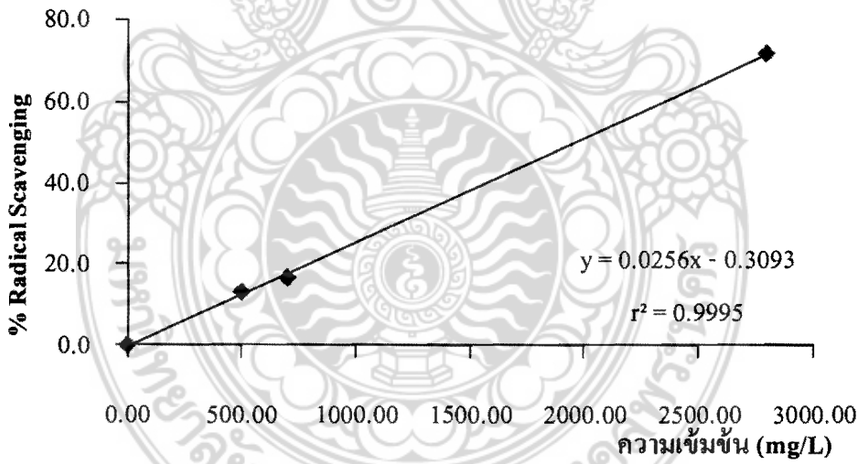
ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง			เฉลี่ย	SD	%RSD	% radical scavenging
0.00	0.707	0.701	0.697	0.7017	0.005	0.72	0.00
100	0.561	0.562	0.562	0.5617	0.001	0.10	19.95
125	0.540	0.539	0.538	0.5390	0.001	0.19	23.18
150	0.533	0.529	0.532	0.5313	0.002	0.39	24.28



รูปที่ 25 % Radical Scavenging ของ Caffeic acid

ตารางที่ 13 % Radical Scavenging ของ Trolox

ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง			เฉลี่ย	SD	%RSD	% radical scavenging
0.00	0.707	0.701	0.697	0.702	0.005	0.72	0.00
500.00	0.610	0.611	0.609	0.610	0.001	0.16	13.06
700.00	0.586	0.585	0.586	0.586	0.001	0.12	16.56
2800.00	0.198	0.201	0.199	0.200	0.001	0.71	71.50



รูปที่ 26 % Radical Scavenging ของ Trolox

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดได้แก่ Ascorbic acid, Gallic acid, Caffeic acid, Trolox กับอนุมูล IMI ผลการทดลองเป็นดังแสดง

ตารางที่ 14 สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด

สารมาตรฐาน	สมการเส้นตรง	r^2
Ascorbic acid	y = 0.0085x + 0.0633	0.9966
Gallic acid	y = 0.0368x + 0.9314	0.9877
Caffeic acid	y = 0.1708x + 0.8431	0.9728
Trolox	y=0.0256x-0.093	0.9995

4.2.4.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง

การตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์คือสารสกัดจากต้นคำมอกหลวงที่ส่วนสกัด (Fraction) 3 ส่วนเพื่อช่วยในการตัดสินใจในการเลือกส่วนสกัดในการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน ผลการทดลองเป็นดังแสดง

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูล IMI เมื่อเติมสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด

ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง			เฉลี่ย	SD	%RSD
S1	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00	0.12
S2	0.51	0.51	0.51	0.51	0.00	0.23
S3	0.53	0.52	0.53	0.52	0.00	0.80

ตารางที่ 16 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด

ตัวอย่าง	TAC (As mg Trolox/L)
S1	13264.50
S2	4630.10
S3	1491.08

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ทดสอบหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมเบื้องต้น (Preliminary test)

ในเบื้องต้นได้ทำการทดสอบปฏิกิริยาที่ได้ทำการคิดค้นมาใหม่คือปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิมพลามีนและสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าอนุมูลอิมิพลามีนมีแนวโน้มที่ดีในการนำมาทำเป็น Probe เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีสีที่ชัดเจน สีที่เกิดขึ้นเป็นสีฟ้า และทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็ว

5.1.2 การศึกษา Parameter ต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อ IMI probe

ก. การศึกษา pH ที่ดีที่สุดต่อความเสถียรของอนุมูล IMI

จากการทดลอง Vary pH ของสารละลายและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิมิพลามีนพบว่าสารละลายตั้งแต่ pH 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน

ข. ศึกษาความเข้มข้นของ NH_4VO_3

จากการทดลอง Vary ความเข้มข้นของ NH_4VO_3ของสารละลายและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิมิพลามีนพบว่าความเข้มข้นของ NH_4VO_3 สารละลายตั้งแต่ $4x10^{-5}$, $20x10^{-5}$, $40x10^{5}$, $60x10^{-5}$ และ $80x10^{-5}$ M พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน

ค. ศึกษาหาความเข้มข้นของ H_2SO_4

ความเข้มข้นของ H_2SO_4 ส่งผลต่อการเกิดอนุมูลอิมิพลามีนเป็นอย่างมาก ยิ่งมีความเข้มข้นมากอนุมูลอิมิพลามีนก็จะเกิดขึ้นได้มากโดยสังเกตจากสีฟ้าที่ขึ้น และจะเสถียรอยู่ได้นานขึ้น

5.1.3 การศึกษา Parameter ต่าง ๆ ที่ส่งผลต่ออนุมูล IMI probe

ก. ศึกษาปริมาณของ NaCl ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อการรบกวนโดยการเติมสารละลาย NaCl ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันได้แก่ 0.0, 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 M พบว่าการดูดกลืนแสงไม่มีการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ถึง 1.0 M ถึงเห็นการเปลี่ยนแปลง

ข. ศึกษาปริมาณของ Na_2CO_3 ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อการรบกวนโดยการเติมสารละลาย Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันได้แก่ 0.0, 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 M พบว่าการดูดกลืนแสงไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ค. ศึกษาปริมาณของ NaOH ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

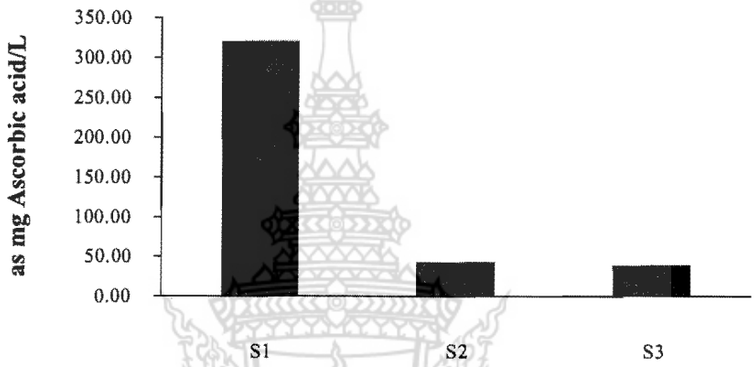
จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อการรบกวนโดยการเติมสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันได้แก่ 0.0, 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 M พบว่าการดูดกลืนแสงไม่มีการเปลี่ยนแปลง

5.1.4 การศึกษาความเสถียรของอนุมูล IMI

จากการทดลองศึกษาความเสถียรของอนุมูลอิมิพลามีนที่ได้จากการทดลองพบว่าอนุมูลอิสระอิมิพลามีนสามารถเสถียรอยู่ได้ถึง 3000 s

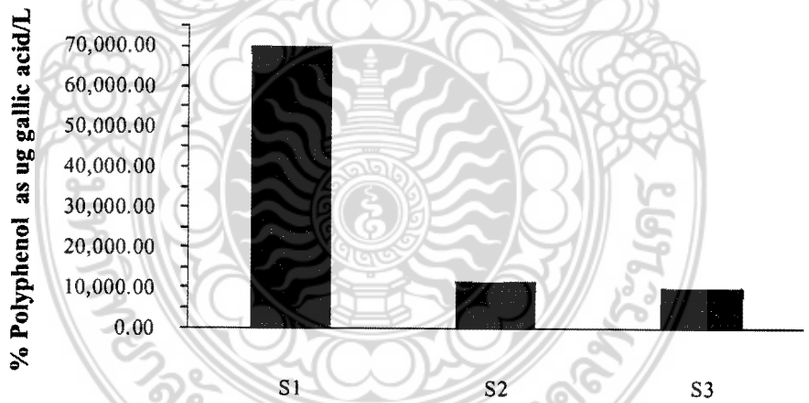
5.1.5 วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Method validation)

ก. วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH)



รูปที่ 27 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH)

ข. วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย Folin Ciocalteu Reagent (FCR)



รูปที่ 28 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย Ciocalteu Reagent (FCR)

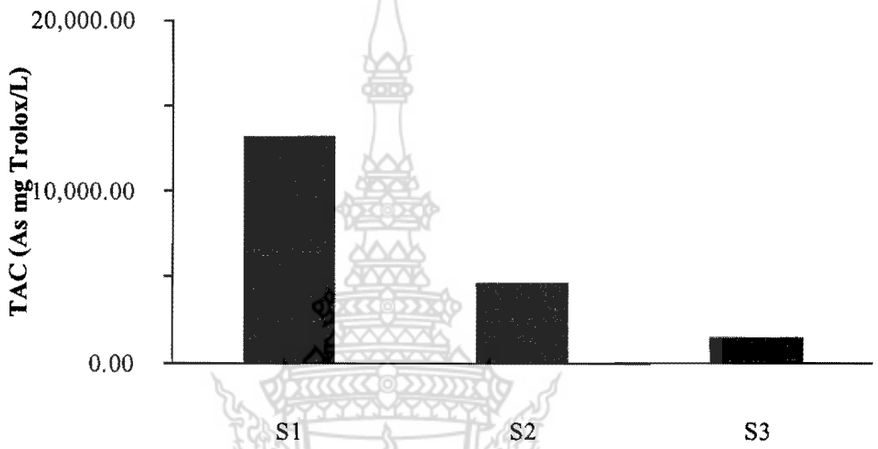
5.1.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อนุมูลอิสระ

ก. สารมาตรฐาน

จากระบบโฟลอินเจคชันที่พัฒนาขึ้นทำมาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูอิสระของสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 4 ชนิดได้แก่ Ascorbic acid, Gallic acid Caffeic acid และ Trolox ผลการทดลองสรุปได้ว่าสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเรียงลำดับดังนี้คือ Caffeic acid> Gallic acid>Trolox>Ascorbic acid

ข. สารตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดคำมอกหลวงทั้ง 3 ส่วนสกัดถูกทำมาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จากการทดลองพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเรียงลำดับดังนี้คือ $S_1>S_2>S_3$



รูปที่ 29 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยอนุมูลอิมิพลามีน

5.2 อภิปรายผล

จากการทดลองหาวิธีในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยพัฒนาอนุมูลชนิดใหม่ขึ้นมาคืออนุมูลอิมิพลามีน พบว่าอนุมูลที่คิดค้นขึ้นมาใหม่นี้มีประสิทธิภาพในการเป็น probe ได้ดีโดยมีข้อดีที่เหนือกว่า probe เดิม ๆ ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือ

1. มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา

2. สีของอนุมูลคือสีฟ้า ซึ่งทำให้ไม่เกิดการรบกวนจากสีของตัวอย่างเนื่องจากตัวอย่างส่วนมากไม่มีสีฟ้า

3. การเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิมิพลามีนกับสารต้านอนุมูลอิสระมีความเส้นตรงทำให้สามารถประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้

4. อนุมูลอิมิพลามีนเป็นอนุมูลที่ไม่เป็นพิษ ไม่มีอันตรายต่อผู้ทดลองและสิ่งแวดล้อม

นอกจากนี้เมื่อได้อนุมูลอิมิพลามีนแล้วมีการประยุกต์ใช้เทคนิคโฟลอินเจคชั่นเพื่อให้การวิเคราะห์มีความแม่นยำ สะดวก และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

สรุปในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีใหม่โดยใช้อนุมูลอิมิพลามีนในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบว่ามีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถลดระยะเวลาในการตัดสินใจในการเลือกส่วนสกัดแต่ละส่วนมาทำการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนสกัดจากคำมอกหลวงพบว่าส่วนสกัดที่ 1 มีความเหมาะสมที่สุดในการนำไปทำให้บริสุทธิ์ และแนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่างมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับวิธีมาตรฐานทั้ง 2 วิธีคือ DPPH และการหาปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธี Folin Ciocalteu แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรไทยได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

- เพิ่ม Selection valve ในการนำสารเข้าสู่ระบบเพื่อลดปริมาณการใช้สารตัวอย่างให้น้อยลง
-พัฒนาระบบที่ได้เป็นแบบ Test-kit

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

เอกสารอ้างอิง

1. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 2002; 7(9):405-410.

2. Zulueta A, Esteve M.J, Frasquet I, Frigola A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. Food Chem. 2007; 103(4): 1365-1374.

3. Wang H, Cao G, Prior R. L. Total Antioxidant Capacity of Fruits. J. Agric. Food Chem. 1996; 44(3):701-705.

4. วัชระดุปต์, อ. สารต้านอนุมูลอิสระ (RADICAL SCAVENGING AGENT). กรุงเทพ: นิวไทยมิตรการพิมพ์; 2550

5. Vaya J, Aviram M. Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, analyses of Activities and Medical Applications. Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine and Metabolic Agents. 2001; 1: 99-117.

6. Ravindra PS, Sharad S, Kapur S. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. Journal, Indian Academy of Clinical Medicine. 2004; 5(3):218-25.

7. http://www.fragrantfloweringplants.com/gardenia-sootepensis-flower/

8. http://agkc.lib.ku.ac.th/plantwebsite/webpage/Trees/%E0%B8%84%E0%B8%B3%E0%B8%A1%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0%B8%AB%E0%B8%A5%E0%B8%A7%E0%B8%87.html

9. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53(6):1841-56.

10. Becker EM, Ntouma G, Skibsted LH. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation. Food Chemistry. 2007; 103(4):1288-96

11. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? Redox Report. 2004; 9(3):145-52.

12. Miller N J, Diplock T, Rice-Evans C, Davies M J, Gopinathan V, Milner. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science. 1993; 84:407-12.

13. Jaromir Ruzicka, Elo H. Hanzen. Flow injection Analysis. Second Edition. Volumn 62 in Chemical Analysis and Its Applications. A wiley-Interscience publication. Printed in the United State of America; 1998

14. Magalhies L.M, Segundo M.A, Reis S, Lima J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Anal. Chim. Acta. 2008; 613(1):1-19.

15. Leong L. P, Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chem. 2001; 76(1):69-75.

16. Parejo I, Codin C, Petrakis C, Kefalas P. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH. (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2001; 44(3):507-512.

17. Ukeda H, Adachi Y, Sawamura M. Flow injection analysis of DPPH radical based on electron spin resonance. Talanta. 2002; 58(6):1279-1283.

ภาคผนวก

ประมวลภาพระหว่างการทำวิจัย