

การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยระบบวิเคราะห์การไหลอัตโนมัติร่วมกับ ส่วนตรวจวัด พีอีดีดีแบบประหยัด*

Evaluation of antioxidant capacity using flow injection analysis with low-cost PEDD detection

สมณมลาย์ จันทร์เอี่ยม (Sumonmarn Chaneam)**

นันทยา ม่านทอง (Nantaya Manthong)***

กมลชนก พูลสวัสดิ์ (Kamonchanok Phoosawad)***

ศิริภัทร นิติกรนุสรณ์ (Siripat Nitikornnusun)***

รัศมี ชัยสุขสันต์ (Rasamee Chaisuksant)***

ดวงใจ นาคะปรีชา (Duangjai Nacapricha)****

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบการไหลอัตโนมัติ (Flow injection analysis) ร่วมกับส่วนตรวจวัดสีที่ประดิษฐ์ขึ้นเองโดยอาศัยหลักการของ Pair Emitter Detector Diode (PEDD) ระบบที่พัฒนาขึ้นนำไปใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธี ABTS โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐานและรายงานเป็นค่า ascorbic acid equivalent (AAE) การศึกษาประกอบด้วยการเลือกหลอดแอลอีดีที่ทำหน้าที่ให้แสงและรับแสง รวมถึงศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อระบบการวิเคราะห์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าระบบการวิเคราะห์นี้ให้ความเป็นเส้นตรงที่ดี (R^2 เท่ากับ 0.9980) ในช่วงความเข้มข้น 10–50 μM โดยมีสมการเส้นตรง $y = (8.607 \pm 0.222) - (14.92 \pm 7.35)x$ อีกทั้งยังให้ความแม่นยำเป็นที่น่าสนใจ (%RSD = 2.41) และสามารถ

* เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย

** ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Mueang, Nakhon Pathom, 73000, Thailand

ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST labs.), Thailand Corresponding author: Sumonmarn Chaneam, email: schaneam@gmail.com

*** ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Mueang, Nakhon Pathom, 73000, Thailand

**** ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST labs.), Thailand ภาควิชาเคมี และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Phayathai, Ratchathewi, Bangkok 10400

วิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว คือ 48 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ ($3s/n$) คือ 1.98 μM เมื่อนำระบบที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ไปวิเคราะห์น้ำผลไม้ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดเปรียบเทียบกับวิธี ABTS ดังเดิมพบว่าค่า AAE ที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย $t_{\text{stat}}(1.45) < t_{\text{critical}}(2.57)$

Abstract

In this work, a flow injection analysis (FIA) system with an in-house colorimeter, based on Pair Emitter Detector Diode (PEDD), was developed. The FIA-PEDD system was applied to evaluate the total antioxidant capacity (TAC) by means of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay. Ascorbic acid was employed as a standard antioxidant and TAC was then reported as ascorbic acid equivalent (AAE). Selection of light emitter and light detector for PEDD was investigated. Some parameters affected the flow performance were also optimized. The FIA-PEDD system showed good linearity ($R^2 = 0.9980$) in the concentration range of 10-50 μM with linear equation: $y = (8.607 \pm 0.222) - (14.92 \pm 7.35)$. The method provided satisfactory precision (%RSD = 2.41) and rapid throughput of 48 samples per hour. Limit of detection ($3s/n$) was 1.98 μM . The developed system was applied to analyze commercial fruit juice, purchased from supermarkets. AAE value of juice samples, obtained from our method were validated with those from the classical ABTS assay. The results revealed that they were in good agreement with $t_{\text{stat}}(1.45) < t_{\text{critical}}(2.57)$ at 95% confident level.

1. บทนำ

ปัจจุบันเครื่องดื่มที่มีสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เป็นที่นิยมในหมู่คนรักสุขภาพเป็นอย่างมาก น้ำผลไม้พร้อมดื่มเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด หาซื้อได้ง่าย และราคาย่อมเยา ทั้งยังเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันมากมาย สารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งในน้ำผลไม้คือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือวิตามินซี เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ ร่างกายไม่สามารถสร้างเองได้ จึงจำเป็นต้องรับประทานเข้าไป (Renaud *et al.*, 1998: 184–188) น้ำผลไม้พร้อมดื่มนั้นมีจำหน่ายอยู่หลากหลายชนิด ทุกชนิดล้วนมีสารต้านออกซิเดชันอยู่ไม่มากนักน้อย แต่อย่างไรก็ตามจากการสำรวจพบว่าไม่มีข้อมูลสารต้านออกซิเดชันปรากฏบนฉลากเลย ดังนั้นหากเครื่องดื่มเหล่านี้มีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่มากและสามารถระบุปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระบนฉลากได้ ก็จะช่วยดึงดูดความสนใจของผู้บริโภคได้มากขึ้น ทั้งยังใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้ด้วย (Chan-Eam *et al.*, 2011: 1350–1354)

การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน มีหลายวิธีเช่น วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay (Brand-Williams, Cuvelier and Berset, 1995: 25–30) วิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assay (Benzie and Strain, 1999: 15–27; Benzie and Szeto, 1999:

633) และวิธีที่นิยมมากคือ วิธี ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) assay (Arts *et al.*, 2004: 567-570; Re *et al.*, 1999: 1237) โดย ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ของตัวอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยใช้ $ABTS^{+•}$ ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีนี้เป็นตัวแทนอนุมูลอิสระ จากนั้นติดตามปริมาณ $ABTS^{+•}$ ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันนี้ได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ซึ่งพบว่าต้องใช้เวลานานถึง 30 นาทีเพื่อให้สารทำปฏิกิริยากันอย่างสมบูรณ์ สีของสารละลายที่เปลี่ยนไปนี้สามารถวัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 734 nm ข้อจำกัดอย่างหนึ่งของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์คือเครื่องมือมีราคาสูง และมีขนาดใหญ่ ไม่สะดวกต่อการพกพาไปใช้วิเคราะห์ภาคสนาม จึงมีกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนาอุปกรณ์การตรวจวัดทางแสงอย่างง่ายเพื่อใช้แทนเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นี้ เช่น Paired Emitter Detector Diode (PEDD) ซึ่งในงานนี้จะเรียกว่า “ฟิโอดีดี” ประกอบด้วย หลอดไฟแอลอีดี (Light Emitting Diode, LED) จำนวน 2 ตัว ทำหน้าที่เป็นตัวเปล่งแสง (light emitter) และตัวรับแสง (light detector) ตามลำดับ (Tymecki and Koncki, 2009: 73–77; Tymecki, Pokrzywnicka, and Koncki, 2008: 1501–1504) ฟิโอดีดีถูกประดิษฐ์ขึ้นเพื่อใช้เป็นส่วนตรวจวัดของระบบการไหลทั้ง flow injection analysis (FIA), sequential injection analysis (SIA) และ multicommutated flow analysis (MCFA) โดยใช้วิเคราะห์สารหลากหลายประเภท อาทิ สารชีวโมเลกุล เช่น alkaline phosphatase (ALP) (Strzelak, Koncki, and Tymecki, 2012: 127–131) สารประเภท biomarker เช่น creatinine (Tymecki *et al.*, 2013: 118–125) หรือวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม เช่น น้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในเครื่องดื่มโคล่า (Saetear *et al.*, 2013: 361–366) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำฟิโอดีดีมาใช้เพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

งานวิจัยนี้จึงนำระบบการไหลแบบโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส (FIA) มาใช้เพื่อทำให้การวิเคราะห์เป็นแบบอัตโนมัติมากขึ้น วิเคราะห์ได้รวดเร็วขึ้น และใช้ปริมาณรีเอเจนต์น้อยลงด้วย โดยส่วนตรวจวัดของระบบ FIA เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดแสงที่สร้างขึ้นโดยอาศัยหลักการของฟิโอดีดี เพื่อใช้ทดแทนสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีราคาแพง

2. การทดลอง

2.1 สารเคมีและสารละลาย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical grade) อนุมูลอิสระ $ABTS^{+•}$ เตรียมจาก 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) จาก Fluka (Germany) และ Dipotassium peroxodisulphate ($K_2S_2O_8$) จาก Fluka (Germany) และสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเตรียมจาก L-Ascorbic acid จาก UNILAB (Philippines) สารละลายทุกชนิดเตรียมในน้ำกลั่นจากระบบ reversed osmosis ตลอดการศึกษา สารละลาย $ABTS^{+•}$ ความเข้มข้น 7 mM เตรียมโดยชั่ง ABTS 0.0380 กรัม และ potassium peroxodisulfate 0.0060 กรัม ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10.00 mL จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชม. เมื่อจะนำไปใช้ให้ทำการเจือจางเจือจางสารละลายที่เตรียมไว้ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เท่ากับ 0.7 a.u. สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเตรียมใหม่ทุกวัน

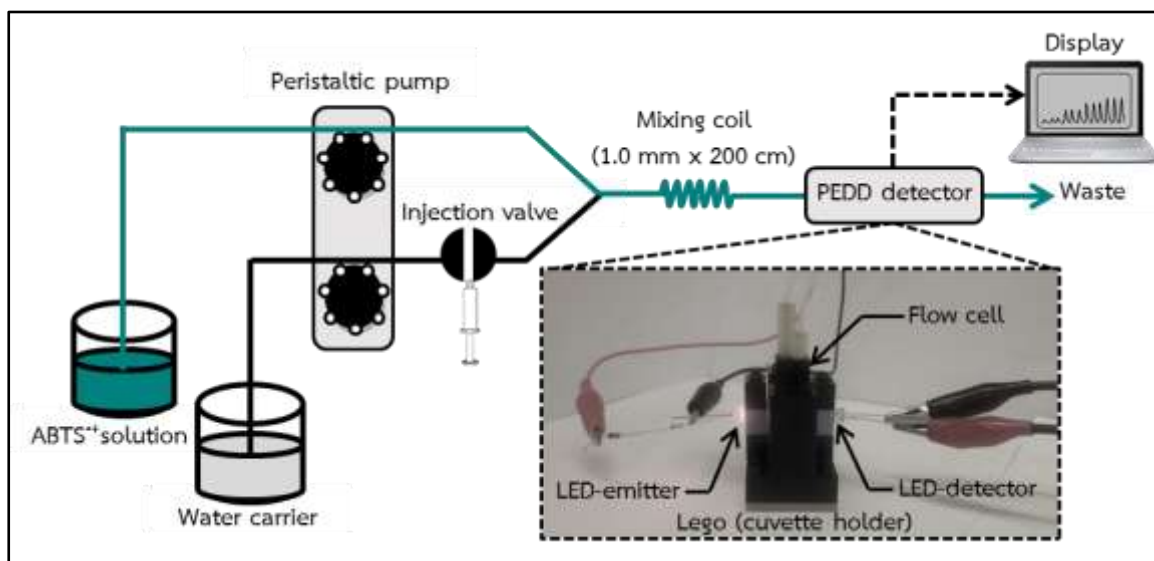
โดยชั่ง L-Ascorbic acid 0.4500 g ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL จะได้สารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 100.0 mM จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-50 μ M เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

2.2 สารตัวอย่าง

สารตัวอย่างเตรียมแล้ววิเคราะห์ทันที โดยนำน้ำผลไม้เข้มข้น 100% ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman[®] No.1) แล้วเจือจางให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

2.3 อุปกรณ์และระบบการไหล FIA

ในการทดลองนี้ใช้ระบบการไหลอัตโนมัติแบบ FIA ในการวิเคราะห์และตรวจวัดด้วยฟิโอดีดี ซึ่งมีแผนภาพจำลองแสดงดังรูปที่ 1 เริ่มทำการทดลองโดยฉีดสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างผ่านวาล์ว (injection valve, V-540, Upchurch Scientific[®], USA) เข้าสู่กระแสตัวพา (carrier stream) ซึ่งไหลอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการไหลคงที่ ซึ่งควบคุมโดยปั๊มลูกรีด (peristaltic pump, Model 7521-50, Masterflex, USA) สารละลายไหลผ่านท่อลำเลียงสารเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 mm (pump tube, Upchurch Scientific[®], USA) ปฏิกริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างกับสารละลาย ABTS^{•+} จะเกิดขึ้นที่ท่อช่วยผสม (mixing coil, id 1.0 mm $\times$ 200 cm) จากการทดลองพบว่าระบบ FIA ที่มีท่อช่วยผสม จะมีความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) มากกว่าระบบที่ไม่มีท่อช่วยผสมและทำให้ base line มีความเสถียรมากกว่าด้วย จากนั้นท่อนโซนที่เกิดปฏิกิริยาจะถูกพาไปยังส่วนตรวจวัดฟิโอดีดีและอ่านสัญญาณด้วยเครื่อง digital multimeter (Fluke, USA) แล้วแสดงผลผ่านหน้าจอคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม LabVIEW 8.2TM



รูปที่ 1 แผนภาพจำลองระบบการไหล FIA-PEDD สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

2.4 ส่วนตรวจวัดฟิโอดีดี

ในงานนี้ ผู้วิจัยประดิษฐ์ส่วนตรวจวัดฟิโอดีดีขึ้นมาใช้เอง โดยใช้หลอด LED ซึ่งสามารถหาซื้อได้ทั่วไปมีราคาตั้งแต่ 3-100 บาท ขึ้นอยู่กับคุณภาพหลอด ส่วนตรวจวัดฟิโอดีดีนี้จะใช้ LED จำนวน 2 หลอดเป็นแหล่งกำเนิดแสง (LED-emitter) และตรวจวัดแสง (LED-detector) ตามลำดับดังรูป 1 (แทรก) โดยทางด้าน

LED-emitter เชื่อมต่อกับแหล่งจ่ายไฟกระแสตรง 5 โวลต์ (PS-150200, BEST, Thailand) ผ่านตัวต้านทานขนาด 100 ± 1 โอห์ม เพื่อแปลงแสงที่มีความเข้มแสงคงที่ และ LED-detector จะต่อกับ digital multimeter (Fluke, USA) เพื่อวัดสัญญาณออกมาเป็นค่าความต่างศักย์ (voltage) หลอด LED ทั้งสองนี้ยึดอยู่กับแท่นสำหรับวาง flow cell ซึ่งเป็นตัวต่อเลโก้ สัญญาณที่วัดได้จาก LED-detector จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของแสงที่ผ่านตัวอย่างมาตกกระทบที่ LED-detector และแปรตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์

2.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

2.5.1 การสร้างและทดสอบส่วนตรวจวัดฟิโอดีดี

ประดิษฐ์ส่วนตรวจวัดฟิโอดีดีตามที่กล่าวในหัวข้อ 2.4 และจัดระบบการไหล FIA ดังรูปที่ 1 โดยใช้อัตราการไหล (flow rate) ของสารละลาย ABTS^{•+} และน้ำตัวพา เท่ากับ 1.0 mL/min และปริมาตรตัวอย่าง (sample volume) เท่ากับ 100 μ L ทำการศึกษาเพื่อหาสีของแสงของหลอด LED ที่เหมาะสมสำหรับใช้วัดสารละลาย ABTS^{•+} ซึ่งมีสีเขียวอมน้ำเงิน โดยใช้หลอด LED ที่ให้แสงสีฟ้าเป็น LED-emitter และใช้หลอด LED ชนิดเดียวกันเป็น LED-detector ด้วย ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่างๆ (10-50 μ M) แล้ววัดสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นมิลลิโวลต์ (mV) ที่ได้จากหลอด LED-detector พล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (แกน X) กับความสูงของสัญญาณ (แกน Y) จากนั้นทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนสีของแสงของหลอด LED ทั้ง LED-emitter และ LED-detector เป็นสีเขียว สีเหลือง และสีแดงตามลำดับ เปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) โดยพิจารณาจากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

2.5.2 การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อระบบการไหล FIA

2.5.2.1 อัตราการไหลของสารละลาย (Flow rate)

จัดระบบการไหล FIA ดังรูปที่ 1 ใช้ปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 100 μ L แล้วศึกษาผลของอัตราการไหลของสารละลาย ABTS^{•+} และน้ำตัวพา โดยกำหนดความเร็วรอบการหมุนของปั๊มลูกรีดให้ได้อัตราการไหลของสารในท่อเท่ากับ 0.5 mL/min ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 10-30 μ M วัดความสูงของสัญญาณที่ได้แล้วนำไปพล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (แกน X) กับความสูงของสัญญาณ (แกน Y) จากนั้นทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนอัตราการไหลของสารเป็น 1.0, 1.5 และ 2.0 mL/min ตามลำดับ เปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง (analysis time)

2.5.2.2 ปริมาตรสารตัวอย่าง (Sample volume)

เนื่องจากปริมาตรตัวอย่างส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์และเวลาที่ใช้วิเคราะห์ด้วยเช่นกัน ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพื่อหาปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสมที่ให้ความไวในการวิเคราะห์ที่สูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์รวดเร็ว โดยใช้ระบบการไหล FIA ดังรูปที่ 1 และใช้อัตราการไหลของสารที่ได้จากการทดลอง 2.5.2.1 แล้วกำหนดให้ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 100 μ L ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 10-30 μ M จากนั้นทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนปริมาตรสารตัวอย่างเป็น 300 และ 500 μ L ตามลำดับ เปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง

2.5.3 ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างน้ำผลไม้พร้อมดื่มด้วยวิธี ABTS assay โดยใช้ระบบที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้ระบบการไหล FIA ที่พัฒนาขึ้นเพื่อประเมิน

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมของตัวอย่างน้ำผลไม้ 100% โดยใช้ตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้วฉีดเข้าระบบ FIA ที่มีสภาวะการทดลองที่เหมาะสม วัดค่าความสูงของสัญญาณ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก คำนวณความเข้มข้นแล้วรายงานเป็นค่า Ascorbic Acid Equivalent (AAE) ซึ่งหมายถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

2.5.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมของตัวอย่างน้ำผลไม้พร้อมดื่มด้วยวิธี ABTS ดังเดิม

นำสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ปริมาตร 3.50 mL ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 0.10 mM หรือสารละลายตัวอย่างปริมาตรต่างๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4.00 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (HP-8453, Perkin Elmer, USA) ที่ความยาวคลื่น 734 nm นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหา %Remaining radical ตามสมการ

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

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง (แกน X) กับ %Remaining radical (แกน Y) เพื่อหาค่า EC₅₀ (50% effective concentration) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS^{•+} เหลืออยู่ 50% จากนั้นนำค่า EC₅₀ ของสารตัวอย่างไปคำนวณเปรียบเทียบกับค่า EC₅₀ ของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกแล้วรายงานเป็นค่า AAE ของแต่ละตัวอย่างต่อไป (Boonyuen *et al.*, 2009: 21)

3. ผลและอภิปรายผลการทดลอง

3.1. การเลือกหลอด LED ของส่วนตรวจวัดฟิโอดีดี

ผลการทดลองจากการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยกรดแอสคอร์บิกและเปลี่ยนสีของแสงของหลอด LED เป็นสีฟ้า เขียว เหลือง และแดง พบว่าเมื่อใช้หลอด LED สีฟ้าให้ความไวในการวิเคราะห์ดีที่สุดดังตารางที่ 1 อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เลือกใช้หลอด LED สีแดงเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนที่อาจเกิดขึ้นได้จากสีของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 600 nm ทั้งนี้เมื่อใช้หลอด LED สีแดงพบว่าให้ความไวในการวิเคราะห์ลดลงแต่เพียงพอสำหรับการวัดปริมาณสารต้านออกซิเดชันในน้ำผลไม้ รวมถึงให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีเช่นเดียวกับหลอด LED สีฟ้า

ตารางที่ 1 สมการเส้นตรงและค่าความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 10-50 µM โดยเปลี่ยนหลอด LED-emitter และ LED-detector เป็นสีต่างๆ

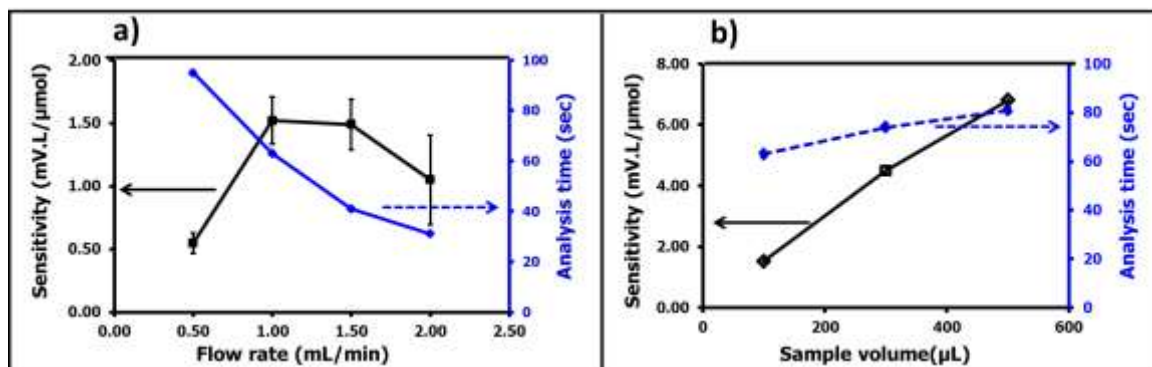
สีของแสงของหลอด LED	สมการเส้นตรง	ค่าความเป็นเส้นตรง (R ²)
ฟ้า (462.84 nm) ^a	y = 4.9777x – 32.950	0.9980
เขียว (521.47 nm) ^a	y = 0.3397x – 0.7333	0.9949
เหลือง (591.19 nm) ^a	y = 0.3451x – 1.5467	0.9970
แดง (633.87 nm) ^a	y = 1.805x + 3.9390	0.9981

^a ความยาวคลื่นแสงที่มีความเข้มแสงเปล่งออกมามากที่สุดของหลอด LED (maximum emission wavelength)

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อระบบการไหล FIA

ผลการทดลองการศึกษาผลของอัตราการไหลของสาร (flow rate) ในระบบการไหล FIA แสดงดังรูปที่ 2(a) 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 (70 วินาทีต่อตัวอย่าง)

จากนั้นทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของปริมาตรสารตัวอย่าง (sample volume) ต่อระบบการไหล FIA ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2(b) พบว่าเมื่อปริมาตรสารตัวอย่างมากขึ้น ความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้น เนื่องจากมีปริมาณ analyte เข้าทำปฏิกิริยามากขึ้น โดยที่ปริมาตร 500 μ L ให้ผลดีที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ปริมาตรมากขึ้นก็ส่งผลให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมากขึ้นด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 300 μ L เนื่องจากให้ความไวในการวิเคราะห์เพียงพอ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 74 วินาทีต่อตัวอย่าง

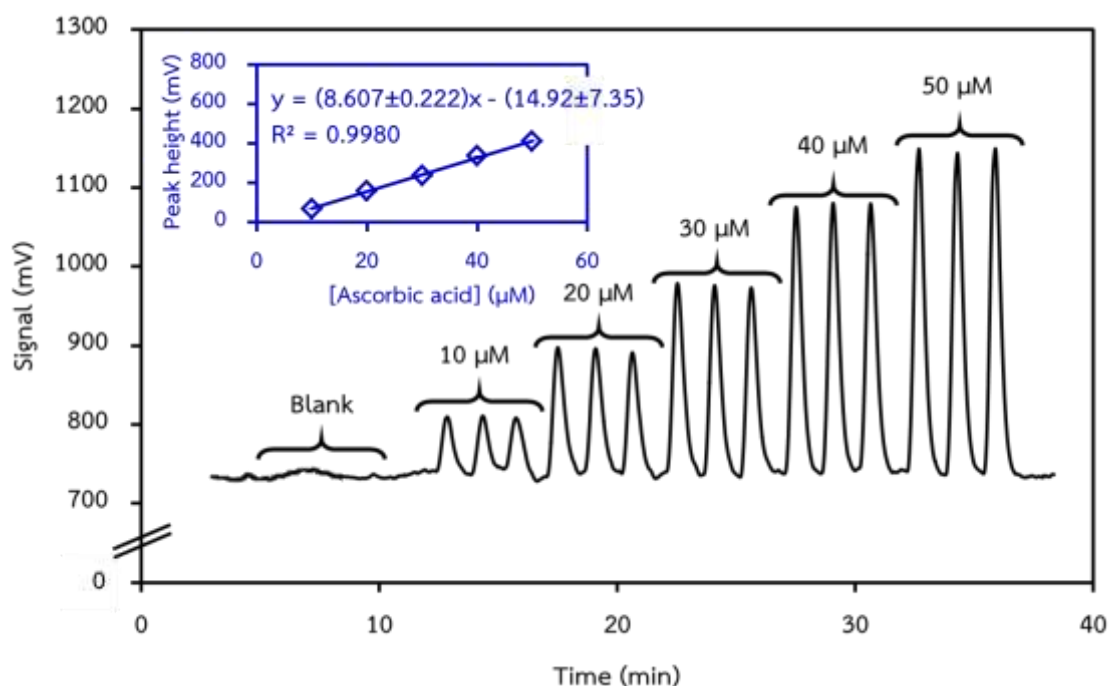


รูปที่ 2 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของสาร (a) และ ผลของปริมาตรตัวอย่าง (b)

3.3. คุณลักษณะการวิเคราะห์ (Analytical features)

เมื่อใช้ระบบ FIA ดังรูปที่ 1 และใช้สภาวะที่เหมาะสมคือหลอด LED-emitter และ LED-detector สีแดง (633.87 nm) อัตราการไหลของสาร 1.0 mL/min และปริมาตรสารตัวอย่าง 300 μ L ศึกษาคุณลักษณะการวิเคราะห์ ABTS assay กับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก สัญญาณที่บันทึกได้แสดงในรูปที่ 3 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเพิ่มมากขึ้น จะเกิดปฏิกิริยาจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ มากขึ้น จึงเหลืออนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ น้อยลง ทำให้สีของสารละลาย $ABTS^{+}$ จางลง จึงมีแสงจากหลอด LED-emitter ส่องผ่านไปยังหลอด LED-detector มากขึ้น สัญญาณจึงสูงขึ้นนั่นเอง กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงในรูปที่ 3 (แทรก) ได้สมการเส้นตรงคือ $y = (8.607 \pm 0.222)x - (14.92 \pm 7.35)$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9980 โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น

ของกรดแอสคอร์บิก 10-50 μM และค่าความเที่ยง (precision, %RSD) เท่ากับ 2.41 (30 μM , $n = 10$) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 1.98 μM (3s/n) และระบบนี้มีความเร็วในการวิเคราะห์ดีมาก โดยสามารถทำการวิเคราะห์ได้ถึง 48 ตัวอย่างใน 1 ชั่วโมง ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าระบบการไหล FIA ที่พัฒนาขึ้นมานี้มีประสิทธิภาพดีและเหมาะกับการใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันในตัวอย่างต่อไปได้



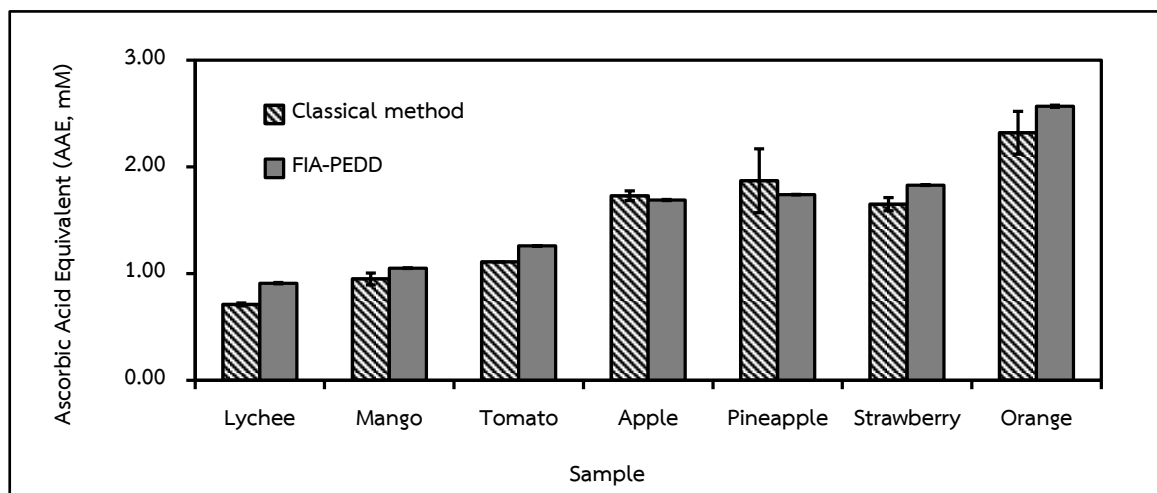
รูปที่ 3 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่างๆ กับสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS^{++} ด้วยระบบการไหล FIA ร่วมกับส่วนตรวจวัดฟิอิดิตีที่พัฒนาขึ้น (สภาวะที่ใช้: อัตราการไหลสาร 1.0 mL/min, ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 μL) และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับความสูงของสัญญาณ (รูปแทรก)

3.4. การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมของตัวอย่างน้ำผลไม้พร้อมดื่มและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างน้ำผลไม้พร้อมดื่ม 100% จำนวน 7 ชนิด คือ น้ำลิ้นจี่ น้ำมะม่วง น้ำมะเขือเทศ น้ำแอปเปิ้ล น้ำสับปะรด น้ำสตอเบอรี่ และน้ำส้ม หลังจากเตรียมและเจือจางตัวอย่างตามหัวข้อ 2.2 แล้ว แต่ละตัวอย่างแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 วิเคราะห์ด้วยระบบการไหล FIA ร่วมกับส่วนตรวจวัดฟิอิดิตีที่พัฒนาตามการทดลอง 2.5.3 และใช้สภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับในรูปที่ 3 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 ซึ่งนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานตามการทดลอง 2.5.4 ทั้งสองวิธีนี้รายงานความสามารถในการต้านออกซิเดชันเป็นค่า AAE

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 พบว่าการวิเคราะห์ด้วย ABTS assay ทั้งวิธีการใช้ระบบการไหล FIA ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีดั้งเดิมให้ค่า AAE ไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่น้ำทับทิมมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง

ที่สุด ในขณะที่น้ำล้นจึงมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก นอกจากนั้นค่า AAE ที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกับวิธีทางสถิติ (t -test) พบว่าค่า AAE ที่ได้จากทั้งสองวิธีนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย $t_{stat}(1.45) < t_{critical}(2.57)$ แสดงให้เห็นว่าวิธี FIA-PEDD ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถใช้แทนวิธีมาตรฐานได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 4 Ascorbic acid equivalent (AAE) ในตัวอย่างน้ำผลไม้พร้อมดื่มชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ได้จากระบบการไหล FIA ร่วมกับส่วนตรวจวัดฟลูออโรเมตริก (FIA-PEDD) เปรียบเทียบกับ AAE ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน (Classical method)

4 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถนำส่วนตรวจวัดแบบฟลูออโรเมตริกที่ประดิษฐ์ขึ้นมาใช้ร่วมกับระบบการไหลอัตโนมัติแบบ FIA แล้วประยุกต์ใช้กับการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน สร้างส่วนตรวจวัดฟลูออโรเมตริกโดยใช้หลอด LED สีแดง สภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบการไหล FIA คืออัตราการไหลสาร 1.0 mL/min และปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าระบบเท่ากับ 300 μ L โดยพิจารณาจากความไวในการวิเคราะห์และเวลาที่วิเคราะห์ต่อตัวอย่าง เมื่อใช้สภาวะเหล่านี้แล้วจะได้กราฟมาตรฐานที่มีสมการเส้นตรงคือ $y = (8.607 \pm 0.222)x - (14.92 \pm 7.35)$ และมีความเป็นเส้นตรงที่ดี ($R^2 = 0.9980$) สามารถวิเคราะห์ได้ในช่วงความเข้มข้น 10-50 μ M ให้ค่าความแม่นยำสูง (%RSD = 2.41, 30 μ M, n=10) และความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้คือ 1.98 μ M (3s/n) ซึ่งเพียงพอสำหรับวิเคราะห์ในตัวอย่าง นอกจากนี้พบว่าระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วถึง 48 ตัวอย่างใน 1 ชั่วโมง สุดท้ายนำระบบนี้ไปใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมในตัวอย่างน้ำผลไม้พร้อมดื่ม 100% ที่มีขายตามท้องตลาด พบว่าค่า AAE ที่วิเคราะห์ได้ไม่ต่างจากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญ ข้อดีของวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้คือ ทำการทดลองได้ง่าย รวดเร็ว ให้ผลแม่นยำ และสามารถใช้ทดแทนวิธีมาตรฐานได้ สิ่งสำคัญคืออุปกรณ์ตรวจวัดฟลูออโรเมตริกนี้มีราคาถูกมาก (ประมาณ 5000 บาท เมื่ออ่านสัญญาณด้วยมัลติมิเตอร์ทั่วไป) เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับอาจารย์หลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกจาก กองทุนวิจัยและสร้างสรรค์คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2559 (SRF-PRG-2559-05) และทุนสนับสนุน การวิจัยสำหรับบัณฑิต พสวท. แรกบรรจุ ปีงบประมาณ 2556 (017/2557) นอกจากนี้ขอขอบคุณภาคีวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี รวมถึงสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาต่างประเทศ

- Arts, Mariken J.T.J. *et al.* (2004). “A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay.” *Food Chemistry* 88, 4 (December): 567-570.
- Boonyuen, Chaiyan *et al.* (2009). “Antioxidant capacity and phenolic content of *Mimusops elengi* fruit extract.” *Natural Science* 43, 1 (January): 21-27.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.” *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie* 28, 1: 25–30.
- Chan-Eam, Sumonmarn *et al.* (2011). “Sequential injection analysis with electrochemical detection as a tool for economic and rapid evaluation of total antioxidant capacity.” *Talanta* 84, 5 (June): 1350–1354.
- Benzie, Iris F.F., and J.J. Strain. (1999). “Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration.” *Methods in Enzymology* 299 (February): 15–27.
- Benzie, Iris F.F., and Y.T. Szeto. (1999). “Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay.” *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47, 2 (February): 633-636.
- Re, R. *et al.* (1999). “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.” *Free Radical Biology Medicine* 26, 9-10 (May): 1231-1237.
- Renaud, S.C. *et al.* (1998). “Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France.” *Epidemiology* 9, 2 (March): 184–188.
- Saetear, Phoonthawee *et al.* (2013). “Sequential injection system for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks using paired emitter-detector diode sensor.” *Talanta* 115 (October): 361–366.
- Tymecki, Łukasz, Marta Pokrzywnicka, and Robert Koncki. (2003). “Paired emitter detector diode (PEDD)-based photometry - An alternative approach.” *Analyst* 133, 11 (December): 1501–1504.

- Tymecki, Łukasz, and Robert Koncki. (2009). "Simplified paired-emitter–detector–diodes–based photometry with improved sensitivity." *Analytica Chimica Acta* 639, 1-2 (April): 73–77.
- Tymecki, Łukasz *et al.* (2009). "UV-PEDD photometry dedicated for bioanalytical uses." *Analyst* 134, 7 (July): 1333–1337.
- Tymecki, Łukasz *et al.* (2013). "Multicommutated flow analysis system for determination of creatinine in physiological fluids by Jaffe method." *Analytica Chimica Acta* 787 (July): 118– 125