

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ปริญญานิพนธ์
ของ
วันชัย อินทรพิทักษ์

เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

สิงหาคม 2558

การพัฒนาวีธีวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

สิงหาคม 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาวีธีวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

สิงหาคม 2558

วันชัย อินทรพิทักษ์. (2558). การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. ปรินญาณพนธ์ วท.ม. (วิทยาการเภสัชภัณฑ์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปรินญาณพนธ์:
รองศาสตราจารย์ ดร.สุวรรณา วรรัตน์, ดร. วฐุ พรหมพิทยารัตน์.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนำหลักการแยกสารบนตัวกลางกระดาษควบคู่กับการศึกษาการเกิดปฏิกิริยา DPPH scavenging assay บนตัวกลางเซลลูโลส สแกนภาพและแปลผลด้วยโปรแกรม Adobe photoshop CS2 เปรียบเทียบกับวิธี Microplate assay รวมถึงการพัฒนาชุดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสตริป เพื่อได้มาซึ่งวิธีวิเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

ผลการเทียบวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาโดยใช้สารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) พบว่ามีความเป็นเส้นตรง ความถูกต้อง แม่นยำ และมีความสามารถในการตรวจวัดสารได้เป็นไปตามข้อกำหนด International Conference of Harmonization (ICH) guideline แสดงค่าความเป็นเส้นตรง $Y = 8266.6x - 133.01$ ที่ช่วงความเข้มข้นที่ 75-175 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($r^2 = 0.9962$) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOQ) คือ 0.009 และ 0.03 $\mu\text{g/spot}$ ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำในช่วงเวลาเดียวกันและวิเคราะห์ต่างวันเวลากัน มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) คือ 2.29 ถึง 5.53% และ 2.95 ถึง 4.19% ตามลำดับ ความถูกต้องของวิธี ให้ค่าการคืนย้อนกลับของสารอยู่ในช่วง 101.50 ถึง 104.67% และผลค่า IC_{50} ของวิธีเทคนิคเชิงภาพมีค่าเท่ากับ $102.27 \pm 2.97 \mu\text{g/ml}$ คำนวณจากโปรแกรม Graphpad prism 5 มีค่าสหสัมพันธ์ของวิธีการที่พัฒนากับวิธีมาตรฐาน DPPH scavenging assay-microplate, $r^2 = 0.9892$ วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดหาปริมาณสารได้เป็นไปตามมาตรฐานกำหนดให้ค่ามีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่งนำมาพัฒนา ชุดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอชสตริปเพื่อการควบคุมคุณภาพเบื้องต้น พบว่าชุดทดสอบนี้สามารถตรวจพบสาร Ascorbic acid, Gallic acid, Rutin, Quercetin แสดงผลค่า LOD คือ 7.8 15.6 125.0 และ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นเป็นวิธีการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ ต้นทุนต่ำ ปลอดภัย สะดวกกับการทดสอบในภาคสนาม

ข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานั้นการปฏิบัติการจุดสารบนกระดาษขนาด และขอบเขตมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา อีกทั้งยังไม่เหมาะต่อการทดสอบสารที่ไม่มีขั้วและสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีสี เนื่องจากไปรบกวนการอ่านค่าฟิสิกส์ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2

คำสำคัญ อนุมูลอิสระ เทคนิคแยกสารด้วยกระดาษ เทคนิควิเคราะห์เชิงภาพ วิธีตรวจสอบความถูกต้อง



THE DEVELOPMENT OF QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYTICAL METHOD TO
TEST THE ANTIOXIDANT ACTIVITY



Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science in Pharmaceutical Product Development
at Srinakharinwirot University

August 2015

Wanchai Intharapithak. (2015). *The Development of Quantitative and Qualitative Analytical Method to Test The Antioxidant Activity*. Master thesis, M.S. (Pharmaceutical Product Development). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University.
Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Suwanna Vorarat., Dr. Watoo Phrompittayarat.

The Objectives of study were to develop and validate method of paper chromatography coupled with DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging assay. Documented scanner and Adobe photoshop CS2 program were processed by means of an image processing program and compare with microplate assay. Include DPPH strip test for the purpose of quantitative determination and qualitative determination analytical method to test the antioxidant activity of health product.

Validation methods were performed including linearity, accuracy, precision and sensitivity based on International Conference of Harmonization (ICH) guideline. Results of method validation used ascorbic acid as a standard substance. Linear is good regression line $y = 8266.6x - 133.01$ at range concentration 75-175 $\mu\text{g/ml}$ and $r^2 = 0.9962$. Limit of detection (LOD) and Limit of quantitation (LOQ) were 0.009 and 0.03 $\mu\text{g/spot}$, respectively. The intra-assay and inter-assay precision values were 2.29-5.53% and 2.95-4.19%, respectively. The accuracy was 101.50-104.67 %. The IC_{50} of the development method was $102.27 \pm 2.97 \mu\text{g/ml}$ which calculated from computation of Graphpad prism 5. The image processing method correlate microplate method ($r^2 = 0.9892$). DPPH strip test is useful for Consumer Protection Surveillance and products available in the market that claim to have antioxidant properties. This is also for quality control of the product itself. This strip test was modified from principle of the DPPH scavenging assay which changes color of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH on paper strip. The test had high accuracy and sensitivity. Limit of detection (LOD) of Ascorbic acid, Gallic acid, Rutin, Quercetin are 7.8, 15.6, 125.0, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The substances were environmentally friendly, low cost, simple and easy to test in the field.

Specification of developed method to test spot and scope affect to reaction of DPPH. Also inappropriate to non polar sample and pigment sample affect to means of an image processing program.

Keywords: Antioxidant, Paper chromatography, Image processing program, Method validation



ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้นั้นเกิดจากความกรุณาความช่วยเหลือให้คำแนะนำรวมถึงการถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์จากอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณ วรัตน์ และอาจารย์ ดร. วฐุ พรหมพิทยารัตน์ ที่สละเวลาทุ่มเทให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาของงานวิจัย อีกทั้งยังขัดเกลาข้อบกพร่องต่างๆ ของผู้วิจัยให้ดีขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้เพื่อนำไป ใช้ในการ ประกอบวิชาชีพและนำไปใช้ในก ารประมวล ความรู้ความเข้าใจ เพื่อต่อยอดเป็นปริญญานิพนธ์เล่มนี้ และขอขอ บพระคุณคณะกรรมการการสอบปากเปล่า อาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชู วิสิษฐกุล ประธานในการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณ วรัตน์ อาจารย์ ดร. วฐุ พรหมพิทยารัตน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. นริศ คำแก่น จากคณะเภสัชศ าสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้คำแนะนำเพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณลีลา ชีระกาญจน์ กรรมการบริหารบริษัทแอลบีเอส แลบบอเรตอรี จำกัด ภก. วรার্থ ชีวธาดาวีรุทธิ์ คุณณัฐกมล เลา ที่ให้ความอนุเคราะห์เวลาและเปิดโอกาสเพื่อให้พัฒนาตนเองเพื่อศึกษาและเพิ่มพูนความรู้

ขอกราบขอบคุณ คุณพ่อคุณแม่ และครอบครัว ขอขอบคุณสำหรับความรัก กำลังใจ แรง บันดาลใจ และคอยช่วยเหลือสนับสนุนตลอดมา

วันชัย อินทรพิทักษ์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ขอบเขตงานวิจัย.....	3
 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	5
อนุมูลอิสระ.....	5
ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ.....	6
อนุมูลอิสระต่อการก่อเกิดโรค.....	7
การป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ.....	8
วิธีวิเคราะห์ความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชั่น (Total Antioxidant Capacity: TAC).....	14
การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer: HAT).....	14
การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron Transfer: ET หรือ SET).....	14
วิธีวิเคราะห์ DPPH scavenging assay โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์.....	18
วิธีโครมาโทกราฟี (Chromatography).....	21
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	28
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation).....	31
 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	33
วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี (Materials and reagents).....	33
การเตรียมสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง.....	34
วิธีการทดลอง (Methods).....	35

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	44
การพัฒนาวีธีวิเคราะห์.....	44
การพัฒนาชุดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอชสตริป (DPPH strip for antioxidant activity test).....	55
5 อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ.....	60
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก.....	71
ภาคผนวก ก.....	72
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	78

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงประเภทของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง.....	5
2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของวิธีวิเคราะห์ DPPH scavenging assay.....	20
3 แสดงความมีขั้ว (Polar) ของสารตัวทำละลาย.....	24
4 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีรังคเลขฝิว บาง (TLC).....	28
5 แสดงผลการเปรียบเทียบชนิดของกระดาษเพื่อใช้เป็นตัวกลางวิฤภาคคงที่.....	45
6 แสดงค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ (Rf) ของแอสคอร์บิก แอซิด.....	47
7 แสดงค่า Rf ของสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ.....	49
8 แสดงผลค่าความเข้มข้นของแอสคอร์บิก แอซิด และค่าฟิกเชล.....	50
9 แสดงผลค่า % Recovery.....	51
10 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Intra-assay).....	52
11 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Inter-assay).....	52
12 แสดงผลการทดสอบ Limit of Detection (LOD) ของชุดทดสอบ.....	57

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	4
2 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Ascorbic acid.....	9
3 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Malic acid.....	9
4 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Tartaric acid.....	10
5 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Citric acid.....	10
6 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Gallic acid.....	11
7 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Quercetin.....	11
8 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Rutin.....	12
9 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Ellagic acid.....	12
10 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์ชาชงในท้องตลาด.....	13
11 แสดงลักษณะของพีชมะรุ้ม(ซ้าย) แสดงผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะรุ้ม (ขวา).....	13
12 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของวิธี Ferric reducing ability of plasma assay: FRAP assay.....	15
13 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid): ABTS.....	16
14 แสดงสูตรโครงสร้าง 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical.....	16
15 แสดงกลไกของ DPPH radical scavenging assay.....	17
16 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง Ultraviolet–visible spectroscopy (UV-vis).....	18
17 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง On-line HPLC-DPPH.....	19
18 แสดงกระดาษเซลลูโลส.....	23
19 หลักการตรวจวัดของวิธีเดนสิโตเมตรี.....	26
20 แสดงการแปลผลของการตรวจวัดด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์.....	26
21 แสดงหลักการทำงานของกล้องถ่ายภาพ Charge-coupled device: CCD.....	27
22 แผนภาพการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคเชิงภาพ.....	37

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
23 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสาร DPPH บนกระดาษ ซึ่ง A เป็นแผ่นของกระดาษที่จุ่มสาร DPPH B เป็นแผ่นที่สาร DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ.....	44
24 (ซ้าย) แสดงถึงการติดสีของกระดาษ A กระดาษกรองเบอร์ 1; B กระดาษปอนด์; C กระดาษวาดเขียน; D กระดาษเซลลูโลส (ขาว) แสดงการเปรียบเทียบ Spot ของสารเกิดปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระแอสคอร์บิก แอซิด ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม A กระดาษกรองเบอร์ 1; B กระดาษปอนด์; C กระดาษวาดเขียน; D กระดาษเซลลูโลส.....	46
25 แสดง mobile phase A คือ อะซีโตไนไตรล์: น้ำ (7: 3), B คือ เมทานอล: น้ำ (7: 3) และ C คือ เอทานอล: น้ำ (7: 3).....	47
26 แสดงความจำเพาะของสภาวะในการแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (1-มาลิก แอซิด 2-แอสคอร์บิก แอซิด 3- แกลลิก แอซิด 4- ทาร์ทาริก แอซิด 5- แอลลาจิก แอซิด 6- เคอร์ซีทิน 7-ซีตริก แอซิด 8- รุทีน).....	49
27 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอสคอร์บิก แอซิดกับค่าฟิกเชล.....	51
28 แสดงกราฟการวิเคราะห์ค่า IC ₅₀ จากวิธีวิเคราะห์ PC-DPPH.....	53
29 แสดงกราฟการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของวิธีวิเคราะห์เทคนิคเชิงภาพกับวิธีวิเคราะห์สเปกโตรโฟโตเมตรี.....	54
30 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นในระดับต่างของสาร DPPH (A-Positive control และB-Negative control).....	56
31 แสดงค่า Limit of Detection (LOD) ของชุดทดสอบ ด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ.....	56
32 แสดงผลการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยชุดทดสอบในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป 1-positive control 2- Negative control 3-ชาดำ 4-ชาอู่หลง 5-ชาลิปตัน 6-ชาผลไม้ และ7-ชาใบหม่อน.....	58
33 แสดงผลการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยชุดทดสอบในผลิตภัณฑ์น้ำมันมะรุม 1-Negative control 2- positive control 3-น้ำมันมะรุม....	59

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ในปัจจุบันวิถีการดำเนินชีวิตของผู้คนในสังคมได้เปลี่ยนแปลงไป อันเนื่องมาจากการแข่งขันกับเวลา มีความเร่งรีบ ต้องทำงานหนัก สภาวะกดดันในหน้าที่การงาน ส่งผลให้เกิดภาวะความเครียด และสภาพแวดล้อมที่เป็นมลภาวะที่เป็นพิษ มากขึ้น จึงทำให้ขาดการดูแลสุขภาพ รวมถึงเรื่องโภชนาการที่ไม่เหมาะสมขาดสารอาหาร หลักที่สำคัญ เป็นผลให้ร่างกายอ่อนแอลง ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายลดต่ำลง ส่งผลให้มีการสร้างอนุมูลอิสระที่ผิดปกติไป ภายในร่างกาย ซึ่งการเกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นกลไกการเกิดขึ้นทางธรรมชาติของสารที่มีการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นในบริเวณรอบข้างของ โมเลกุลหรืออะตอม ของสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอย่างน้อย 1 ตัว (Unpaired electron) ที่โคจรรอบนอกสุด ส่งผลทำให้เกิดความเสถียรต่ำและ มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารอื่นที่อยู่บริเวณรอบๆ ของสาร โดยที่โมเลกุลข้างเคียงจะสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) ซึ่งจะเกิดขึ้นภายในร่างกาย โดยผ่านกระบวนการขนถ่ายอิเล็กตรอน เพื่อไปเผาผลาญ สารอาหารให้เกิดเป็นพลังงานโดยใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรีย อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นนั้นจะไปจับตัวกับออกซิเจนบริเวณรอบๆ ทำให้เกิดเป็นอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเป็นปัจจัยเอื้อต่อการเกิดการทำงานของผิดปกติ ของเซลล์ และลุกลามจนเกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคข้ออักเสบ โรคสมองเสื่อม เป็นต้น รวมถึงการเสื่อมของเซลล์ผิว จนเป็นสาเหตุของการเกิดริ้วรอยของผิวหนังและผิวพรรณ ทำให้เกิด ภาวะแก่ก่อนวัย อันควรมีผลต่อความสวยงามและความมั่นใจของมนุษย์ ซึ่งล้วนเกี่ยวพันกับสาเหตุการเกิดอนุมูลอิสระ แม้ว่าในร่างกายจะมีกลไก ในการป้องกันจากอนุมูลอิสระ แต่สารต้าน อนุมูลอิสระ ที่ร่างกายสร้างขึ้น นั้นไม่เพียงพอต่อการต่อต้าน ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องอุปโภคหรือ บริโภค อาหารและผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตออกมามากมายเพื่อตอบโจทย์แก่กลุ่มลูกค้าที่มีความสนใจในการดูแลสุขภาพ มีองค์ประกอบของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ ในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยลดปริมาณหรือทำลายอนุมูลอิสระในร่างกาย ทำให้ชะลอความเสื่อมของเซลล์ได้

ปัจจุบัน มีการศึกษา ค้นคว้า วิจัยเพื่อหา สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใน สมุนไพร ผัก ผลไม้หรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เพื่อนำมา ใช้ในการ บริโภคหรือใช้ประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบสาร ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นมีหลายวิธี ซึ่งขึ้นกับคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ของสารนั้นๆ ได้แก่ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl:DPPH scavenging assay, 2,2'- azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid):ABTS assay, Total phenolic content เป็นต้น แต่ข้อจำกัดของการวิเคราะห์ที่ได้กล่าวไป คือ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่หาสาร ในเชิงสารผสม (Total content) ไม่สามารถจำแนกหรือแยกสารได้ว่าเป็นสารชนิดใดที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แท้จริง รวมถึงแต่

ละวิธีจะมีข้อจำกัด ในเรื่องการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องใช้ความชำนาญการเครื่องตรวจวิเคราะห์และอุปกรณ์มีราคาสูง จึงทำให้การวิเคราะห์เพื่อหาสารใหม่นั้น มีต้นทุนในการศึกษาสูง ทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้หลักการโครมาโตกราฟี แยกสารโดยตัวพาที่เป็นตัวทำละลายไปบนวัสดุของแข็ง ซึ่งขึ้นกับคุณสมบัติของสารแต่ละตัว ความมีขั้วที่ต่างกัน จึงเกิดการเดินทางบนวัสดุของแข็งที่ต่างกัน จากเดิมจะใช้แผ่น TLC ที่เป็นอลูมิเนียมเคลือบด้วยซิลิกาเจล แต่ อุปกรณ์ดังกล่าว มีราคาแพง มีภางที่มีอันตรายต่อคน และสิ่งแวดล้อม ทางผู้วิจัยจึงมีการพัฒนาเทคนิคแยกสารด้วยตัวกลางที่เป็นกระดาษหรือ Paper chromatography: PC ที่มีความปลอดภัยและราคาถูกกว่านำมาใช้แทนแผ่น TLC และทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH assay ร่วมกับการใช้เทคนิคเชิงภาพในการประเมินผล จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) และเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน DPPH assay ที่ใช้ Microplate reader ในการวัดประเมินผล ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ มีต้นทุนต่ำ วิธีวัดผลก็เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่ซับซ้อน และอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้มีราคาไม่สูง นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาสิ่งประดิษฐ์ หรือวิธีในการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น (Screening test) เพื่อให้ได้ชุดทดสอบที่ใช้ในการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ เช่น อาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง เพื่อให้ได้การตรวจวิเคราะห์ที่มีความสะดวก รวดเร็ว เป็นที่ยอมรับ ในวงการวิทยาศาสตร์พร้อมทั้งต้นทุนในการทดสอบที่ต่ำลง และสะดวกในการออกภาคสนาม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยใช้เทคนิคเชิงภาพบนตัวกลางที่เป็นกระดาษและเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน DPPH assay ที่ใช้ microplate
2. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอสตริป (DPPH strip for testing antioxidant activity)

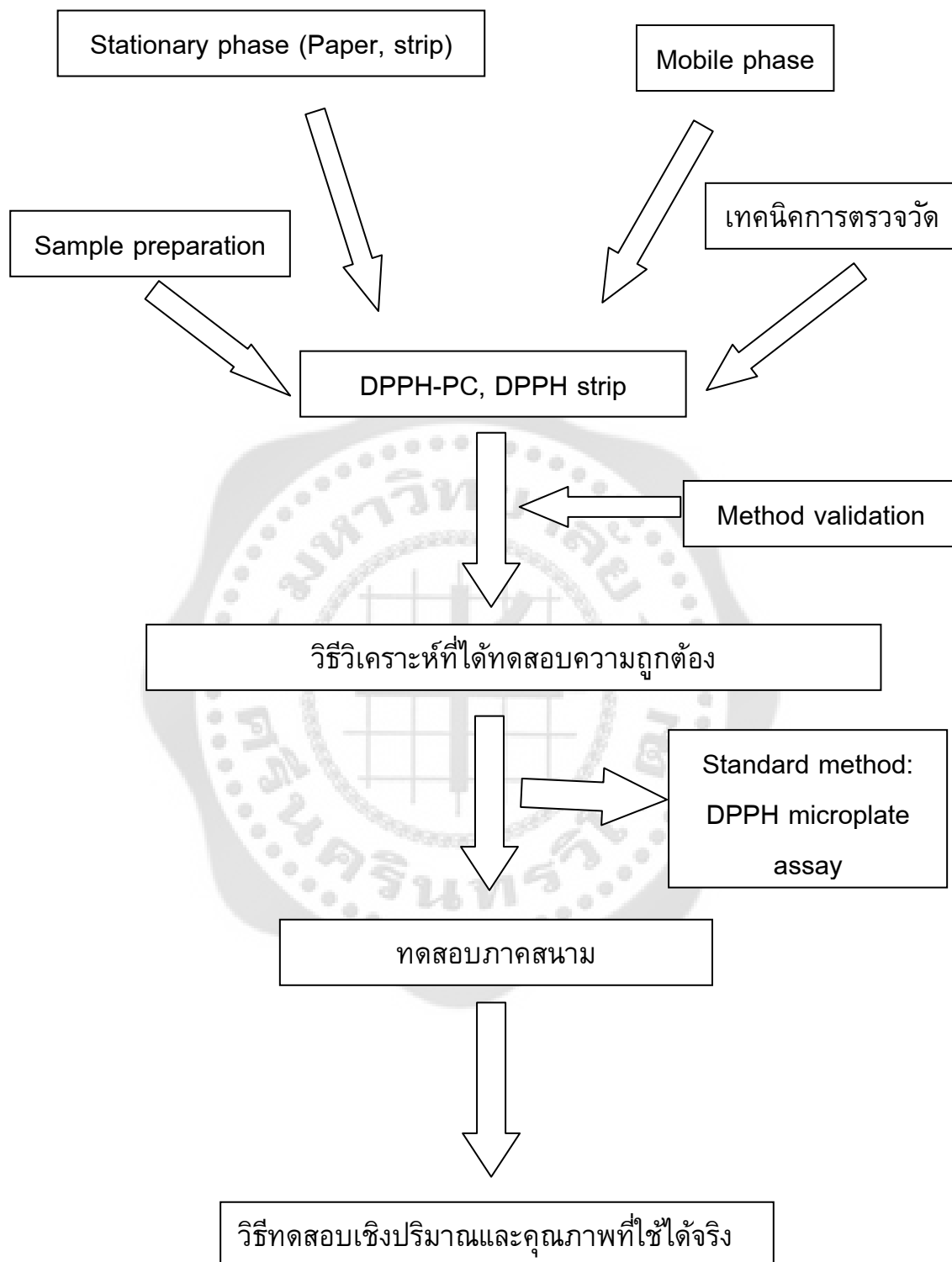
ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองที่มุ่งเน้นการศึกษาและการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคการแยกสารบนกระดาษเซลลูโลส (Paper Chromatography) และใช้การประเมินผลด้วยเทคนิคเชิงภาพ โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 เป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยศึกษาชนิดของวัฏภาคคงที่ (Stationary phase: SP) ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นตัวกลางในการเคลื่อนที่ของสาร ศึกษา สภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase: MP) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้แก่ ชนิด ของสารละลายและอัตราส่วน ของสารละลายผสม ที่ใช้เป็น วัฏภาคเคลื่อนที่ เพื่อให้สารมีระยะทางการเคลื่อนที่บนกระดาษ (Rf) ที่เหมาะสม ในการตรวจวัดนั้นใช้วิธีการจุ่ม (Dipping) กระดาษที่ได้มีการรันสารแล้วลงในสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl:DPPH ในเมทานอล โดยใช้สารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ คือ แอสคอร์บิก แอซิด และจะวัดผลในเชิงคุณภาพจากการเปลี่ยนสีบนกระดาษจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ณ จุดที่มีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นทำการสแกนด้วยเครื่องสแกนแปลงเป็นไฟล์ภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ในการแปลผลและการวิเคราะห์ ผลเพื่อหาสารในเชิงปริมาณ โดยคำนวณจากค่าพิกเซล (Pixel) ที่ตรวจวัดได้แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของ International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use และ FDA guideline และทำการเปรียบเทียบกับวิธี DPPH Scavenging assay ที่ใช้ 96-well plate และอ่านผลโดยเครื่อง Microplate reader และเปรียบเทียบผลการศึกษา สารมาตรฐานและสารตัวอย่างในแต่ละวิธี โดยใช้ค่า IC_{50}

ส่วนที่ 2 เป็นการพัฒนาชุดทดสอบสำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารที่มี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอสโตริป (DPPH strip for antioxidant activity test) สามารถทำการตรวจวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่างในเบื้องต้น (Screening test) เพื่อการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระในภาคสนาม

กรอบแนวคิดของงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม (Literature review)

อนุมูลอิสระ (Free radical) ^(1, 2, 3, 4)

คือโมเลกุลหรืออะตอมของสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอย่างน้อย 1 ตัว (Unpaired electron) ที่โคจรรอบนอกสุด เป็นผลทำให้เกิดความเสถียรต่ำและมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลของสาร อื่นที่อยู่ บริเวณ รอบๆ ของสาร นั้น โดยที่โมเลกุลข้างเคียง จะเกิดการ สูญเสียหรือรับ อิเล็กตรอนกลายเป็น อนุมูลอิสระตัวใหม่ เกิดเป็นวงจรของปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) ซึ่ง ความ สามารถ ในการ เกิด ปฏิกิริยา นั้นจะเกิดขึ้น ภายในร่างกาย โดยผ่านกระบวนการ การขนถ่าย อิเล็กตรอน เพื่อเผาผลาญ สารอาหารให้เกิดเป็นพลังงานโดยใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรีย อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้น นั้นจะไปจับตัวกับออกซิเจน รอบๆ เกิดเป็นอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการ เกิดปฏิกิริยา เรียกว่าปฏิกิริยานี้ว่า Reactive oxygen species (ROS) เช่น อนุมูลอิสระของ Hydroxyl Superoxide เป็นต้น รวมถึงการเกิดอนุมูลอิสระ ของสารชนิดอื่นๆที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย เช่น reactive nitrogen species สารกลุ่ม nitric oxide จากเอนไซม์ เช่น Xanthine oxide lipoygenase เป็นต้น

ตาราง 1 แสดงประเภทของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง ^(1, 3)

อนุมูลอิสระ	สัญลักษณ์	Half life (วินาที)	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species(ROS):			
Superoxide Superoxide anion			
Hydroxyl radical	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6} วินาที	H_2O_2 Ozone (O_3)
Hydroperoxide			
Peroxyl radical	$\cdot OH$	10^{-9} วินาที	Hypobromousacid (HOBr)
Alkoxy	$HO_2\cdot$	คงตัว	Hypochlorousacid (HOCl)
	$ROO\cdot$	1	Singlet oxygen ($O_2^1\Delta_g$)
Carbonate	$RO\cdot$		Organicperoxides (ROOH)
Carbon dioxide	$CO_3\cdot^-$		Peroxynitrite ($ONOO^-$)
	$CO_2\cdot^-$	N/A	Peroxynitrous acid ($ONOOH$)
		N/A	

ตาราง 1 (ต่อ)

อนุมูลอิสระ	สัญลักษณ์	Half life (วินาที)	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive nitrogen species			
(RNS):			
Nitric oxide		1	Nitrous acid (HNO_2) Nitrosyl cation (NO^+),
Nitrogen dioxide	$\text{NO}\cdot$ $\text{NO}_2\cdot, \text{NO}_2^{\cdot-}$	1	Nitroxyl anion (NO^-) Dinitrogen tetroxide (N_2O_4) Dinitrogen trioxide (N_2O_3) Peroxynitrile (ONOO^-) Peroxyntous acid (ONOOH)
Reactive Chlorine species(RCS):			
Atomic Chlorine	$\text{Cl}\cdot$	N/A	Hypochlorous acid (HOCl) Chloramines Chlorine gas (Cl_2)
Other			
Trioxyl radical	$\text{RS}\cdot$	N/A	
N/A ไม่ได้ระบุไว้			

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ^(1, 2, 4)

การเกิดอนุมูลอิสระเป็นกลไกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เป็นกลไกที่เกิดขึ้นเป็นวงจรหรือปฏิกิริยาลูกโซ่ (Free radical chain reaction) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. ระยะการเหนี่ยวนำ (Initiation step) เป็นปฏิกิริยาที่มีการสลายหรือแตกพันธะของโมเลกุลของสารด้วยปฏิกิริยาทางธรรมชาติ เช่น แสง ความร้อน อุณหภูมิและเอนไซม์ต่างๆ ที่อยู่ในเซลล์ ล้วน ส่งผลโดยตรงต่อ การเหนี่ยวนำ ของสาร ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวใหม่ขึ้น ตามสมการที่ 1 การเปลี่ยนนี้ทำให้โมเลกุลหรือสารชีวโมเลกุลแตกออก ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของสารถ่ายยิเล็กตรอน



2. ระยะการเพิ่มจำนวน (Propagation step) จากปฏิกิริยาการเหนี่ยวนำอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นในระยะแรกการเกิดอนุมูลอิสระ จะทำปฏิกิริยาต่อเนื่องไปโดยการดึงอะตอมไฮโดรเจนของสารที่อยู่ใกล้เคียงหรือทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ Ground state จึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ ต่อไปเรื่อย ๆ เป็นวงจร ดังสมการ 2, 3



3. ระยะสิ้นสุด (Termination step) เป็นกระบวนการสิ้นสุดของการเกิดอนุมูลอิสระ เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลมารวมตัวกันได้เป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น จนปฏิกิริยาจึงสิ้นสุดลงดังสมการ 4, 5



อนุมูลอิสระต่อการก่อเกิดโรค^(1, 3, 4)

จากกลไกการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนั้น อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ในระดับเซลล์ที่อยู่ภายในร่างกายมีบทบาทสำคัญต่อการก่อให้เกิดโรคต่างๆ หลายชนิด ทั้ง ที่เป็นต้นเหตุของโรคและปัจจัยที่ส่งผลทำให้เกิดโรค เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นกลไกในกระบวนการเผาผลาญพลังงานของร่างกาย และหลุดออกมา ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นที่อยู่บริเวณรอบๆ ทำให้โมเลกุลแตกตัวออกเกิดเป็นอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว มีความสามารถในการดึงไฮโดรเจนจากโมเลกุลโดยรอบ ทำให้ระบบสมดุลภายในร่างกายผิดปกติไป โดยที่ไปจับกับโมเลกุล ซึ่งวงจรนี้ยังไปทำลายองค์ประกอบของเซลล์ เนื่องจากไป จับกับหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลดีออกซีไรโบส ทำให้โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงไป ส่งผล โดยตรงต่อเซลล์ DNA และทำให้เซลล์ตาย อนุมูลอิสระยังสามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลต่อการพัฒนาการเป็นโรคที่มีความรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมและความผิดปกติของเซลล์ รวมถึงกระบวนการเกิดการอักเสบ ที่ส่งผลโดยตรงต่อเซลล์ประสาท หัวใจและสมอง ได้แก่ โรคหัวใจ โรคความผิดปกติของระบบประสาท ไชมันด์ตันในเส้นเลือด ไชข้ออักเสบ ต้อกระจก เป็นต้น

การป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

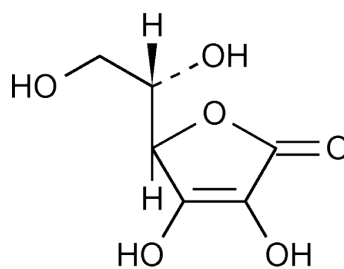
ในธรรมชาติ นั้นสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ มีการกลไกการควบคุมเพื่อไม่ให้มีปริมาณที่สูงเกินไป รวมถึงการรักษาสมดุลของสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ โดยที่ในการควบคุมมีกระบวนการดังนี้

เอนไซม์ในระดับเซลล์^(1, 2, 4) เป็นเอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้น มีหน้าที่ในการควบคุมปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับสมดุลได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) ทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์แคตาเลส (CAT) ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (-GPX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (-ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมีกลูตาไทโอนร่วมในปฏิกิริยา เพื่อปกป้องไม่ให้เซลล์ถูกทำลายหรือเสียหายเมื่อที่ภาวะร่างกายถูกออกซิไดซ์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป

สารคีเลทโลหะ (Metal chelators)^(1, 2) เป็นสารโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับโลหะทรานซิชันที่ก่อให้เกิดอนุมูล $\cdot OH$ เข้ามาในโครงสร้างทำให้สารอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถไปเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้ จึงจัดเป็นสารที่มีกลไกในการควบคุมปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในสภาวะสมดุล

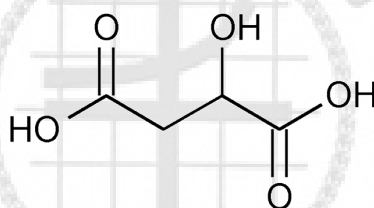
สารต้านอนุมูลอิสระ (Antiradical)^(1, 2, 4) หรือสารที่กำจัดอนุมูลอิสระ (Radical scavenger) เป็นสารที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาเพื่อกำจัดและหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ โดยสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจะพบมากตามธรรมชาติ เช่น พืช ผักและผลไม้ เป็นต้น ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีดังนี้

วิตามินซี มีชื่อทางเคมี (Chemical name) คือ Ascorbic acid หรือ L-Ascorbic acid มีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $C_6H_8O_6$ ⁽⁵⁾ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 176.13 มีสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) เป็นผลึกของแข็ง สีขาว ค่อนข้างเหลือง เป็นสารประกอบที่มีขั้วสูง สามารถละลายได้ดีในน้ำดี และสามารถละลายได้ในเอทานอล เมทานอล ไม่ละลายในสารพวก สารตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่มีขั้ว เช่น Benzene Petroleum ether และ fats⁽²⁾ พบมากในผักสด น้ำผลไม้ประเภทส้ม บล็อกโคลี่ ฝรั่ง ซึ่งเป็นผักผลไม้ที่นิยมในการรับประทาน หน่วยโภชนาการต่อวันคือ 30-75 mg⁽⁶⁾



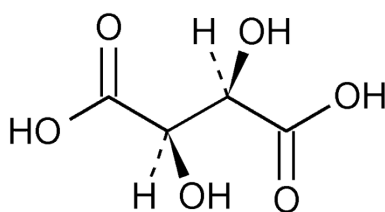
ภาพประกอบ 2 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Ascorbic acid ⁽⁷⁾

มาลิก แอซิด (Malic acid) หรือกรดแอปเปิ้ล มีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $C_4H_6O_5$ ⁽⁷⁾ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 134.08 g/mol มีสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) เป็นผลึกขนาดเล็กสีขาว สามารถละลายได้ดีในน้ำดี พบมากใน แอปเปิ้ล พลัม มะเขือเทศ เป็นต้น



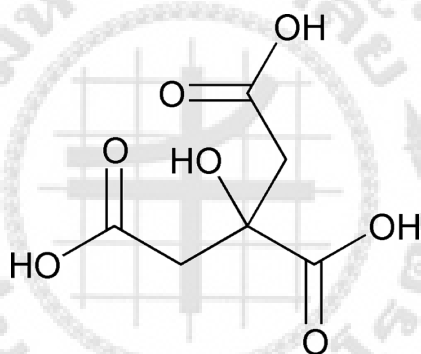
ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Malic acid ⁽⁷⁾

ทาร์ทาริก แอซิด (Tartaric acid) มีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $C_4H_6O_6$ ⁽⁷⁾ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 150.08 g/mol มีสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) เป็นผลึกสีขาว สามารถละลายได้ดีในน้ำดี พบมาในธรรมชาติของพืช เช่น องุ่น มะขาม เป็นต้น



ภาพประกอบ 4 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Tartaric acid ⁽⁷⁾

ซิตริก แอซิด (Citric acid) มีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $C_6H_{10}O_8$ ⁽⁷⁾ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 210.13 g/mol มีสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) เป็นผลึกสีขาว สามารถละลายได้ดีในน้ำดี พบมาในธรรมชาติของพืช เช่น ตระกูลส้ม มะนาว เป็นต้น

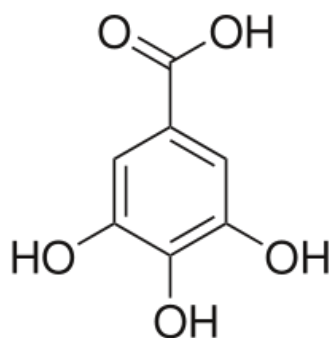


ภาพประกอบ 5 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Citric acid ⁽⁷⁾

สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds)

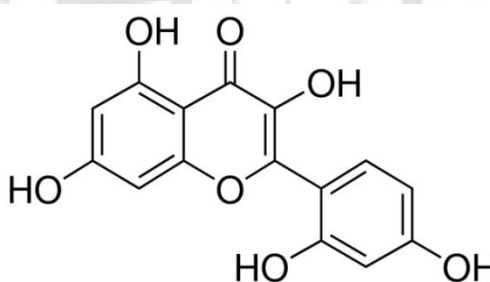
เป็นสารประกอบฟีนอลเป็นสารที่พบมากในพืชทั่วไป จะมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอโรมาติกและการจับของหมู่ไฮดรอกซี ตัวอย่างเช่น

กรดแกลลิก (Gallic acid) ^(1, 7) หรือ Trihydroxybenzoic acid โดยมีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $C_6H_2(OH)_3COOH$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 170.12 g/mol สมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) เป็นผลึกของแข็งมีสีขาว เหลืองอ่อน สามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ อะซิโตน



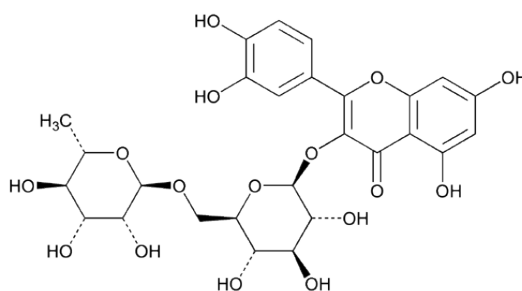
ภาพประกอบ 6 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Gallic acid ⁽⁷⁾

เคอร์ซีทิน (Quercetin) ^(7, 8) เป็นสารกลุ่ม Flavonols โดยมีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $C_{15}H_{10}O_7$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 302.04 g/mol สมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) เป็นผงสีเหลือง สามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ อะซิโตน เป็นต้น พบมากในผลิตภัณฑ์ชา เปะก๊วย แอปเปิ้ล องุ่น เป็นต้น



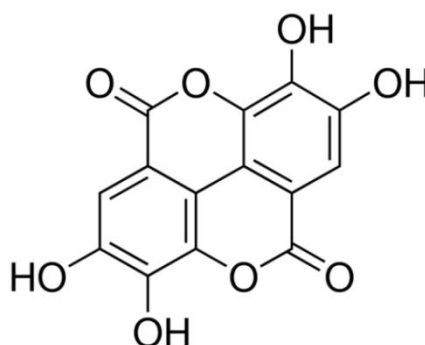
ภาพประกอบ 7 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Quercetin ^(7, 8)

รูติน (Rutin) ^(7, 9) เป็นสารในกลุ่ม Flavonoid glycoside โดยมีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $C_{27}H_{30}O_{16}$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 610.51 g/mol สมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) ผงสีขาว พบมากในพืช เปะก๊วย ชา เป็นต้น



ภาพประกอบ 8 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Rutin ⁽⁷⁾

เอลลาจิก แอซิด (Ellagic acid) ⁽⁷⁾ โดยมีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $C_{14}H_6O_8$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 302.19 g/mol สมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) เป็นผงเหลือง สามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ และน้ำ พบมากในทับทิม



ภาพประกอบ 9 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสาร Ellagic acid ⁽⁷⁾

จากตัวอย่างสารที่กล่าวไปนั้นล้วนแล้วเป็นสารที่พบมากโดยทั่วไปในธรรมชาติ ซึ่งผู้ผลิตได้มีการอ้างสรรพคุณของสินค้าที่มาจากธรรมชาตินั้น มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น ผลิตภัณฑ์ดังนี้

ชา (ชื่อสามัญ Tea) ^(10, 11) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Camellia sinensis* L. วงศ์ *Theaceae*

ปัจจุบันได้นำชามาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่ได้รับความนิยม สามารถแบ่งออกเป็น 6 ชนิดดังนี้ ชาเขียว ชาขาว ชาดำ ชาอู่หลง ชาแดง และชาผู่เออร์ ซึ่งชา อุดมไปด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่น แคททีชิน รูทีน เคอร์ซีทีน และสารกลุ่มฟีนอลิก แอซิด เป็นต้น



ภาพประกอบ 10 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์ชาชงในท้องตลาด

มะรุม^(12, 13) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Moringa oleifera* Lam. ชื่อวงศ์ MORINGACEAE นิยมนำมาทำการสกัดเพื่อให้ได้น้ำมัน สรรพคุณใช้ในการเสริมความงามชะลอการแก่ เป็นสารต้านมะเร็ง ลดไขมันและคอเลสเตอรอลได้ เนื่องจากน้ำมันมะรุมอุดมไปด้วยสารฟลาโวนอยด์ รูทีนแล ะเคอร์ซีติน จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมในการใช้ในปัจจุบัน



ภาพประกอบ 11 แสดงลักษณะของพืชมะรุม (ซ้าย) แสดงผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะรุม (ขวา)

วิธีวิเคราะห์ความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity: TAC)^(1, 14)

วิธีการวิเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ถูกคิดค้นและพัฒนาวิธีขึ้น เพื่อศึกษาหาปริมาณสารและตรวจวัดประสิทธิภาพของโมเลกุลของสารธรรมชาติหรือสารใหม่ เป็นตัวชี้วัดในการหาปริมาณสารต้านออกซิเดชันหรือปริมาณการเกิดชีวโมเลกุลที่ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์มีหลักการ 2 กระบวนการ คือ

1. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer: HAT)

เป็นวิธีการศึกษาพลังงานที่ทำให้พันธะของหมู่ที่จะให้อะตอมไฮโดรเจน แตกออก (Bond Dissociation Energy: BDE) เช่น

1.1 วิธี Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC)⁽¹⁾

เป็นการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการทดสอบประสิทธิภาพของสารในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนในการเรืองแสง ได้แก่ β -phycoerythrin หรือ γ -phycoerythrin (PE) เป็นต้น การทดสอบใช้สารมาตรฐานคือ Trolox (α -tocopherol) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ 2,2'-azobis (2amidinopropane) dihydrochloride แสดงค่าเป็น ORAC value หรือจำนวนโมล μmol

1.2 วิธี Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP)⁽¹⁾

เป็นการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,2-Azino-Bis-(3-Ethyl benz thiazoline-sulfonic acid) (ABTS) กับสาร Metmyoglobin และ H_2O_2 ได้สารอนุมูลอิสระของ ABTS $^{\cdot-}$ ที่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 731 นาโนเมตร

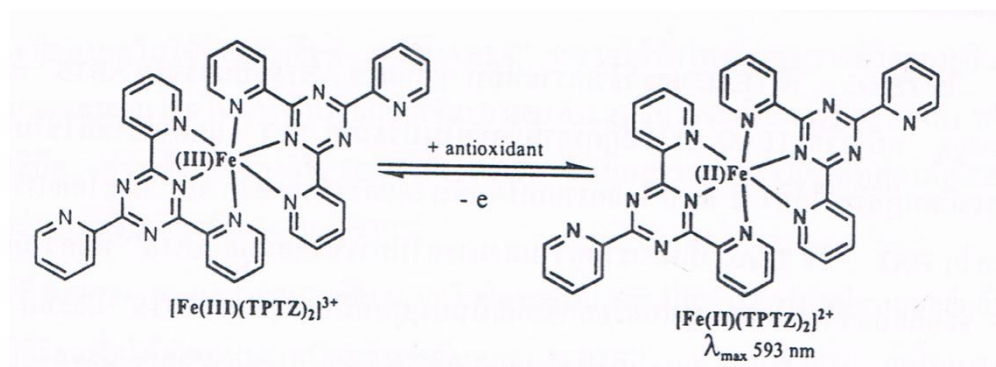
2. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron Transfer: ET หรือ SET)

เป็นวิธีการศึกษาหาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์ของสารอื่นประกอบด้วยวิธีทดสอบดังนี้

2.1 Ferric reducing ability of plasma assay: FRAP assay^(1, 14)

เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ (Reducing agent) โดยศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา โดยใช้สารคือ Ferric Tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPLZ) complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทำปฏิกิริยาได้เป็นสาร Fe^{2+} -TPLZ complex ที่มีสีน้ำเงินโดยที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 731 นาโนเมตร

กลืนแสงที่ 593-595 นาโนเมตร จากผลการทดสอบที่ได้จะรายงานผลเป็นความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ (Total reducing power) ที่เปลี่ยน Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} (ภาพประกอบ 12) โดยที่เทียบกับสารมาตรฐานคือโทลอกซ์ (Trolox) แสดงผลในการต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า FRAP value



ภาพประกอบ 12 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของวิธี Ferric reducing ability of plasma assay:

FRAP assay ⁽¹⁾

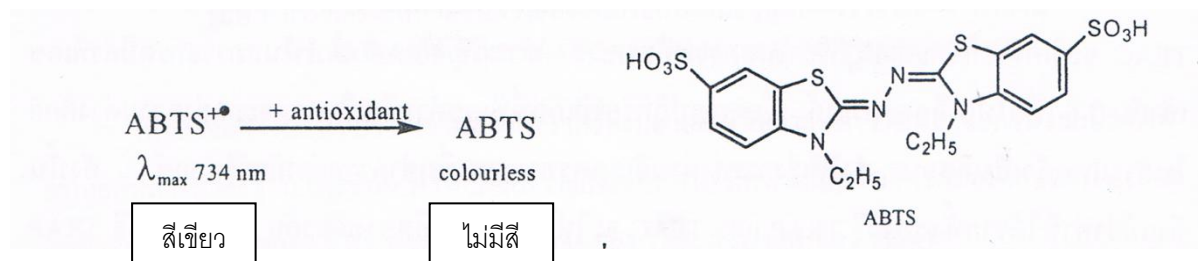
ข้อดีในการทดสอบวิธีนี้ คือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาในการทดสอบสั้น และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่พิเศษหรือเฉพาะทาง สามารถวัดผลได้ทั้งสารสกัดและสารจากธรรมชาติได้เช่นสารที่มีการให้อิเล็กตรอนได้คือ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) แคทีชิน (Catechins) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เป็นต้น

ข้อเสียในการทดสอบวิธีนี้ คือ กลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกของสารที่ก่อให้เกิดอนุมูลภายในเซลล์และร่างกาย

2.2 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay: TEAC assay ^(1, 14, 15)

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid): ABTS เป็นสารที่เกิดจากการสังเคราะห์ โดยมีสูตรโมเลกุล (molecular formula) $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$ น้ำหนักของสาร 514.62 g/mol การละลายสามารถละลายได้ในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ เป็นอนุมูลที่มีความคงตัว สารละลายมีสีเขียว ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ซึ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยา คือ ที่ ABTS จะถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลเปอร์ออกไซด์ เกิดเป็นอนุมูลประจุบวก $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ที่มีสีเขียวและสารที่

มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยาจับกับสาร $ABTS^{\cdot+}$ ที่มีสีเขียว ทำให้สีเขียวปริมาณลดลง เป็นการแสดงถึงความสามารถของสารที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (ภาพประกอบ 13)



ภาพประกอบ 13 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid): ABTS ⁽¹⁾

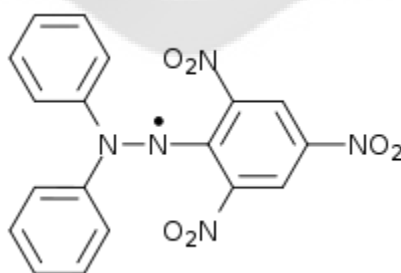
วิธีการคำนวณ

$$\% \text{Inhibition} = [(Abs_{\text{control734}} - Abs_{\text{test sample734}}) / Abs_{\text{control734}}] \times 100$$

ข้อดีในการทดสอบวิธีนี้ คือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อยในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถวิเคราะห์ได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง ทำให้สามารถศึกษาเกลือได้โดยละเอียด สามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำและละลายในไขมันได้

ข้อเสียในการทดสอบวิธีนี้ คือ กลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เกี่ยวข้องกับสารที่ก่อให้เกิดอนุมูลของเซลล์และกลไกภายในร่างกาย

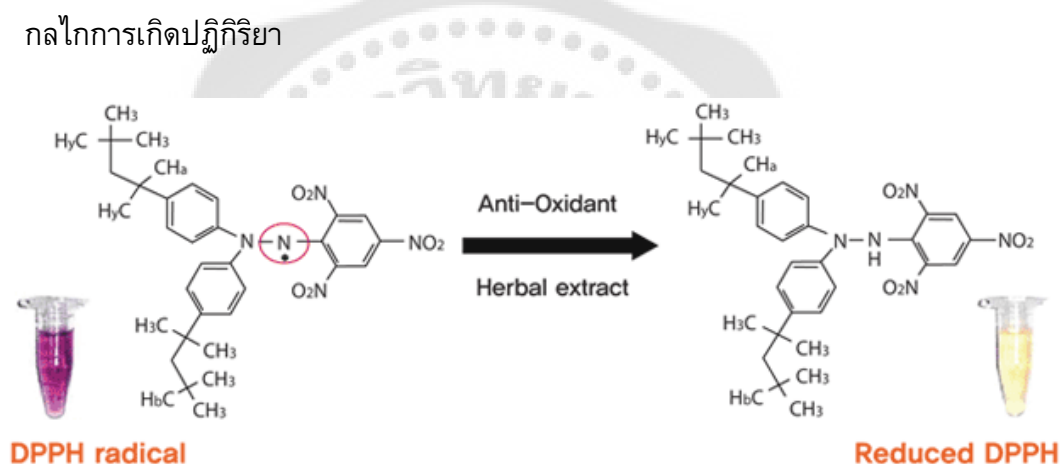
2.3 Diphenyl -1-picrylhydrazyl assay (DPPH scavenging assay) ^(1, 14, 16, 17, 18)



ภาพประกอบ 14 แสดงสูตรโครงสร้าง 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical ⁽¹⁴⁾

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6

trinitrophenyl)hydrazyl หรือ DPPH (ภาพประกอบ 14) เป็นสารสังเคราะห์ มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{12}N_5O_6$ น้ำหนักของสาร 394.32 g/mol ความสามารถในการละลายได้ในตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล ไม่ละลายน้ำ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว เมื่อละลายในสารละลายจะมีสีม่วง ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นตัวให้อิเลคตรอนของสาร เพื่อหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารตัวอย่างหรือสารธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษา โดยวิธีการศึกษาจะอาศัยหลักการรีดิวซ์ของสารตัวอย่างหรือสารธรรมชาติที่มีการให้อิเลคตรอนกับสารที่ใช้ในการตรวจสอบ ทำให้ สาร DPPH เกิดความสมมูลขึ้น จะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟเมทรีในการ วัดการเฟสสีหรือการลดลงของสีม่วงของสาร DPPH ไปเป็นสีเหลือง (ภาพประกอบ 15) เมื่อมีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการศึกษาคือ 515-517 นาโนเมตร



ภาพประกอบ 15 แสดงกลไกของ DPPH radical scavenging assay ⁽¹⁴⁾

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{Inhibition} = [(Abs_{\text{control}517} - Abs_{\text{test sample}517}) / Abs_{\text{control}517}] \times 100$$

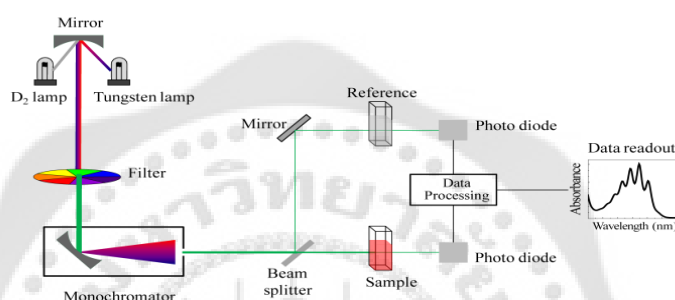
ข้อดีในการทดสอบด้วยวิธีนี้ คือ ง่ายและสะดวก เป็นเครื่องมือที่ใช้ได้โดยทั่วไปโดยวัดการลดลงของการเปลี่ยนสีจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง ของสารที่ใช้ในการศึกษาเพื่อเป็นการตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อผสมกับสาร DPPH ใช้เป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นในการวัดสารสกัดจากธรรมชาติ

ข้อเสียในการทดสอบด้วยวิธีนี้ คือ ไม่สามารถแยกแยะอนุมูลที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสาร DPPH เป็นอิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะ

ถูกบดบังด้วยวงของเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่บางชนิดไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้หรือเข้าไปได้ช้ากว่าความเป็นจริง และไม่สามารถวัดการเกิดปฏิกิริยาในตัวอย่างเลือดได้ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาในเอทานอลหรือเมทานอล ซึ่งสามารถทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

วิธีวิเคราะห์ DPPH scavenging assay โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์มีดังนี้^(14, 17, 19)

1. Ultraviolet–visible spectroscopy (UV-vis)

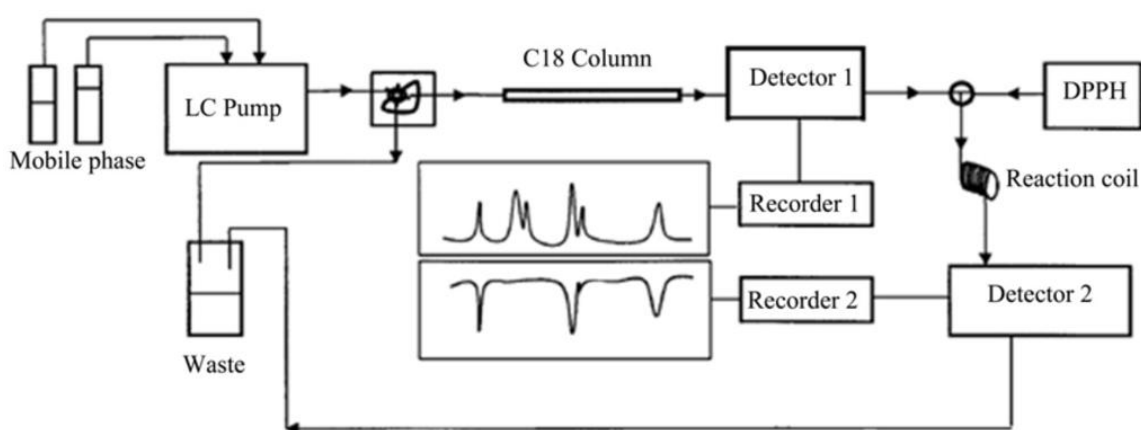


ภาพประกอบ 16 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง Ultraviolet–visible spectroscopy (UV-vis)⁽²⁰⁾

เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเพื่อใช้ในการศึกษาหาปริมาณสารใหม่ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการทดสอบ จะทดสอบเป็นแบบใช้คิวเวตหรือ 96-well plate ในการทดสอบจะเตรียมสารมาตรฐานเพื่อใช้ในการศึกษาหาปริมาณจากกราฟความสัมพันธ์ โดยที่เตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งในรูปของสารสกัดหรือสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มาทำการละลายผสมเข้ากับสารละลายของ DPPH และจากนั้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเพื่อป้องกันไม่ให้แสงมีผลในการรบกวนการเกิดปฏิกิริยาของสาร DPPH เมื่อครบกำหนดเวลามาทำการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 515 – 517 นาโนเมตร วัดค่าการเปลี่ยนแปลงของสีหรือการเฟสสีของสารละลาย DPPH จากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากการรายงานผลการทดสอบจะแสดงด้วยค่า IC_{50} ในการตรวจวิเคราะห์จะต้องเตรียมสารมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อใช้ในการคำนวณสร้างกราฟความสัมพันธ์เพื่อหาในเชิงปริมาณ ข้อจำกัดของเครื่องมือคือไม่สามารถระบุหรือแยกได้ว่าเป็นสารชนิดใดที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากเป็นสารที่ใช้เป็นสารผสมที่อยู่ในรูปแบบของสารสกัดหยาบหรือสารจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

2. On-line coupling HPLC-DPPH assay ^(14, 19, 21)

เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ถูกพัฒนาขึ้น มาเพื่อศึกษาและแยกชนิดของสารสำคัญในพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีหลักการคือทำการแยกสารผ่านคอลัมน์ C18 (Positive peak-พีคหัวตั้ง) พร้อมกับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Negative peak-พีคหัวกลับ) ในเวลาเดียวกัน ทำให้สามารถบอกชนิดของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (รูปภาพที่ 17) ข้อจำกัด เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษานั้นมีความจำเพาะเจาะจง มีราคาแพงและยังจำกัดการใช้งานเนื่องจากขาดบุคลากร ที่มีความเชี่ยวชาญในเครื่องมือ อีกทั้งในการวิเคราะห์ต้องมีสารมาตรฐานเทียบเพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าเป็นสารชนิดใด จึงทำให้ต้นทุนในการศึกษาเพื่อหาสารใหม่สูง และการทดสอบจำเป็นต้องศึกษาควบคู่กับการใช้การทดสอบอื่นช่วยในการระบุว่าเป็นสารใดเช่น MS, NMR เป็นต้น



ภาพประกอบ 17 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง On-line HPLC-DPPH ⁽²¹⁾

3. Thin-layer chromatography, TLC-DPPH ^(14, 17, 19)

เป็นวิธีการทดสอบที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อแยกสารเบื้องต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ในงานตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณ โดยการพ่นหรือจุ่มลงในสารละลาย DPPH เพื่อใช้ในการตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยที่จะเปลี่ยนสีจากสีม่วงของ DPPH บนแผ่น TLC ไปเป็นสีเหลือง ณ จุดบริเวณที่มีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ การแปลผลสามารถตรวจสอบเชิงคุณภาพโดยการดูการเปลี่ยนสีโดยตรงบนแผ่น TLC หรือการหาสารเชิงปริมาณร่วมกับการใช้เทคนิคเชิงภาพเช่น โดยใช้โปรแกรม ImageJ Adobe Photoshop เป็นต้น

ตาราง 2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของวิธีวิเคราะห์ DPPH scavenging assay^(14, 17, 19, 21)

เครื่องมือวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
UV-spectroscopy	- เป็นวิธีที่นิยมและยอมรับ - วิเคราะห์หาค่า IC₅₀ ของสารได้ - สามารถตรวจหาสารหลายชนิดในเวลาเดียวกัน	- ไม่สามารถแยกสารเดี่ยวได้ - ต้องทำ Standard curve เสมอ - ค่าใช้จ่ายสูงเครื่องมือราคาสูง - ผู้ใช้งานต้องมีความชำนาญสูง - อุปกรณ์ไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้
On-line HPLC-DPPH	- สามารถแยกสารเดี่ยวได้ - มีความแม่นยำสูง - สามารถหาค่าในเชิงปริมาณได้ - สามารถแยกและทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ ในเวลาเดียวกันของการทดสอบ	- อุปกรณ์มีความจำเพาะเจาะจงและมีราคาแพงเช่น Column เครื่อง HPLC เป็นต้น - ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารใดต้องมีสารมาตรฐาน - ต้องใช้ควบคุมเครื่องมืออื่นในการจัดจำแนกสารเช่น NMR MS เป็นต้น - ไม่สามารถใช้น้ำยาที่มีฤทธิ์กัดกร่อนได้
TLC-DPPH	- สามารถแยกสารผสมได้ - เชิงปริมาณและคุณภาพได้ - ต้นทุนในการศึกษาต่ำ - สามารถทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อย - แปลผลเป็นเทคนิคเชิงภาพได้ - สามารถตรวจหาสารหลายชนิดในเวลาเดียวกัน - อุปกรณ์มีขนาดเล็กสามารถเคลื่อนย้ายได้	- TLC เคลือบด้วยผงซิลิกา ที่เป็นอันตราย - ต้องใช้สารในการทดสอบปริมาณสูง - ความไวในการทดสอบต่ำ - สารที่มีสีอาจรบกวนการเห็นสีของจุดที่ Spot - ใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย

จากรายงานที่ได้กล่าวไป วิธีทดสอบหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี แต่วิธีที่เป็นที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คือ UV-spectroscopy และแปลผลออกมาเป็นค่า IC₅₀ ซึ่งค่าที่ได้ นั้นเป็นค่าที่เกิดจากการวิเคราะห์หา สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในเชิงรวม ไม่สามารถจัด จำแนกแยกได้ว่าเป็นสารชนิดใด มีปริมาณเท่าใด ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยการ

นำหลักการการแยกสาร (Chromatography) มาประยุกต์ใช้ในการหาสารใหม่เช่นวิธี On-line HPLC-DPPH, TLC-DPPH เป็นต้น ในรายงานวิจัยนี้ได้สนใจนำหลักการการแยกสารบนตัวกลางมาศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ โดยการแยกสารบนตัวกลางเป็นกระดาษเซลลูโลส มาใช้ในการศึกษาและประมวลผลโดยใช้เทคนิคเชิงภาพเพื่อใช้ในการหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

วิธีโครมาโทกราฟี (Chromatography)

เป็นเทคนิคการแยกสารที่ถูกค้นพบในศตวรรษที่ 19 เป็นการศึกษาการแยกสาร ที่เป็นของเหลว บนตัวกลาง มีการค้นคว้าและพัฒนาเพื่อใช้ในการแยกสารที่มีคุณสมบัติละลายในตัวทำละลายและเคลื่อนที่บนตัวกลาง เพื่อแยกสารผสมหรือสารที่มีการปนกันอยู่ให้แยกออกจากกัน ซึ่งวิธีที่ได้มีการศึกษาและพัฒนาขึ้นมี หลายวิธี เพื่อที่จะนำไปใช้ในการทดสอบให้ได้ ผลการทดสอบที่มีความถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งแตกต่างกัน ตามวัตถุประสงค์ของการศึกษา สามารถแปรผลในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ ⁽²²⁾ ตัวอย่างของวิธีการหาสารโดยใช้หลักการการแยกสาร เช่น โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC), โครมาโทกราฟีแบบชั้นบางสมรรถนะสูง (High performance thin-layer chromatography: HPTLC), โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin-layer chromatography: TLC) และ โครมาโทกราฟีแบบแผ่นกระดาษ (Paper chromatography: PC) เป็นต้น ซึ่งวิธีที่ได้กล่าวไป เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง ในการจำแนกสารตรวจเอกลักษณ์ (Identification) การหาสารในเชิงคุณภาพ (Qualitative) และหาปริมาณสาร (Quantitative)

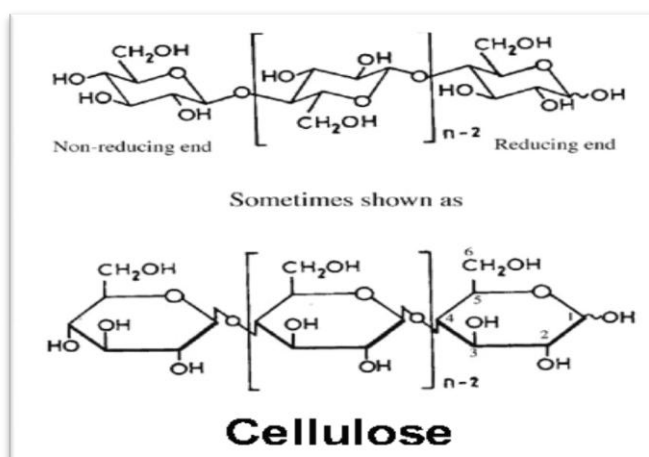
วิธีการแยกสารด้วยกระดาษ ถูกคิดค้นโดย Runge ⁽²²⁾ ในปี ค.ศ.1850 ในการแยกสารอนินทรีย์ผสม โดยใช้วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) เป็นกระดาษเซลลูโลส ซึ่งในกระดาษเซลลูโลสมีโมเลกุลของน้ำอยู่ จึงทำให้มีคุณสมบัติในการแทรกซึมบนกระดาษเซลลูโลสได้ดี จึงสามารถนำพาสารเคลื่อนที่และแยกสารที่มีคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ แยกออกจากกันได้ ในการศึกษาสารได้คำนึงถึงสารที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ วิธีนี้สามารถแสดง ผลการทดสอบในเชิง คุณภาพ (Qualitative) ^(5, 22) และแบบกึ่งปริมาณ (Semi-Quantitative) ^(22, 23) และในปัจจุบันได้มีความสนใจที่จะนำวิธีดังกล่าวมาพัฒนาในการตรวจหาสารที่สนใจศึกษา เพื่อลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์สารลดการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ที่มีราคาสูง และยังให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำรวดเร็ว

งานวิจัยที่ได้มีการนำกระดาษมาใช้ในการพัฒนาวิธีการทดสอบสาร เพื่อให้มีวิธีที่หลากหลายในการทดสอบ อีกทั้งยังเป็นการศึกษาหาวิธีใหม่ที่ให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง

แม่นยำ จึงได้นำเทคนิคการแยกสารด้วยกระดาษ (PC) มาตรวจหาสารชนิดต่างๆ อย่างเช่น การใช้เทคนิคการแยกสารด้วยกระดาษ ในการศึกษาการแยกสารสีผสมอาหาร⁽²⁴⁾ เนื่องจากต้องการศึกษาการเคลื่อนที่ของสารสีที่ละลายน้ำได้ รวมถึงใช้ระยะเวลาในการศึกษาน้อยและประหยัด การนำกระดาษมาพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารเคมีที่ปนเปื้อนในผัก⁽²⁵⁾ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เคมีรังสีของ Na^{18}F ⁽²⁶⁾ การใช้เทคนิคการแยกด้วยกระดาษควบคู่กับ DCBI-MS ในการวิเคราะห์หาคลอเฟนิรามีนในพืช⁽²⁷⁾ ซึ่งในงานวิจัยที่ได้กล่าวไปนั้น เป็นทางเลือกในการตรวจวิเคราะห์หาสารที่น่าสนใจ แต่ไม่พบการศึกษาและการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay โดยใช้เทคนิคการแยกสารด้วยกระดาษ ในงานวิจัยนี้ได้สนใจนำวิธีการแยกสารของเหลวด้วยกระดาษเซลลูโลส มาพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับสารมาตรฐานในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สมุนไพร ผักและผลไม้ เนื่องจากสารที่น่าสนใจในการศึกษานั้นเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในพืชผักและผลไม้ ที่มีคุณสมบัติของสารสามารถละลายน้ำได้ อีกทั้งวิธีดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่สะดวก ง่าย และประหยัด รวมถึงการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่มีอยู่มาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์การตรวจหาสารและสามารถแยกสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างได้ โดยหลักการการแยกสารบนกระดาษมีองค์ประกอบดังนี้

1. วัฏภาคคงที่ (Stationary phase, SP)

วัฏภาคคงที่เป็นตัวกลางที่เป็นกระดาษ และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่จะเคลื่อนที่พาสารไปบนกระดาษหลักการแยกสารจะอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ เรียกว่า พาร์ติชันโครมาโทกราฟี (Partition chromatography)⁽²⁸⁾ โครงสร้างของเซลลูโลสมีการจับตัวเรียงกันของเส้นใยเซลลูโลส โดยที่มีสายยาวประมาณ 2000 หน่วยของกลูโคสในการจัดเรียงตัวนี้จะเรียงตัวแบบ β -glucopyranise ต่อเชื่อมด้วยพันธะ (1-4) linkage (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 18 แสดงกระดาษเซลลูโลส⁽²⁹⁾

ในงานวิจัยนี้ได้สนใจกระดาษเซลลูโลสมาใช้เป็นวัฏภาคคงที่ เนื่องจากกระดาษเซลลูโลสเป็นตัวดูดซับที่ได้จากธรรมชาติ ใช้เยกสารที่มีขั้วมากได้ดี⁽²²⁾ ตัวอย่างสารที่ใช้กระดาษเซลลูโลสเป็นตัวกลางในการวิเคราะห์ เช่น สารโพลิโกแซคคาไรด์ เปปไทด์ สารกลุ่มฟีนอลิก เป็นต้น

2. วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase, MP)

วัฏภาคเคลื่อนที่ มีหน้าที่ในการนำพาตัวถูกละลายเคลื่อนที่ไปบนวัฏภาคคงที่ วัฏภาคเคลื่อนที่จะประกอบด้วยตัวทำละลายตั้งแต่ 1 ชนิดหรือมากกว่า ผสมกันเพื่อให้เกิดความมีขั้วที่แตกต่างกัน ตัวถูกละลายที่สามารถแพร่ ผ่านได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ไปได้ไกลจากจุดเริ่มต้น ดังนั้นจึงมีการปรับชนิดและอัตราส่วนของสารตัวทำละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ให้พอเหมาะที่สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยระยะทางที่ต่างกัน (R_f) โดยจะพิจารณาจากความมีขั้ว (polarity index, P') และความจำเพาะ (selectivity) ของตัวทำละลาย เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงความมีขั้ว (Polar) ของสารตัวทำละลาย ^(17, 28)

ตัวทำละลาย	Polarity index: P'
n-buty ether	2.1
diisopropyl ether	2.4
Toluene	2.4
Methy t-butyl ether	2.7
Benzene	2.7
Diethyl ether	2.8
Dichloromethane	3.1
Dichloroethane	3.5
N-butanol	3.9
Iso-propanol	3.9
n-propanol	4.0
Tetrahydrofuran	4.0
Chloroform	4.1
Ethanol	4.3
Nitrobenzene	4.4
Ethyl acetate	4.4
Methyl ethyl ketone	4.7
Dioxin	4.8
Methanol	5.1
Acetone	5.1
Pyridine	5.3
Methoxyethanol	5.5
Acetonitrile	5.8
Acetic acid	6.0
Nitromethane	6.0
Dimethylformamide	6.4
Formamine	9.6
Water	10.2

หมายเหตุ P' คือ ค่าความมีขั้วของสาร

3. การวิเคราะห์และการตรวจวัด

การตรวจวิเคราะห์หาสารบนกระดาษสามารถใช้ได้หลายวิธี เนื่องจากวิธีที่เราสนใจและพัฒนาวิธีการรันของสารผ่านตัวกลางในการตรวจวัดได้โดยการสเปกโตรเมตรี การจุ่ม หรือ การอ้อมของสารที่อ้อมตัวทำให้เกิดจุดของสารที่ต้องการศึกษา โดยที่เกณฑ์การ ศึกษาด้วยวิธีทางกายภาพ คือ การดูสี และขนาดของจุดสาร ศึกษาค่าการเคลื่อนที่ของสารได้ผ่านตัว กลางหรือภูมิภาคคงที่ นอกจากนี้การหาปริมาณสารอีกวิธี คือวัดค่าการดูดกลืนแสง อัลตราไวโอเลตหรือ ฟลูออเรสเซนซ์

4. การแปลผลการทดสอบ

การแปลผลของการทดสอบสามารถแปลผลได้ตามลักษณะของงานที่ใช้ในการศึกษาโดยที่ขึ้นกับการเลือกวิธีการตรวจสอบโดยที่จะแบ่งออกได้เป็นดังนี้

4.1 การประเมินด้วยสายตา

เป็นการศึกษาโดยการเปรียบเทียบขนาดของพื้นที่ของสารที่ทำการจุดสาร (Spot) โดยคำนึงถึงการติดสีและความเข้มของการติดสีบนตัวกลาง จะทำการเปรียบเทียบระหว่างจุดของสารตัวอย่างที่ศึกษากับจุดของสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อหาความเข้มข้นเบื้องต้นของสารผสมนั้นมีสารที่ต้องการศึกษาหรือไม่ (Pre-screening) อีกทั้งยังศึกษาค่าระยะการเคลื่อนที่ ของสาร (Rf) ที่เคลื่อนที่ไปบนตัวกลางเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยวัดจากจุดกึ่งกลางของแถบสาร ค่า Rf จะมีค่าไม่เกิน 1 และจะเป็นค่าเฉพาะของสารในสถานะหนึ่งๆ

$$\text{วิธีการคำนวณหาค่า } R_f^{(28, 30)} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

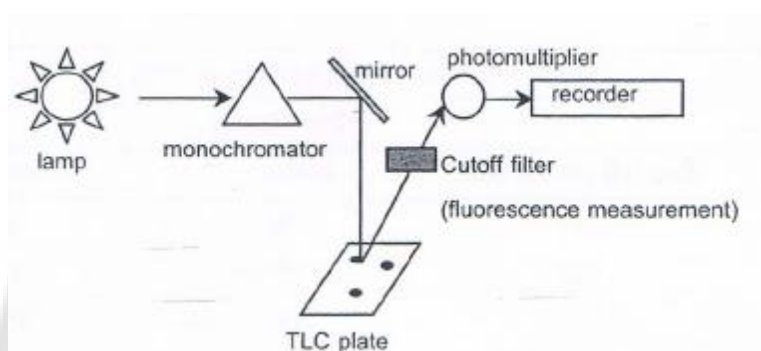
4.2 การศึกษาด้วยเทคนิคเชิงภาพ

ในปัจจุบันงานวิจัยได้นำเทคโนโลยีทางด้านภาพเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์และแปลผลข้อมูล มีโปรแกรมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพนิ่งเพื่อหาค่าความสัมพันธ์ เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้งาน เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และสะดวก สามารถทำงานได้ทุกที่เพียงแค่มีคอมพิวเตอร์และโปรแกรมการวิเคราะห์เชิงภาพ ได้มาซึ่งผลการทดสอบที่มีความน่าเชื่อถือ การใช้เทคนิคเชิงภาพเป็นกระบวนการหนึ่ง ที่นักวิจัยให้ความสนใจและเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเป็นจำนวนมาก โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

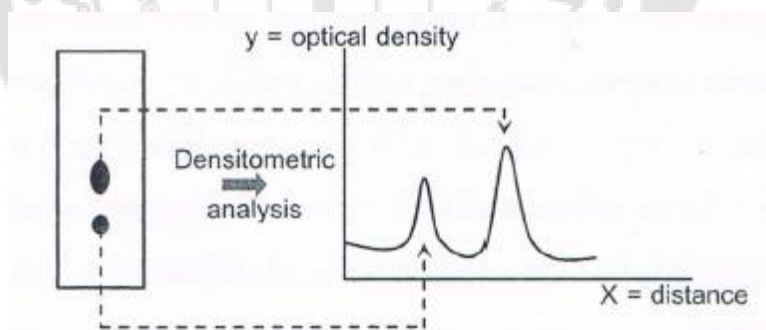
4.2.1 การวิเคราะห์โดยวิธีเดนสิโตเมตรี^(17, 28)

การวิเคราะห์โดยวิธีเดนสิโตเมตรี (Densitometry) คือ การตรวจวัดสารบนแผ่น HPTLC หรือแผ่น TLC ใช้กับงาน วิเคราะห์เชิงปริมาณโดยที่จะวัดการดูดกลืนแสง (Absorption) หรือฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) ของสารในช่วงความยาวคลื่นอัลตราไวโอเลต

190-400 นาโนเมตร และคลื่นแสงสี (Visible) 400-800 นาโนเมตร หลักการทำงานจะวัดจากโหมดการสะท้อน (Reflectance mode) เครื่องจะทำการตรวจจับสัญญาณความแตกต่างของปริมาณแสงสะท้อนบริเวณจุดที่ต้องการวัดเทียบกับบริเวณพื้น และแสดงเป็น กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารกับระยะทางบนแผ่นที่ใช้ในการทดสอบ เรียกว่า เดนซิโตแกรม (Densitogram) แสดงผลออกมาในรูปกราฟ พื้นที่ใต้กราฟแต่ละบริเวณจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มและปริมาณของสารที่มีอยู่ในบริเวณนั้น



ภาพประกอบ 19 หลักการตรวจวัดของวิธีเดนสิโตเมตรี ⁽²⁸⁾



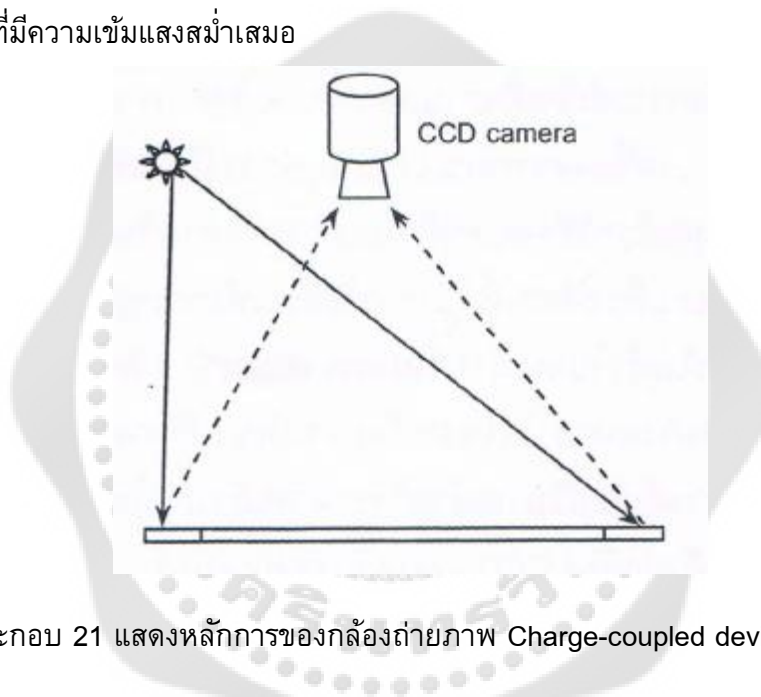
ภาพประกอบ 20 แสดงการแปลผลของการตรวจวัดด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ ⁽²⁸⁾

4.2.2 การวิเคราะห์เชิงภาพ (Image analysis)

การวิเคราะห์เชิงภาพ เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลจากรูปภาพ มีการประยุกต์ใช้ในหลายงานเช่น ทางการแพทย์ ทางด้านวิศวกรรม เป็นต้น ประกอบด้วย

4.2.2.1 กล้องถ่ายภาพ Charge-coupled device: CCD ^(28, 30)

เป็นกล้องที่มีความละเอียดของภาพสูง ทำจากวัสดุที่ประดิษฐ์จากซิลิกอนที่ถูกแบ่งออกเป็นช่องเล็กๆ ซึ่งแต่ละช่องเรียกว่า พิกเซล (Pixel) สิ่งที่กระทบลงบนแต่ละพิกเซลจะถูกแปลงเป็นสัญญาณส่งไปประกอบเป็นภาพที่สมบูรณ์ คือ ภาพดิจิทัล (Digital image) ซึ่งมีความละเอียดของภาพสูงใช้ในการงานด้านการวิจัย ทางการแพทย์ เป็นต้น ข้อจำกัดของการใช้งานต้องเป็นพื้นที่ที่มีความเข้มแสงสม่ำเสมอ



ภาพประกอบ 21 แสดงหลักการของกล้องถ่ายภาพ Charge-coupled device: CCD ⁽²⁸⁾

4.2.2.2 การใช้เครื่องสแกนภาพ (Flatbed scanner) ^(21, 31)

เครื่องสแกนเนอร์เป็นอุปกรณ์ ที่มีการใช้งานอย่างทั่วไป สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงภาพ เพื่อหาสารในเชิงปริมาณได้ เนื่องจากความสามารถในการบันทึกภาพที่มีจุดหรือแถบสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่าได้ และ แปลงไฟล์เป็นไฟล์ภาพแล้วนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาสารเชิงปริมาณได้ จากวิธีที่ได้กล่าวไปข้างต้นจะมีความจำเพาะเจาะจงเนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาถูกและสามารถใช้งานได้ง่ายสามารถแปลผลได้ทันทีด้วยการส่งข้อมูลเป็นไฟล์ภาพเข้าสู่คอมพิวเตอร์และใช้โปรแกรมในการแต่งภาพโฟโตชอป หรือ ImageJ ในการแปลผลรวมถึงวิธีที่ได้กล่าวไปนั้นได้ถูกพัฒนาโปรแกรมเพื่อรองรับการใช้งานในการวิจัย

การใช้เทคนิคเชิงภาพประกอบด้วย การใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ กล้อง CCD ที่มีความละเอียดสูง และเครื่องสแกนเนอร์ใช้ควบคู่กับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งในแต่ละอุปกรณ์นั้นมีความจำเพาะที่แตกต่างกันออกไปตามลักษณะของงานที่ศึกษา ดังจะกล่าวในตาราง 4

ตาราง 4 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีรังคเลขผิวบาง (TLC)⁽²⁸⁾

วิธีการตรวจวัด	ข้อดี	ข้อด้อย
เครื่องเดนสิโตมิเตอร์	- มีความไว สูงในการตรวจวัด	- ต้นทุนการวิเคราะห์สูง
กล้อง CCD	- สัญญาณในช่วงคลื่น UV/VIS	- ความเร็วในการสแกนภาพช้า
	- สามารถเก็บข้อมูลทั้งแผ่นได้พร้อมกัน	- การทำให้ภาพสว่างสม่ำเสมอทั้งแผ่น
	- เก็บข้อมูลภาพได้รวดเร็ว	- วัดได้เฉพาะจุดที่มีสี หรือ
	- สามารถต่อเข้ากับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่เหมาะสมต่อการประมวลผลภาพ	- ดูดกลืนแสงภายใต้ความยาวคลื่นที่ 254 และ 366 นาโนเมตร
เครื่องสแกนเนอร์	- ราคาถูก	- ราคากล้อง CCD มีราคาสูง
	- สำหรับจุดที่มีความเข้มสีเห็นชัดเจนสามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ	- มีความไวต่ำ
		- สามารถใช้ตรวจวัดเฉพาะจุดของสารที่ปรากฏให้เห็น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lawan และคณะ (2003) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน ด้วยวิธีการรังคเลขผิวบางโดยใช้เทคนิคเชิงภาพมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย ซึ่งในงานวิจัยได้ตรวจสอบหาสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วย เคอร์คูมิน (Curcumin) เดสเมทอกซีเคอร์คูมิน (Desmethoxycurcumin) และ บิเดสเมทอกซีเคอร์คูมิน (Bisdsmethoxycurcumin) ในขมิ้นชันในงานวิจัยใช้ Silica gel 60 F254 เป็นวัสดุภาคคงที่และใช้ Chloroform: Hexane: MeOH (1: 1: 0.1) เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ใช้โปรแกรม Adobe photoshop 7.0 ในการแปรผล โดยที่ช่วงความเข้มข้น 0.375 ถึง 6 ไมโครกรัมต่อ Spot นั้นให้ค่า $r^2 = 0.9987, 0.9998$ และ 0.9995 ของเคอร์คูมิน

(Curcumin) เดสเมทอกซีเคอร์คูมิน (Desmethoxycurcumin) และ บิเดสเมทอกซีเคอร์คูมิน (Bisdsmethoxycurcumin) ตามลำดับ ซึ่งจากวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนานั้นให้ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบที่มีความถูกต้องแม่นยำ น่าเชื่อถือ อีกทั้งเป็นวิธีการทดสอบที่ง่ายสะดวก รวดเร็ว

Kumar และคณะ (2009) ได้สนใจศึกษาการปนเปื้อนของ Mycoplasma ใน Cell culture โดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop (Version 7.0) มาใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในการศึกษาเซลล์ที่มีการปนเปื้อนโดยการย้อมสีและการคัดเลือกเซลล์ที่มีการปนเปื้อนโดยการเทียบสีระหว่างสีที่ได้ย้อมเซลล์กับตัวเซลล์ที่มีการปนเปื้อน Mycoplasma ซึ่งผลที่ได้สามารถตรวจวัดได้ การปนเปื้อนได้โดยใช้เทคนิคเชิงภาพเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลด้านภาพได้

Panadda และคณะ (2011) ได้สนใจศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์หาสาร Sibutramine hydrochloride (SH) ในสมุนไพรที่ใช้ในการควบคุมน้ำหนักที่นิยมใช้ในการรับประทาน ในกาววิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคเชิงภาพ โดยใช้น้ำฝนที่ทำการศึกษาวิเคราะห์มาสแกนเพื่อเป็นไฟล์ภาพเปรียบเทียบกับการใช้ TLC-Densitometer ในการวัดผลการวิเคราะห์ให้ค่าที่มีความจำเพาะเจาะจงในการหาสาร สามารถตรวจวัดโดยการวิเคราะห์โดยสารตาที่ 190 นาโนเมตรต่อ Spot และให้ค่าการตรวจวิเคราะห์ที่ 634 นาโนกรัมต่อ Spot รวมถึงค่าของความถูกต้องแม่นยำในการทดสอบที่ดี

Panadda และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาการตรวจวิเคราะห์หาสารเซฟไตรอาโซน โซเดียม (Ceftriaxone sodium, CFX) ในเชิงปริมาณ โดยเปรียบเทียบเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพ โดยการเปรียบเทียบโปรแกรมระหว่าง Adobe Photoshop Sorbfil TLC videodensitometer software และ Scion image software เพื่อใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์หาเชิงปริมาณ โดยที่ลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ เครื่อง HPLC ผลการทดสอบพบว่าค่าที่ตรวจวัดโดยใช้วิธี Scion image, Sorbfil TLC Videodensitometer และTLC-densitometer ให้ค่าช่วงความเข้มข้นในการวิเคราะห์ที่ 1-8 ไมโครกรัมต่อspot ค่ากราฟ polynomial regression มากกว่า $r^2 > 0.99$ และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop ให้ค่าช่วงความเข้มข้นในการวิเคราะห์ที่ 4-10 ไมโครกรัมต่อ spot ค่ากราฟ polynomial regression มากกว่า $r^2 > 0.99$ ดังนั้นการวิเคราะห์เชิงภาพจึงเป็นวิธีทางเลือกที่สามารถนำมาวิเคราะห์เชิงภาพได้

Kaale และคณะ (2013) ได้การศึกษาและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ยาตัว ยเคโรนมือเดนซิโตร มิเตอร์ แต่ใช้แผ่น TLC ในการวิเคราะห์ยาเม็ดไดโคลฟีแนคโซเดียม (Diclofenac Sodium) โดยที่นำวิธีการแยกสารออกมาใช้ในงานเพื่อพัฒนาหาตัวยาสสำคัญ ซึ่งในการวิเคราะห์ได้พัฒนาหา

อัตราส่วนน้ำหนักเคลื่อนที่ เพื่อใช้ในการแยกและทำการวัดที่ความยาวคลื่นที่ 284 นาโนเมตร ผลที่ได้จากการทดสอบให้ความแม่นยำและมีความถูกต้องสูงในการทดสอบ อีกทั้งวิธีที่ได้มีการพัฒนาขึ้นมา นั้นประหยัดและให้ผลที่รวดเร็ว จะเห็นได้ว่าในช่วงเวลาที่ผ่านมามีการสนใจและนำวิธีการแยกสารเพื่อใช้ในการศึกษาหาสารทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพเพื่อป ระยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์รวมถึงวิธีการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและโปรแกรมที่ใช้ยังมีการจำกัดเฉพาะกับการใช้เครื่องต้องอาศัยความชำนาญในการทดสอบ

Li Peiwu และคณะ (2013) ทำการศึกษาการทดสอบการนำกล้อง CCD ที่มีความละเอียดของภาพสูง นำมาใช้เป็นอุปกรณ์ในการช่วยเก็บข้อมูลและพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารเชิงปริมาณที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระควบคู่กับวิธีรงคเลขผิวบาง (TLC-DPPH) ในการตรวจสอบสาร ในงานวิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีกับการวัดหาสาร มาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิด สารกลุ่มฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ กับวิธีสเปคโตรสโคปี เพื่อเป็นการเปรียบเทียบวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ซึ่งผลการทดสอบให้ค่า Correlation coefficients (r^2) ในช่วงระหว่าง 0.947-0.996 และสามารถตรวจวัดได้ที่มีความเข้มข้นที่ 40-690 นาโนกรัม ซึ่งวิธีที่นำมาใช้นั้นสามารถแยกสารผสมได้เนื่องจากต้องมีการแยกของสารบนตัวกลางโดยการศึกษาจากค่า R_f ของตัวอย่างในแต่ละตัวที่ให้ความจำเพาะที่ต่าง การในการละลายเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานจะให้ผลในภาพรวมของสารทั้งหมดไม่สามารถแยกได้ว่าเนื่องจากเป็นสารผสม

Iwona kowalska และคณะ (2013) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการแปลผลการวิเคราะห์วิธีการวิเคราะห์ TLC-DPPH โดยการศึกษาสกัดสารจากต้น อัลฟัลฟา (*Medicago sativa* L) 5 สายพันธุ์ เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Rutin เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่ใช้อัตราส่วนของ Acetonitrile: water: chloroform: formic acid (60: 15: 10: 5) และทำการพ่นด้วย 0.2% (w/v) ของ DPPH ในเมทานอล ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นสแกนเก็บเป็นไฟล์ภาพเพื่อแปลผล โดยใช้โปรแกรม ImageJ และโปรแกรม Sorbfil TLC videodensitometer ซึ่งผลการทดสอบสามารถวิเคราะห์หาสารในเชิงปริมาณได้ทั้ง 2 โปรแกรมจึงเหมาะแก่การนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาเชิงปริมาณได้

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)^(38, 39)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นวิธีที่ยืนยันผลว่าวิธีวิเคราะห์หาสารในเชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพ ให้ผลการทดสอบในแต่ละครั้ง มีความถูกต้องและแม่นยำเชื่อถือได้ ตามข้อกำหนดและหลักเกณฑ์การยอมรับดังนี้

1. ความเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

เป็นการศึกษาว่าวิธีวิเคราะห์หรือวิธีการจัดจำแนกที่ได้พัฒนาขึ้นนั้น มีความจำเพาะเจาะจงในการแยกสารตัวอย่างหรือสารที่สนใจออกจากสารอื่นหรือสารผสมได้ โดยการทดสอบเปรียบเทียบกับสารอื่นๆ ด้วยวิธีการทดสอบแบบเดียวกันในสภาวะเดียวกัน และให้ผลการทดสอบที่สามารถแยกหรือจัดจำแนกได้เฉพาะสารที่ต้องการศึกษาโดยที่ไม่พบสาร Interference ที่ตำแหน่งของสารที่ต้องการตรวจวัด

2. การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัดสาร (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณของสาร (Limit of quantitation, LOQ)

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัดสาร (Limit of detection, LOD) เป็นการทดสอบเพื่อศึกษาหาปริมาณที่ต่ำสุดต่อจุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบโดยไม่จำเป็นต้องทราบปริมาณ

$$\text{คำนวณได้จาก } LOD = \frac{3SD}{\text{Intercept}}$$

ขีดจำกัดของการหาปริมาณของสาร (Limit of Quantitation, LOQ) ปริมาณต่ำสุดเปล่าที่ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ คือ ปริมาณต่ำสุดที่ยังสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยที่ผลวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำ

$$\text{คำนวณได้จาก } LOQ = \frac{10SD}{\text{Intercept}}$$

หมายเหตุ SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัด

Intercept = ความชันของกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรง

3. การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (Range)

ช่วงการทดสอบ คือระดับความเข้มข้นของสารที่ เหมาะสมที่ต่ำสุดและสูงสุด ที่ให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ และหาความสัมพันธ์มีความเป็นเส้นตรงในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

การทดสอบความเป็นเส้นตรง คือค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ ที่พล็อตระหว่างค่าความเข้มข้นของสารกับค่าที่แปลผล เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะให้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นอัตราส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีใน

ตัวอย่าง แสดงค่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient determination, r^2) เกณฑ์ในการยอมรับค่า r อยู่ระหว่าง 0.995-1.000 ⁽³⁹⁾

4. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

คือความถูกต้องของผลวิเคราะห์แสดงถึงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการแสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์กับค่าที่แท้จริงหรือค่าอ้างอิงที่ยอมรับได้ โดยหาได้จากการคำนวณหา % recovery ของสารมาตรฐานที่มีการเติมลงไปในตัวอย่ง (spike method) หรือสามารถหาได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอน แสดงค่าเป็น % recovery เกณฑ์ในการยอมรับค่า % recovery อยู่ระหว่าง 85 - 115 % recovery ⁽³⁹⁾

5. การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

การทดสอบเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ส ารที่เกิดจากการทำการทดสอบซ้ำๆ ในสภาวะเดียวกันภายในวันเดียวกัน (intra day) และระหว่างวัน (inter day) เกณฑ์การยอมรับแสดงค่าเป็น แสดงผลค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (Relative standard deviation, %RSD) เกณฑ์ในการยอมรับค่า % RSD อยู่ระหว่าง 1 – 10 % ⁽³⁹⁾

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี (Materials and reagents)

สารเคมี

สารมาตรฐาน

แอสคอร์บิก แอซิด (Ascorbic acid)	Sigma-Aldrich, Germany
แกลลิก แอซิด (Gallic acid)	Sigma-Aldrich, Germany
รูทีน (Rutin)	Sigma-Aldrich, Germany
แอลลาจิก แอซิด (Ellagic acid)	Sigma-Aldrich, Germany
เคอร์ซีทีน ดีไฮเดรต (Quercetin dihydrate)	Sigma-Aldrich, Germany

สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้

เมทานอล (Methanol)	Merck, Germany
เอทานอล (Ethanol)	Merck, Germany
อะซิโตนไทรล์ (Acetonitril)	Merck, Germany
น้ำกลั่น (Deionization water)	
2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich, Germany

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

Microplate reader	Anthos Zenyth 200rt, Austria
เครื่องคอมพิวเตอร์พร้อมเครื่องสแกน	Canon pixma
กระดาษเซลลูโลส 100 %	Canson watercolour paper, France
แผ่นกรอง เบอร์ 1	Whatman, English
กระดาษวาดเขียน	-
กระดาษปอนด์	DHA Siamwalla, Thailand
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Sartorius, Germany
ตู้เย็น 0-5 °C	Panosonic, Thailand
Auto pipette	Sartorius biohit/ biohit Oyi, Finland
Centrifuge tube	Hycon plastic Inc.
96 well plate	

2. การเตรียมสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

2.1 เตรียม 50% และ 70% เมทานอลในน้ำ

เตรียม 50 % เมทานอล เตรียมจากตวงเมทานอล 50 มิลลิลิตรใส่น้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน

เตรียม 70% เมทานอล เตรียมจากตวงเมทานอล 70 มิลลิลิตรใส่ลงในน้ำปริมาตร 30 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน

2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน แอสคอร์บิก แอซิด ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้จากชั่ง แอสคอร์บิก แอซิด 25 มิลลิกรัมใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปริมาตรจนครบ ด้วย 50% เมทานอล ช่วยละลายด้วย Sonicator หรือเครื่องปั่น Vortex

2.3 นำสารละลายมาตรฐานจากข้อ 2.2 มาทำการเจือจางด้วย 50% เมทานอลให้ได้สารละลายมาตรฐาน (Working standard) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10 ถึง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 75 ถึง 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ในการทดสอบ

2.4 การเตรียมสารละลาย DPPH ทำการเตรียมสารละลาย DPPH ที่ 1 มิลลิโมล โดยการชั่งน้ำหนักของสาร DPPH 19.7 มิลลิกรัมใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตรจนครบด้วยเมทานอล

2.5 การเตรียมตัวอย่างน้ำส้ม 100% ทำโดยการบีบผลไม้สด น้ำส้ม 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 50 % เมทานอล 900 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

วิธีการทดลอง (Methods)

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 การศึกษาความเข้มข้นสาร DPPH ที่เหมาะสม

1.1.1 เตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล จากนั้นทำการเจือจางด้วยเมทานอล ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นดังนี้ 1 0.75 0.5 0.25 และ 0.125 มิลลิโมล นำสารทั้งหมดใส่ลงใน 96-well plate หลุมละ 250 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลุม

1.1.2 เตรียมสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิด ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.1.3 ตัดกระดาษขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 3 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น แผ่นที่หนึ่งจุ่มลงในสารละลายข้อ 1.1.2 พักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอให้แห้ง จากนั้นจุ่มในหลุมสารละลาย DPPH ในข้อ 1.1.1 แผ่นที่สองจุ่มในสารละลาย DPPH แต่ละความเข้มข้นของ DPPH ที่ศึกษา

1.1.4 นำทั้งสองแผ่นมาตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง สแกนภาพเปรียบเทียบและบันทึกผลเกณฑ์ในการศึกษา

- ศึกษาความเข้มของสี DPPH ที่ติดบนกระดาษที่นำมาทำการศึกษา
- ศึกษาความเข้มสีของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารมาตรฐานและสาร DPPH ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.2 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของวัฏภาคคงที่ (Stationary phase)

1.2.1 นำกระดาษชนิดต่างๆ (กระดาษปอนด์ กระดาษวาดเขียน กระดาษกรอง เบอร์ 1 กระดาษเซลลูโลส) ที่ใช้ในการศึกษานำมาตัดให้มีขนาด กว้าง 3 เซนติเมตร ยาว 5 เซนติเมตร

1.2.2 จากนั้นจุดสารมาตรฐาน แอสคอร์บิก แอซิด ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปบนกระดาษที่ศึกษา 2 ไมโครลิตร และเป่าให้แห้งด้วยลมเย็น

1.2.3 นำแผ่นกระดาษแต่ละชนิดมาทำการใส่ลงในแท่งแก้วที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่อิมมัวอยู่

1.2.4 จากข้อ 1.2.3 นำแผ่นกระดาษที่ศึกษามาเป่าให้แห้งและจุ่มสารละลาย DPPH ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 1.1 เป่าให้แห้ง

เกณฑ์ในการศึกษา

- ลักษณะทางกายภาพของกระดาษ เช่น ความคงตัวของแผ่นกระดาษในวัฏภาคเคลื่อนที่ การดูดซับสาร ขอบเขตของการจุดสาร
- การติดสีของสาร DPPH ขอบเขตการติดสี ความชัดเจนของการเกิดปฏิกิริยาของสาร DPPH กับสารมาตรฐาน
- สแกนภาพ ประเมินผลเปรียบเทียบและบันทึกผล

1.3 การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

ทำการศึกษาดังเดิม ข้อ 1.2.1 – 1.2.4 โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็นกระดาษที่ให้การทดสอบที่ดี แต่ปรับเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่ตามอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำ ซึ่งในการศึกษาประกอบด้วย เมทานอล เอทานอล อะซีโตน ไตรคลอโรเอทิลีน และน้ำกลั่น นำมาผสมตามอัตราส่วนดังนี้

1. เมทานอล: น้ำ (10: 0)
2. เมทานอล: น้ำ (9: 1)
3. เมทานอล: น้ำ (8: 2)
4. เมทานอล: น้ำ (7: 3)
5. อะซีโตน ไตรคลอโรเอทิลีน: น้ำ (7: 3)
6. เอทานอล: น้ำ (7: 3)

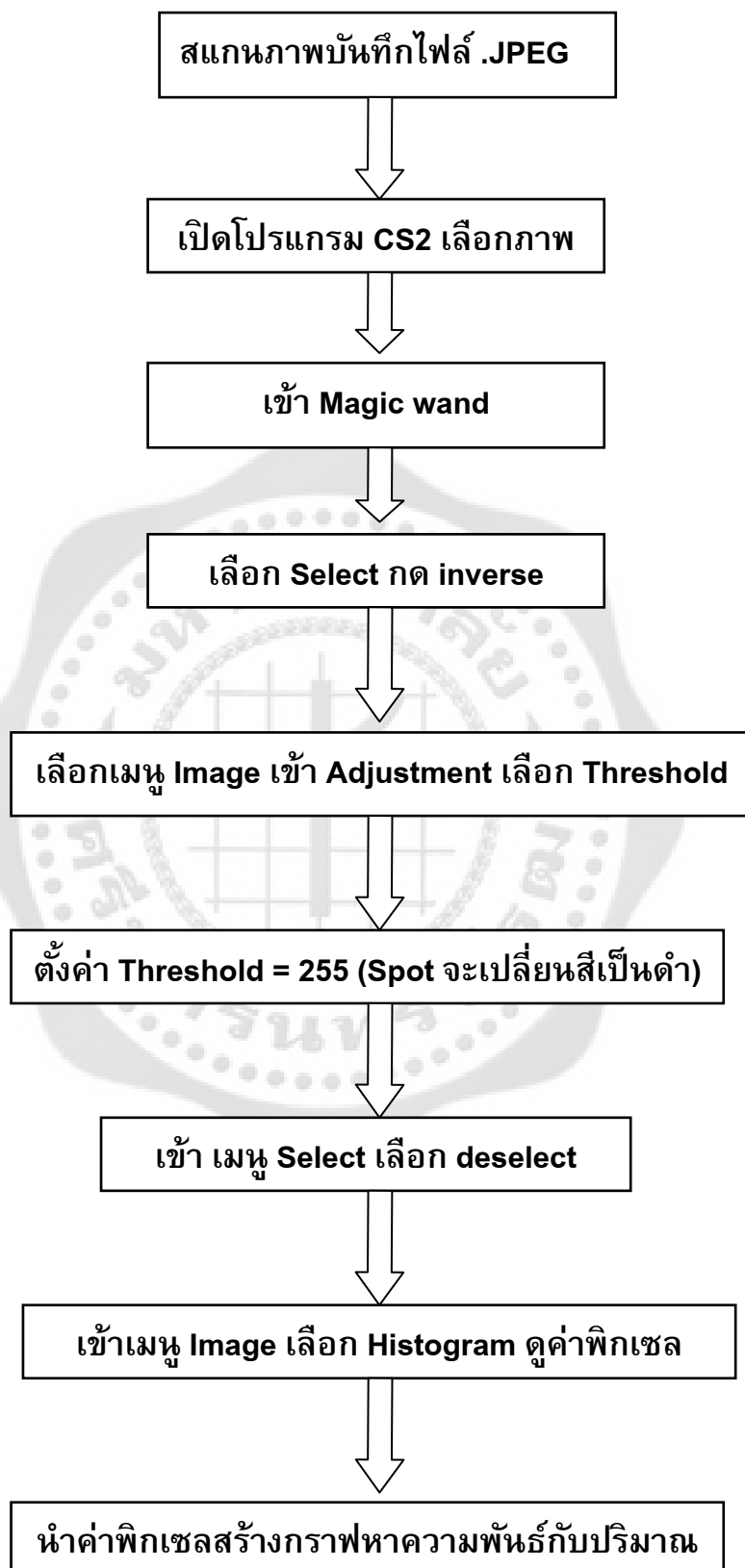
แล้วนำมาใช้ในการเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบค่าการนำพาสารเคลื่อนที่บนวัฏภาคคงที่ (Rf value)

เกณฑ์ในการศึกษา

- อัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการนำพาสารเคลื่อนที่บนวัฏภาคคงที่โดยการคำนวณค่า Rf ของสารในสภาวะนั้น
- สแกนภาพ ประเมินผลเปรียบเทียบและบันทึกผล

1.4 การอ่านและแปลผลด้วยเทคนิคเชิงภาพ

เมื่อได้การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงภาพด้วยโปรแกรมโฟโตชอป ขั้นตอนเริ่มจากการนำกระดาษที่ผ่านการทดสอบนำมาสแกนเป็นไฟล์ภาพบันทึกลงคอมพิวเตอร์บันทึกเป็นไฟล์ .JPEG จากนั้นทำการเปิดโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 เปิดไฟล์ภาพที่ทำการจะแปลผล เลือกแถบเครื่องมือใช้ magic wand เพื่อเลือกในบริเวณพื้นที่ที่มีสีของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับสาร DPPH จากนั้นเปลี่ยนให้เป็นสีดำ เพื่อให้เกิดจุดพิกเซลทั้งหมดในการจุดสาร สีของพื้นที่ดังกล่าว นำค่าพิกเซลที่อ่านได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเพื่อหาปริมาณต่อไป



1.5 การตรวจสอบวิธีทดสอบตามเกณฑ์การยอมรับของ FDA และ ICH guideline ^{(38,}

39)

เมื่อได้ชนิดของกระดาษ อัตราส่วนของตัวทำละลาย และความเข้มข้นของ DPPH ที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นวัฏภาคคงที่ วัฏภาคเคลื่อนที่ และความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการตรวจสอบ ตามลำดับ นำวิธีวิเคราะห์มาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ตามข้อกำหนดและเกณฑ์การยอมรับดังนี้

1.5.1 การตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ DPPH assay ด้วยเทคนิคเชิงภาพบนตัวกลางกระดาษ

1.5.1.1 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

เตรียมตัวอย่างในการทดสอบคือ แอสคอร์บิก แอซิด เอลลาจิก แอซิด รูทีน เคอร์ซีติน ดีไฮเดรต และแกลลิก แอซิด โดยเตรียมให้ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วย 50% เมทานอล จากนั้นนำไปทำการจุดสารลงบนกระดาษขนาดกว้าง 5 เซนติเมตร ยาว 7 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตรและเป่าให้แห้งด้วยลมเย็น ใส่ลงใน แทงค์แก้วที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่อ้อมตัว เมื่อกระบวนการแยกเสร็จ นำแผ่นกระดาษขึ้นมาเป่าให้แห้งด้วยลมเย็น จากนั้นจุ่มด้วยสารละลาย DPPH เป่าให้แห้งด้วยลมเย็นจากนั้นทำการสแกนภาพ และวัดค่าการเคลื่อนที่ของสาร

เกณฑ์ในการศึกษา

- ศึกษาค่า Rf ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดที่นำมาทำการศึกษา
- สแกนภาพ ประเมินผลเปรียบเทียบและบันทึกผล

1.5.1.2 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัดสาร (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณของสาร (Limit of quantitation, LOQ)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน แอสคอร์บิก แอซิด ที่ความเข้มข้น 0.025 0.050 0.075 0.100 0.125 0.150 และ 0.200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปจุดลงบนกระดาษความเข้มข้นละ 5 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วยวิธีการทดสอบ การแปลผลดูด้วยตาเปล่า และการเก็บตัวอย่าง โดยนำมาสแกนโดยใช้เครื่องสแกนเนอร์เก็บเป็นไฟล์ โดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ในการวัดขนาดสีที่ปรากฏแปลผลในหน่วยของค่าพิ กเซลที่ได้ เพื่อเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ด้วยตาเปล่าและความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ได้ และคำนวณการวิเคราะห์วิธีการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัดสาร (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการหาปริมาณได้ถูกต้อง (LOQ)

1.5.1.3 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิด ในช่วงความเข้มข้น 5 ความเข้มข้นประกอบด้วย 75 100 125 150 และ 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จาก Stock solution เตรียมวักภาคลงในขวดแก้ว 9 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร จากนั้นทำการจุดสารมาตรฐานลงบนแผ่นปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำของการจุดสารบนวักภาคจากที่ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวักภาคเคลื่อนที่ที่อ้อมตัวในแท่งแก้ว หลังจากกวักภาคเคลื่อนที่พาสารไประยะที่กำหนด นำทำให้แห้งด้วยวิธีการเป่าลมเย็น จุ่มสาร DPPH จากนั้นเป่าลมเย็นให้แห้งและนำมาสแกนโดยใช้เครื่องสแกนเนอร์และเก็บบันทึกไฟล์ภาพ (.JPEG) แปรผลโดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 นำค่าที่ได้จากโปรแกรมมาสร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าพิกเซลที่วัดจากการใช้เทคนิคเชิงภาพ ต่อความเข้มข้นของสาร ที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r^2)

1.5.1.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

เตรียมสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิดที่ใช้ในการวิเคราะห์ ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นของ Standard curve ที่ใช้ในการศึกษา ใส่ลงในตัวอย่างน้ำส้มจากข้อ 2.3.5 โดยที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายในตัวอย่างน้ำส้มมีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 90 110 และ 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบความถูกต้องในวันเดียวกัน (Intra-day) และระหว่างวัน (Inter-day) เป็นเวลา 3 วัน นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา % recovery

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นของสารแอสคอร์บิก แอซิดที่วัดได้จากการวิเคราะห์} \times 100}{\text{ค่าความเข้มข้นจริงที่เตรียม}}$$

1.5.1.5 การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

เตรียมตัวอย่างสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิดที่ศึกษา ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 100 125 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นของ Standard curve ทดสอบความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ทดสอบตัวอย่างในวันเดียวกัน (Intra-assay) และระหว่างวัน (Inter-assay) เป็นเวลา 3 วัน แล้วคำนวณหาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (Relative standard deviation, %RSD)

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{Standard Deviation}}{\text{Mean}} \times 100$$

1.5.2 วิธีวิเคราะห์ DPPH-scavenging assay โดยใช้ Microplate reader

1.5.2.1 การตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ DPPH assay ด้วย Microplate

1.5.2.1.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 5 ความเข้มข้นที่ 10 15 20 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จาก Stock solution ใส่ลงในหลุม 96-well plate ความเข้มข้นละ 3 หลุมหลังจากนั้นเติมสาร DPPH ที่ความเข้มข้นที่ 0.50 มิลลิโมล ลงไป 100 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r^2) ของวิธีวิเคราะห์

1.5.2.1.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

เตรียมสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิดที่ใช้ในการวิเคราะห์ ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นของ Standard curve ที่ใช้ในการศึกษา ใส่ลงในตัวอย่างน้ำส้มจากข้อ 2.3.5 โดยที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย ในตัวอย่างน้ำส้มมีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 18 22 และ 26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบตัวอย่างในวันเดียวกัน (Intra-assay) และระหว่างวัน (Inter-assay) เป็นเวลา 3 วัน นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา % recovery (Inter-assay) เป็นเวลา 3 วัน นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา % recovery

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นสารแอสคอร์บิก แอซิดที่วัดได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าความเข้มข้นจริงที่เตรียม}} \times 100$$

1.5.2.4.3 การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

เตรียมตัวอย่างสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิดที่ศึกษา ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 15 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นของ Standard curve ทดสอบความเข้มข้นละ 6 ตัวอย่าง ทดสอบตัวอย่างในวันเดียวกัน (Intra-assay) และระหว่างวัน (Inter-assay) เป็นเวลา 3 วัน แล้วคำนวณหาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (Relative standard deviation, %RSD)

1.6 เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนามากับวิธี DPPH scavenging assay และทดสอบผลิตภัณฑ์

1.6.1 DPPH assay ด้วยเทคนิคภาพบนตัวกลางกระดาษ

เตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิดที่ใช้ในการทดสอบจาก Stock solution จำนวน 5 ความเข้มข้นโดยให้ความเข้มข้นที่ 75 100 125 150 และ 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

เตรียมตัวอย่างทดสอบ

เตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้ขายในท้องตลาด คือน้ำส้มเขียวหวาน 100 % นำมาทำการเจือจางโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำผลไม้ที่ 200 ไมโครลิตร เจือจางด้วย 50% เมทานอล: น้ำ 800 ไมโครลิตร เมื่อได้สารแล้วนำไปจุดลงบนกระดาษปริมาตร 5 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ขั้นตอนการทดสอบ

จุดสารมาตรฐานและสารตัวอย่างความเข้มข้นละ 3 จุด จากนั้นนำมาเป่าลมเย็น วิเคราะห์การแยกสารด้วยสภาวะที่ได้จากการทดสอบ ทำให้แห้งด้วยวิธีการเป่าลมเย็น จุ่ม DPPH และเป่าลมเย็นให้แห้ง นำมาสแกนโดยใช้เครื่องสแกนเนอร์และ บันทึกเก็บไฟล์ภาพ แปลผลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 นำค่าที่ได้จากโปรแกรมมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าฟิกเชลกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์

ในการคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) การแปลผลจะใช้โปรแกรม Graphpad Prism 5 และความเข้มข้นของสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิด คือ 6 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 125 150 175 200 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหากราฟของ Sigmoid curve จาก log ของความเข้มข้นกับค่าฟิกเชล

1.6.2 DPPH-scavenging assay ด้วยเครื่อง Microplate reader

เตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิด ที่ใช้ในการทดสอบจาก Stock solution จำนวน 5 ความเข้มข้น คือ 10 15 20 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

เตรียมตัวอย่างทดสอบ

เตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้ที่มีขายในท้องตลาดที่ระบุว่ามีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ นำมาทำการเจือจางโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำผลไม้ 100 ไมโครลิตร เจือจางด้วย 50 % เมทานอล: น้ำ ให้ได้ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

ขั้นตอนการทดสอบ

ปีเปตสารมาตรฐาน แอสคอร์บิก แอซิด และสารตัวอย่างลงในหลุมของ Microplate โดยใช้ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลุม จากนั้นใส่สาร DPPH ความเข้มข้น 0.50 มิลลิโมล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมตัวอย่างโดยที่ใช้ Negative control เป็นเมทานอล 100 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิดฟอยด์และนำไปปมที่มีด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณค่า %Inhibition สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อหาค่า ความเข้มข้นที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่ง (IC_{50})

เกณฑ์ในการศึกษา

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ ค่าความเข้มข้นของแอสคอร์บิก แอซิดที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระ ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) จากการทดสอบของวิธี DPPH assay ด้วยเครื่อง Microplate reader และกับวิธี DPPH assay ด้วยเทคนิคเชิงภาพบนตัวกลางกระดาษ

2. การพัฒนาชุดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอชสตริป (DPPH strip for antioxidant activity test)

2.1 ศึกษาชนิดของกระดาษที่เหมาะสมต่อการนำมาทำชุดทดสอบ

อ้างอิงกระดาษจากการทดสอบหัวข้อ 1.2

2.2 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย DPPH

นำกระดาษที่ได้จากข้อ 2.1 มาจุ่มลงใน 96-well plate ที่มีสารละลาย DPPH ที่ระดับความเข้มข้น 3 ความเข้มข้นคือ 0.875 1.75 และ 3.5 mM เป็นจำนวนความเข้มข้นละ 2 แผ่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างแอสคอร์บิก แอซิดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใส่ลงในหลุม 96-well plate เป็นจำนวน 3 หลุมๆละ 200 ไมโครลิตร นำสตริปที่แห้งมาจุ่มลงในความเข้มข้นของสารมาตรฐานดังกล่าว โดยที่ทำ Negative control คือ แผ่นกระดาษที่จุ่มในสารละลาย DPPH และจุ่มลงในน้ำกลั่นเพื่อใช้เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

เกณฑ์ในการศึกษา

- ศึกษาระยะเวลาการติดสีและเปรียบเทียบสีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

- บันทึกผลและถ่ายภาพเพื่อเปรียบเทียบ

2.3 ศึกษาหาค่า Limit of detection (LOD) ของสารมาตรฐาน

เตรียมตัวอย่างในการทดสอบ คือ แอสคอร์บิก แอซิด, เอลลาจิก แอซิด, รูทีน, เคอร์ซีติน ดีไฮเดรต และแกลลิก แอซิด โดยเริ่มต้นความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางด้วยหลักการ 2-fold dilution นำสารที่ได้ทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำแผ่นกระดาษที่ได้จากข้อ 2.1 จุ่มในสารละลาย DPPH ที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 เมื่อจุ่มเสร็จให้กระดาษติดสี DPPH ทั่วแผ่น จุ่มลงในสารมาตรฐานที่ศึกษาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Negative control คือ แผ่นกระดาษที่จุ่มในสารละลาย DPPH และจุ่มลงในน้ำกลั่นเพื่อใช้เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

เกณฑ์ในการศึกษา

- แผ่นทดสอบเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เปรียบเทียบ Negative control
- บันทึกผลการทดสอบและถ่ายภาพ

2.4 ทำการศึกษาโดยใช้ชุดทดสอบในการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์

เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีสรรพคุณที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการทดสอบได้นำผงสำเร็จรูปและน้ำมันมะรุมมาใช้ในการศึกษา โดยที่นำตัวอย่างใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำแผ่น Strip ที่ได้พัฒนาขึ้นจุ่มลงใน DPPH และจุ่มต่อในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์

Negative control คือ แผ่นกระดาษที่จุ่มในสารละลาย DPPH และจุ่มลงในน้ำกลั่นเพื่อใช้เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

เกณฑ์ในการศึกษา

- แผ่น Strip test เปลี่ยนสีจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง
- บันทึกผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์

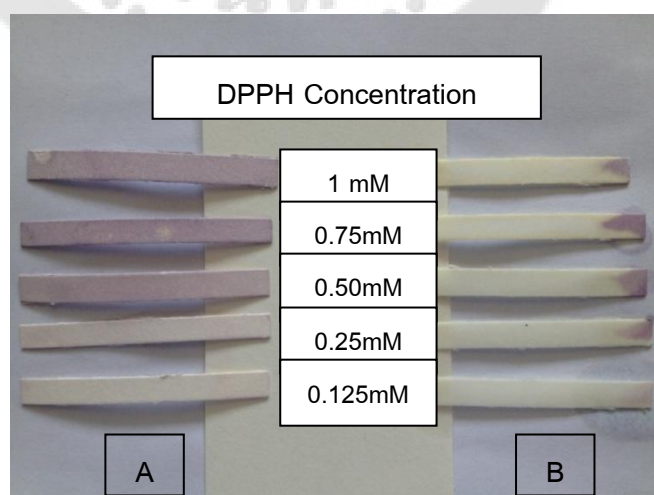
บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ที่เหมาะสม

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบการติดสีม่วงของสารละลาย DPPH บนกระดาษ เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยศึกษาการติดสีม่วงของสารละลาย DPPH บนตัวกลางกระดาษ และการติดสีเหลืองที่เกิดขึ้นหลังจากสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH บนตัวกลางกระดาษ ในการทดสอบเตรียมความเข้มข้นที่ 0.125 – 1 มิลลิโมล ของสารละลาย DPPH พบว่าความเข้มข้นที่ระดับ 0.125 - 0.250 มิลลิโมล นั้นให้ความเข้มของสีม่วงที่ไม่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นกระดาษที่นำไปทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่เปลี่ยนสีเหลืองแล้วนั้น พบว่าความเข้มของสีม่วงไม่ชัดและสีจืดจางลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป ดังนั้นความเข้มข้นจึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการศึกษา และเมื่อความเข้มข้นของสาร DPPH เพิ่มขึ้น พบว่าความเข้มข้นที่ 0.50 มิลลิโมล มีการติดสีที่ดี แต่ไม่เหมาะสมเนื่องจากหลังจากการจุ่มสารละลาย DPPH แล้วเป่าให้แห้งเพื่อนำไปสแกนภาพในระยะเวลาที่กำหนด (3-5 นาที) พบว่ามีสีที่อ่อนลง ทำให้การเก็บตัวอย่างมีความคลาดเคลื่อนได้ เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่สูงกว่าที่ 0.75 และ 1 มิลลิโมล พบว่าค่าความเข้มข้นที่ 0.75 มิลลิโมล มีสีที่เข้มและเด่นชัดไม่ต่างจากความเข้มข้นที่ 1 มิลลิโมล ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการทดสอบความเข้มข้นของสาร DPPH ที่เหมาะสม คือ 0.75 มิลลิโมล ดังแสดงดังภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสาร DPPH บนกระดาษ ซึ่ง A เป็นแผ่นของกระดาษที่จุ่มสาร DPPH B เป็นแผ่นที่สาร DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

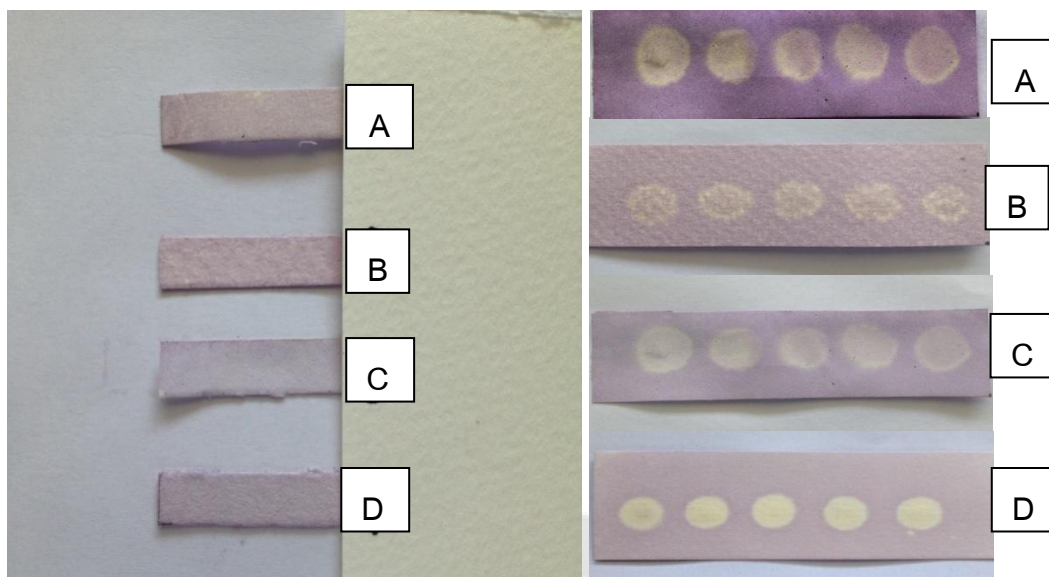
1.2 ผลการศึกษาวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) ที่เหมาะสม

ในการศึกษางานวิจัยนี้ได้สนใจนำกระดาศชนิดต่างๆ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด นำมาใช้ในการศึกษาประกอบด้วย 4 ชนิด คือ กระดาศวาดเขียน กระดาศปอนด์ กระดาศกรองเบอร์ 1 และกระดาศเซลลูโลส นำมาศึกษาเป็นตัวกลางเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติกายภาพของการดูดซับของสาร โดยที่กระดาศแต่ละชนิดมีความต่างกันที่ความแข็ง-อ่อนของกระดาศ และเนื้อกระดาศมีความละเอียด-ความหยาบ โดยทำการศึกษานาขนาดของ Spot และขอบเขตของการเกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยาระหว่างสารมาตรฐานกับสาร DPPH ผลการทดสอบคุณสมบัติ กายภาพตามตาราง 5 แสดงผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติของกระดาศที่ใช้ในการดูดซับสารที่ทำการจุดลงไปพบว่ากระดาศเซลลูโลสให้คุณสมบัติที่ดีในการดูดซับสาร คือ เมื่อจุดสารลงบนกระดาศเซลลูโลส มีความสามารถในการดูดซับสารได้ดีและแห้งไว ความคงตัวในวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่ากระดาศเซลลูโลส มีคุณสมบัติในการตั้งลงในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ดีและไม่อ่อนตัวเมื่อระยะเวลาผ่านไป เมื่อรันแผ่นจนถึงระยะที่กำหนดนำมาทำการจุ่มลงในสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.75 มิลลิโมล กระดาศเซลลูโลสให้ผลของความตติสีที่ชัดเจนและขนาดของจุดกลม ขอบเขตที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับกระดาศที่นำมาใช้ในการทดสอบ แสดงดังภาพประกอบ 24

ตาราง 5 แสดงผลการเปรียบเทียบชนิดของกระดาศเพื่อใช้เป็นตัวกลางวัฏภาคคงที่

ลักษณะกายภาพ	ชนิดของกระดาศ			
	กระดาศวาดเขียน	เซลลูโลส	กระดาศปอนด์	แผ่นกรอง
การดูดซับสาร	+	+++	++	+
ความคงตัวใน Mobile phase	++	++	+++	+
ความเข้มข้น DPPH	+	++	+	++
ขนาด Spot	+	+++	+	+
ขอบเขต Spot(ชัด/ไม่ชัด)	+	+++	+	+

หมายเหตุ เกณฑ์การให้คะแนน +น้อย, ++ ปานกลาง, +++ มาก



ภาพประกอบ 24 (ซ้าย) แสดงถึงการติดสีของกระดาษ A กระดาษกรองเบอร์ 1; B กระดาษปอนด์; C กระดาษวาดเขียน; D กระดาษเซลลูโลส (ขวา) แสดงการเปรียบเทียบ Spot ของสาร เกิดปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระแอสคอร์บิก แอซิด ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร A กระดาษกรองเบอร์1; B กระดาษปอนด์; C กระดาษวาดเขียน; D กระดาษเซลลูโลส

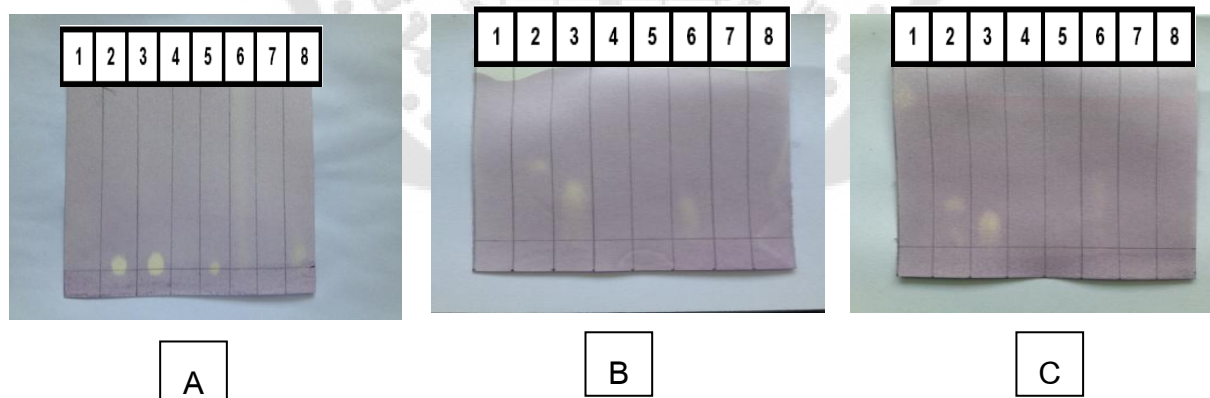
1.3 การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

จากผลการทดสอบ 1.1 - 1.2 สามารถคัดเลือกกระดาษและความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบแยกด้วยการปรับอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ ทำการศึกษาโดยอาศัยทฤษฎีของควมมีขั้วของสารมาใช้ในการเลือกวัฏภาคเคลื่อนที่ เนื่องจากสาร มาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานั้น เป็นสารที่มีความมีขั้วสูง จึงได้ทำการเลือกเมทานอล ($P' = 5.1$) กับน้ำ ($P' = 10.2$) โดยปรับอัตราส่วนต่าง ๆ คือให้เมทานอล 100 % และลดลงเป็น 90 80 และ 70 % ตามลำดับ เพื่อหาค่าที่ระยะทางของสารเคลื่อนที่ที่เหมาะสม จากผลการทดสอบพบว่า เมื่อลดเมทานอลและเพิ่มปริมาณน้ำในวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ความสามารถในการนำพาสาร มาตรฐาน แอสคอร์บิก แอซิด เคลื่อน ที่ไปได้ดี แสดงผลจากค่า Rf จากตาราง 6 แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำให้แกระบบมากขึ้นนั้นทำให้การดูดซึมผ่านตัวกลางกระดาษ ได้ไม่ดี การเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อน ที่จะไปได้ช้า ต้องใช้เวลานานขึ้นในการทดสอบ

ตาราง 6 แสดงค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ (Rf) ของแอสคอร์บิก แอซิด

อัตราส่วน Mobile phase	ค่า Rf
เมทานอล: น้ำ (10: 0)	0.1
เมทานอล: น้ำ (9: 1)	0.29
เมทานอล: น้ำ (8: 2)	0.44
เมทานอล: น้ำ (7: 3)	0.56
อะซีโตไนไตร: น้ำ (7: 3)	0.0
เอทานอล: น้ำ (7: 3)	0.2

จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบวิฤภาคเคลื่อนที่ เป็นอัตราส่วนของ เมทานอลต่อน้ำที่ 70% ให้ค่าการนำพาสารที่ดีที่สุด จึงได้ทำการทดสอบผลเพื่อเปรียบเทียบโดยการเปลี่ยน เมทานอล เป็น อะซีโตไนไตร ($P' = 5.8$) และเอทานอล ($P' = 4.3$) ผลคือสภาวะของวิฤภาคทั้งสองมีการนำพา สารได้ต่ำมาก ไม่สามารถนำพาสารแอสคอร์บิก แอซิดเคลื่อนที่ไปบนตัวกลางได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะ นำมาใช้ในการแยกสารได้ ผลของค่า Rf แสดงดังตาราง 6 และภาพประกอบ 25 แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วน ของเมทานอลต่อน้ำ ที่ 70% สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า อัตราส่วนของ อะซีโตไนไตรต่อน้ำ และเอทานอลต่อน้ำ ที่ให้คุณสมบัติในการนำพา สารเคลื่อนที่ไป บนตัวกลางได้ต่ำ



ภาพประกอบ 25 แสดง mobile phase A คือ อะซีโตไนไตร: น้ำ (7: 3), B คือ เมทานอล: น้ำ (7: 3) และ C คือ เอทานอล: น้ำ (7: 3) (1-มาลิก แอซิด 2-แอสคอร์บิก แอซิด 3-แกลลิก แอซิด 4-ทาร์ ทาริก แอซิด 5-แอลลาจิก แอซิด 6-เคอร์ซีทิน 7-ซีตริก แอซิด 8-รูทีน)

จากผลการทดสอบ 1.1-1.3 ได้ผลการศึกษาดังนี้

วัฏภาคคงที่ คือ กระดาษเซลลูโลส

วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ อัตราส่วนเมทานอล: น้ำ (7: 3)

ความเข้มข้นของสาร DPPH คือ 0.75 mM

การดำเนินการ วิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคเชิงภาพมีขั้นตอนดังภาคผนวก ก

1.4 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

จากวิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมานั้นเพื่อให้วิธีที่มีความถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ จำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นเป็นไปตามข้อกำหนด ผลจากการทดสอบวัฏภาคคงที่เพื่อหาชนิดของกระดาษ ความเข้มข้นของสาร DPPH และสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกสาร ประกอบด้วย กระดาษเซลลูโลส อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำ (7: 3) และความเข้มข้นในการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH 0.75 มิลลิโมล ตามลำดับ วิธีการทดสอบอ้างอิงและประยุกต์จากวิธีของ Li Peiwu และคณะ⁽²⁶⁾ นำมาใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบตามมาตรฐาน FDA และ ICH guideline เพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีการวิเคราะห์ที่ได้มาทำการตรวจสอบความถูกต้องความน่าเชื่อถือของวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมีหัวข้อดังนี้

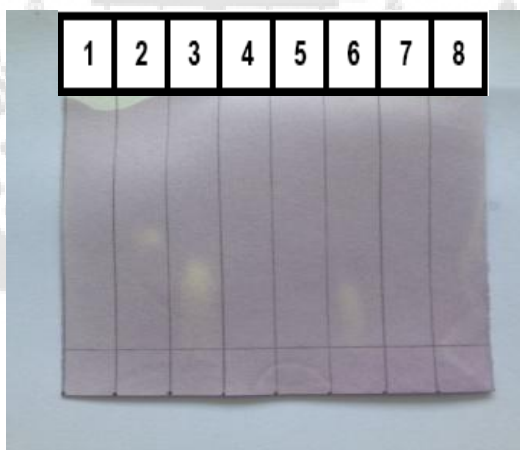
1.4.1 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้ ศึกษาจากความสามารถในการแยกสารผสมของตัวอย่าง โดยที่วิธีวิเคราะห์สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ออกจากกันได้ โดยการนำสารมาตรฐานมาจุดสารลงบนกระดาษแผ่นเดียวกันและทำการทดสอบในสภาวะเดียวกัน เพื่อศึกษาระยะทางการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด แสดงผลตามตาราง 7 วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนานี้สามารถแยกสารมาตรฐานแต่ละชนิดได้ ซึ่งอ้างอิงจากสารที่พบมากในพืชผักผลไม้ไม่นำมาใช้ในการศึกษาทั้งสิ้น 8 ชนิดจะเห็นได้ว่าสามารถแยกสารได้ออกจากกันได้ ดังค่า R_f ของสารแต่ละชนิดในสภาวะที่ทำการศึกษา โดยสภาวะนี้สามารถแยกสารแอสคอร์บิก แอซิด ได้ดีที่สุด จากภาพประกอบ 26

ตาราง 7 แสดงค่า Rf ของสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

สาร	ค่า Rf
Ascorbic acid	0.56
Tartaric acid	N/A
Malic acid	N/A
Citric acid	N/A
Rutin	0.33
Gallic acid	0.44
Quercetin	0.22
Ellagic acid	N/A

N/A ไม่เกิดปฏิกิริยากับสาร DPPH



ภาพประกอบ 26 แสดงความจำเพาะของสภาวะในการแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

(1-มาลิก แอซิด 2-แอสคอร์บิก แอซิด 3-แกลลิก แอซิด 4-ทาร์ทาริก แอซิด 5-แอลลาจิก แอซิด 6-เคอร์ซีทิน 7-ซีตริก แอซิด 8-รูทีน)

จากภาพประกอบ 26 แสดงผลการวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งในวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นไม่สามารถตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ คือ มาลิก แอซิด ทาร์

ทาริค แอซิด แอลลาจิก แอซิด และซิติริก แอซิด เนื่องจาก สารที่กล่าวไปมีโครงสร้าง ที่มีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอนกับสารอื่นได้ยากจำเป็นที่ต้องมีการให้พลังงานเพื่อกระตุ้นให้เกิดการแตกพันธะออก เพื่อให้มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเพื่อทำปฏิกิริยากับสาร DPPH อีกทั้งวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นเป็นวิธีที่ไม่ได้มีการให้พลังงานแก่ระบบในการแตกพันธะของสารมาตรฐาน จึงทำให้ไม่สามารถตรวจวัดได้

1.4.2 ขีดจำกัดการตรวจวัด และขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of Detection and Limit of Quantitation)

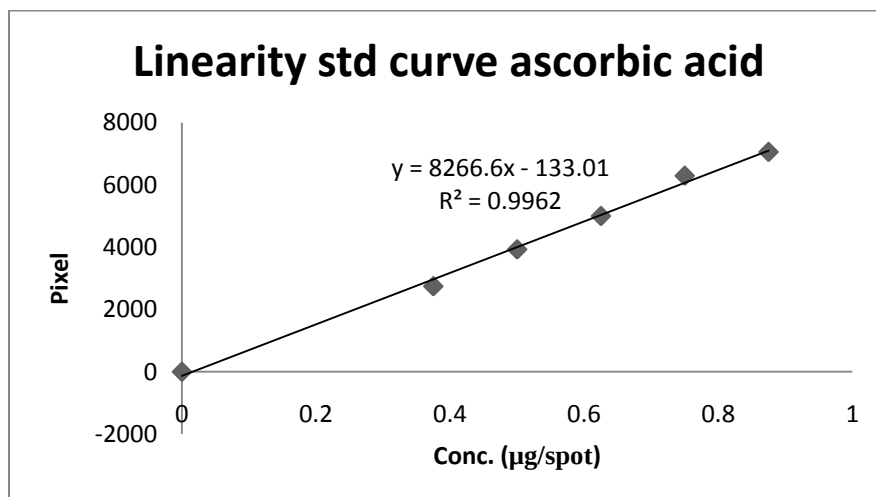
เมื่อนำสารแอสคอร์บิก แอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ มาจุดสารและวัดค่าด้วยเทคนิคเชิงภาพ โดยค่าขีดจำกัดการตรวจวัดคำนวณจากเส้นกราฟมาตรฐานแสดงใน ภาพประกอบ 27 โดยการคำนวณจากสูตรขีดจำกัดการตรวจวัดคือ ความเข้มข้น = $3SD \text{ (intercept)}/\text{slope}$ ผลคือ 0.009 ไมโครกรัมต่อจุดสาร และสูตรขีดจำกัดในการหาปริมาณ = $10SD \text{ (intercept)}/\text{slope}$ ผลคือ 0.03 ไมโครกรัมต่อจุดสาร

1.4.3 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรง ศึกษาจากหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอสคอร์บิก แอซิดที่เตรียม กับค่าความตอบสนองในการต้านอนุมูลอิสระที่ แปรผลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 มีค่าเป็นค่าพิกเซล นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ การเตรียมสารมาตรฐานที่มีค่าความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.375-0.875 ไมโครกรัมต่อจุดสาร (75-175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 5 ไมโครลิตรต่อ spot) ผลที่ได้ดังแสดงค่าตามตาราง 8

ตาราง 8 แสดงผลค่าความเข้มข้นของแอสคอร์บิก แอซิด และค่าพิกเซล

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/spot}$)	Pixel (Mean)	%RSD (n=3)
0.375	2745.33	3.63
0.500	3929.56	1.29
0.625	5002.83	1.14
0.750	6296.17	3.94
0.875	7061.17	1.64



ภาพประกอบ 27 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอสคอร์บิก แอซิดกับค่าพิกเซล

จากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นพบว่าความเข้มข้นของสารแอสคอร์บิก แอซิดกับค่าพิกเซล มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยมีสมการ $y = 8266.6x - 133.01$, $r^2 = 0.9962$

1.4.4 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

การทดสอบความถูกต้องโดยการวิเคราะห์หา %recovery ของสารมาตรฐาน ที่เติมลงในตัวอย่างน้ำส้ม ผลของความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น 90 - 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารแอสคอร์บิก แอซิด เติมลงในน้ำส้มเจือจางแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณที่เติมลงไป คำนวณหาร้อยละการคืนย้อนกลับ (% recovery) ได้ค่าอยู่ระหว่าง 101.50 - 104.67 % ค่าความแม่นยำมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์อยู่ระหว่าง 0.84 - 3.70 % ดังแสดงตามตาราง 9 ซึ่งสามารถยอมรับได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ

ตาราง 9 แสดงผลค่า % recovery

ความเข้มข้นที่เติม ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นจากวิธี ($\mu\text{g/ml}$)	% recovery	% RSD
90	92.20	102.50	2.60
110	115.14	104.67	0.84
140	142.00	101.50	3.70

1.4.5 ความแม่นยำ (Precision)

การทดสอบความแม่นยำของการอ่านค่าฟลักเซลของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.500 0.625 และ 0.750 $\mu\text{g/spot}$ โดยการซ้ำๆ และแปลผลให้ค่าดังแสดงในตาราง 10 เป็นการวิเคราะห์ในแผ่นเดียวกัน (Intra assay, n=6 โดยจุดซ้ำ 6 จุดใน 1 แผ่น) พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนามีความแม่นยำสูง จะแสดงจากค่า relative standard deviation (%rsd) มีค่าอยู่ช่วงระหว่าง 2.87-5.53% และผลการวิเคราะห์ต่างวัน (Inter assay, n=18 โดยจุดซ้ำ 6 จุดใน 1 แผ่น ทำซ้ำใน 3 วัน) แสดงผลดังตาราง 11 มีค่าอยู่ช่วงระหว่าง 2.95-4.19%

ตาราง 10 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์วันเดียวกัน (Intra assay)

ความ เข้มข้น ($\mu\text{g/spot}$)	วันที่					
	1		2		3	
	Average of pixel	%RSD (n=6)	Average of pixel	%RSD (n=6)	Average of pixel	%RSD (n=6)
0.500	3842.50	2.87	3860.00	3.03	3834.83	3.48
0.625	5424.50	2.53	5408.83	5.53	5409.33	2.57
0.750	6785.83	2.39	6517.83	4.27	6397.33	3.82

ตาราง 11 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ต่างวันกัน (Inter assay, n=18)

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/spot}$)	Average of pixel	%RSD (n=18)
0.500	3845.77	2.95
0.625	5414.22	3.58
0.750	6567.00	4.19

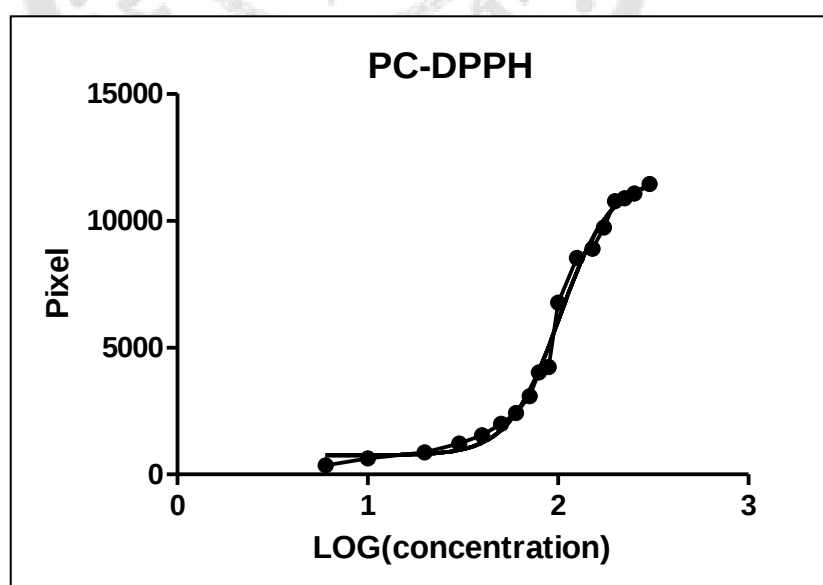
การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการจุดความเข้มข้นของสารซ้ำ ๆ 6 จุดบนกระดาษเซลลูโลสแผ่นเดียวกันมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่สูงกว่าการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ 6 จุดบนกระดาษเซลลูโลสระหว่างแผ่นกันในแต่ละวันเป็นเวลา 3 วัน เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่นความอึดตัวของสารในวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ทำการวิเคราะห์ เทคนิคการจุดสารของผู้วิเคราะห์ ตลอดจนระยะเวลาในการเคลื่อนที่

ของภูมิภาคเคลื่อนที่บนตัวกลาง ล้วนส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวัดค่า และแปลผลของค่า พิกเซลแต่ละครั้ง ดังนั้นในการทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารจึงจำเป็นที่จะต้องเทียบกับการทำ สารมาตรฐานทุกครั้ง เพื่อนำมาใช้ในการสร้างกราฟความสัมพันธ์เพื่อหาความเข้มข้นของสารในเชิง ปริมาณ

1.5. เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนามาหนดาษกับวิธี DPPH scavenging assay- Microplate

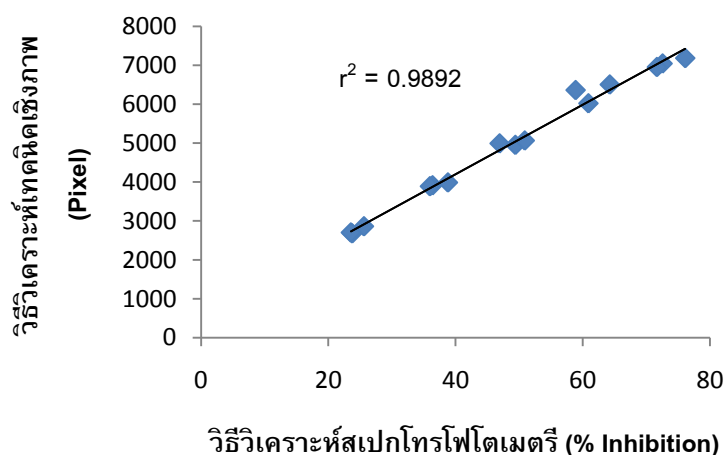
ผลการวิเคราะห์ของวิธีมาตรฐานสเปกโทรโฟโตเมตรีมีช่วงการวิเคราะห์ระหว่าง 5 – 15 µg/ml มีสมการเส้นตรงคือ $Y = 4.841x - 0.260$, $r^2 = 0.9990$ ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้ 100 % ผลได้เท่ากับ 13.86 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเทียบกับวิธี เทคนิคเชิงภาพผลได้เท่ากับ 16.24 ± 0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับวิธีวิเคราะห์สามารถหาปริมาณสารในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ได้

ผลการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของวิธีการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์สเปกโทรโฟโตเมตรีมีค่าเท่ากับ 10.17 ± 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลของวิธีเทคนิคเชิงภาพมีค่าเท่ากับ 102.27 ± 2.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Graphpad prism 5 ภาพประกอบ 28



ภาพประกอบ 28 แสดงกราฟการวิเคราะห์ค่า IC_{50} จากวิธีวิเคราะห์ PC-DPPH

จากผลการทดสอบวิธีวิเคราะห์ PC-DPPH assay แปลผลด้วยโปรแกรมเทคนิคเชิงภาพ นั้น มีค่า IC_{50} มากกว่าวิธีมาตรฐาน เนื่องจากข้อจำกัดในการวิเคราะห์ คือ คุณสมบัติของ กระจกที่ใช้เป็นตัวกลางในการดูดซับสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้น มีความสามารถในการดูดซับสารที่จำกัด และเมื่อทำปฏิกิริยากับสาร DPPH จึงทำให้ค่าความเข้มสีที่แปลผลด้วยโปรแกรม Adobe photoshop CS2 ออกมาเป็นค่าพิกเซลคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระจนระดับที่ความสามารถของกระจกดูดซับได้ ดังนั้นในการทดสอบจึงได้นำผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีมาใช้ในการคำนวณเพื่อหาค่าความสัมพันธ์ของวิธีการทดสอบ โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($r^2 = 0.9892$, $n = 15$) จากภาพประกอบ 29 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีเทคนิคเชิงภาพที่ได้พัฒนาขึ้นมานั้นมีความสัมพันธ์กัน



ภาพประกอบ 29 แสดงกราฟการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของวิธีวิเคราะห์เทคนิคเชิงภาพกับวิธีวิเคราะห์สเปกโทรโฟโตเมตรี

ผลจากการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีการทดสอบด้วยเทคนิคเชิงภาพสามารถ ตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ อีกทั้งวิธีวิเคราะห์นี้ยังสามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารผสมและจัดจำแนกสารได้ เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานที่รายงานผลเป็นภาพรวมของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งไม่สามารถจำแนกหรือแยกสารผสมได้

2. การพัฒนาชุดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอชสตริป (DPPH strip for antioxidant activity test)

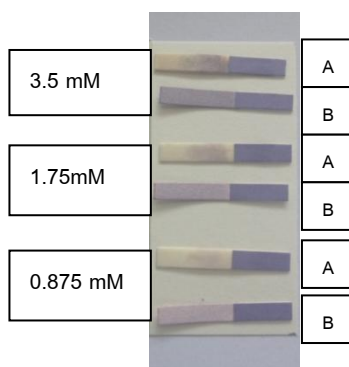
จากวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมานั้นสามารถตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้ จึงนำหลักการดังกล่าว สามารถประยุกต์เพื่อพัฒนาเป็นชุดทดสอบเพื่อตรวจวัดหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ โดยประกอบด้วยหัวข้อดังนี้

2.1 ศึกษาชนิดของกระดาษที่เหมาะสมต่อการนำมาทำชุดทดสอบ

ในการพัฒนาเป็นชุดทดสอบได้นำหลักการเกิดปฏิกิริยาของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารบนตัวกลางเพื่อหาสารเชิงคุณภาพ ได้ทำ การศึกษากระดาษที่เหมาะสมนำมาใช้ในการพัฒนาชุดทดสอบคือ กระดาษกรองเบอร์ 1 เนื่องจากเป็นกระดาษ ที่มีความบางสามารถ ดูดซับสาร DPPH ได้เร็วและแห้งไวกว่ากระดาษเซลลูโลสที่ใช้ในการหาสารเชิงปริมาณ อีกทั้งยังให้สีที่ชัดเจนเมื่อสาร DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระบนตัวกลาง จึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เป็นชุดทดสอบ โดยการนำกระดาษกรองมาตัดให้มีขนาดความยาว 3.5 เซนติเมตร กว้าง 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำสติกเกอร์สีม่วงมาแปะให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร สำหรับเป็นที่จับและใช้ในการเปรียบเทียบสีม่วงของสารละลาย DPPH

2.2 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย DPPH

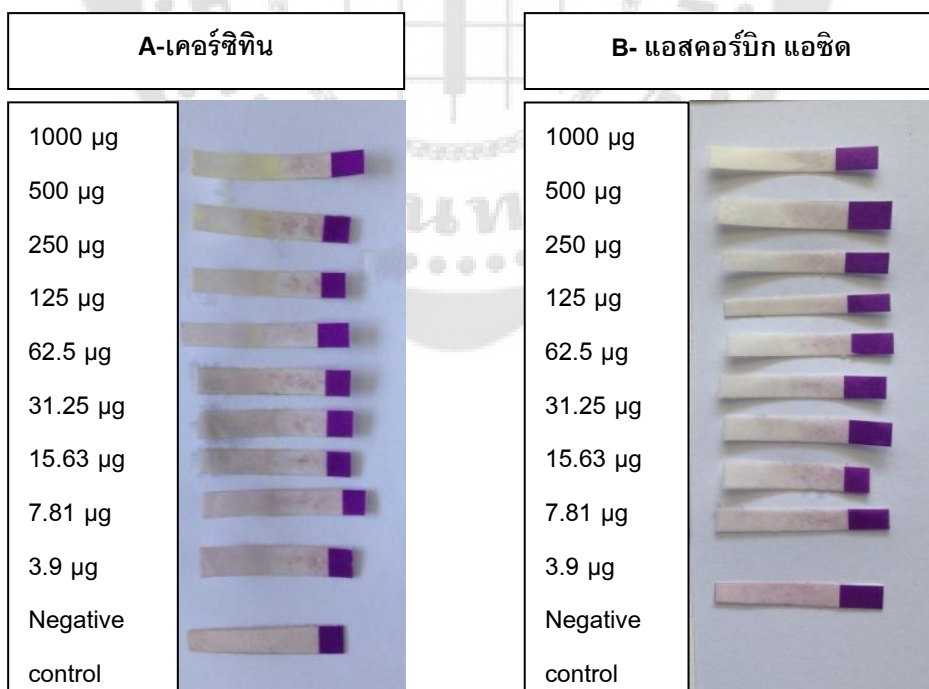
ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย DPPH เนื่องจากความเข้มข้นของวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น กระบวน ตรวจสอบที่ แตกต่างกัน เพราะวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นจะทำการสแกนภาพ เพื่อ บันทึกเป็นไฟล์ ทันที เพื่อป้องกันการฟุ้งสีหรือการเสื่อมสลายของสาร DPPH ดังนั้นในการทดสอบเพื่อพัฒนาเป็นชุดทดสอบจึงจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นที่สูง กว่าวิธี เทคนิคเชิงภาพ การศึกษาความเข้มข้นของสาร DPPH ที่ให้ความคงตัวของสีบนกระดาษอยู่บนกระดาษได้นานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ ผลการทดสอบการติดสีของกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยใช้ความเข้มข้นของสาร DPPH ความเข้มข้นเป็น 3 ระดับคือ 0.875 1.75 และ 3.50 มิลลิโมล โดยที่นำแผ่นสตริปที่ได้จากหัวข้อ 2.1 ไปจุ่มสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.875 1.75 และ 3.50 มิลลิโมล ผลการเปรียบเทียบการติดสีที่ระดับความเข้มข้นที่ 1.75 มิลลิโมล ให้สีที่เด่นชัดและมีความคงตัวของสีที่ดีกว่าความเข้มข้นที่ 0.875 มิลลิโมล เมื่อตรวจสอบด้วยตาเปล่า เนื่องจากการทดสอบต้องตรวจสอบ Negative control ด้วยการจุ่มลงในน้ำ ผลคือความเข้มของสีม่วงจืดจางลง เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 1.75 และ 3.50 มิลลิโมล และผลของความเข้มข้นที่ระดับ 1.75 มิลลิโมล มีความไม่ต่างกับกับความเข้มข้นที่ 3.5 มิลลิโมล จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 1.75 มิลลิโมล จากภาพประกอบ 30

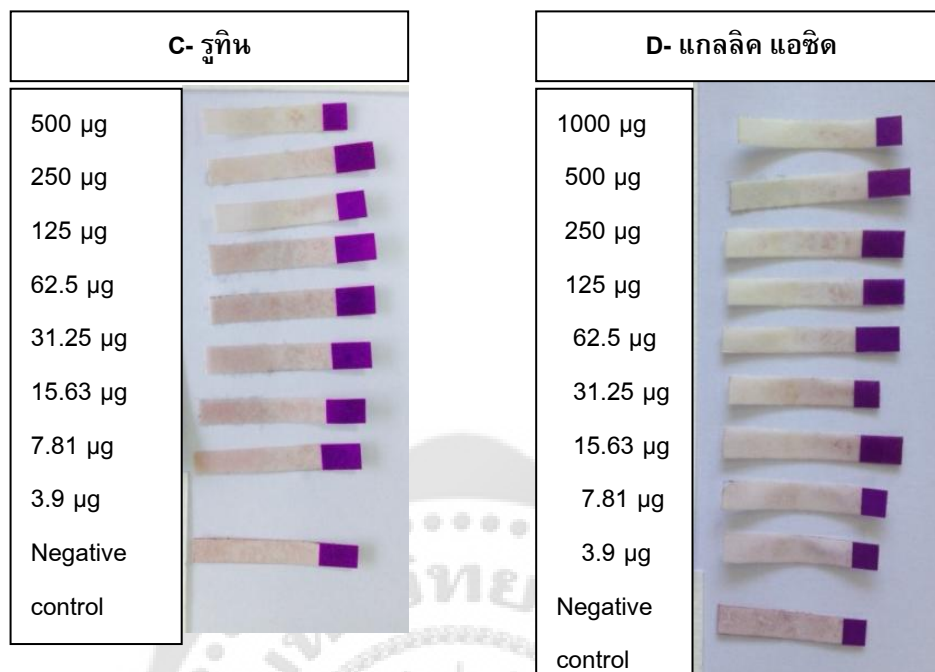


ภาพประกอบ 30 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นในระดับต่างของสาร DPPH (A-Positive control และ B-Negative control)

2.3 ผลการทดสอบหาค่า Limit of detection (LOD) ของสารมาตรฐาน

จากการทดสอบโดยนำแผ่นชุดทดสอบจุ่มในความเข้มข้นของสาร DPPH จนทั่ว แล้วจุ่มลงในหลุมที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย แอสคอร์บิก แอซิด เคอร์ซีทีน รูทีน และแกลลิก แอซิด ผลค่าที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 7.80 62.5 125 และ 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงภาพประกอบ 31





ภาพประกอบ 31 แสดงค่า Limit of Detection (LOD) ของชุดทดสอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ตาราง 12 แสดงผลการทดสอบ Limit of Detection (LOD) ของชุดทดสอบ

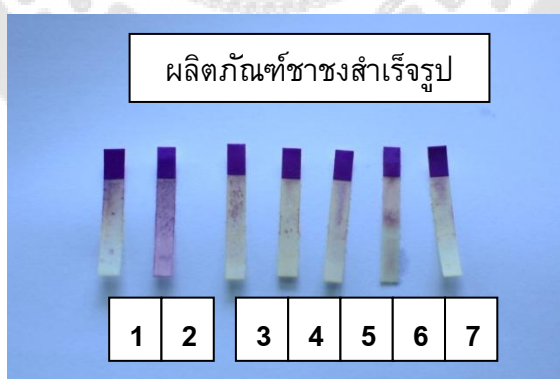
สารมาตรฐาน	Limit of Detection :LOD (µg/ml)
Ascorbic acid	7.8
Gallic acid	15.6
Rutin	125.0
Quercetin	62.5

จากตาราง 12 แสดงถึงความสามารถในการตรวจสอบของชุดทดสอบ มีความสามารถตรวจวัดหาสารในเชิงคุณภาพได้ โดยที่ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดสารมาตรฐานได้ในระดับไมโครกรัมของสารที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สมุนไพร หรือพืชผักผลไม้ ที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ โดยอ้างอิงจากการทดสอบสารมาตรฐานที่พบโดยทั่วไปในธรรมชาติ

2.4 ผลการศึกษาโดยใช้ชุดทดสอบในการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์

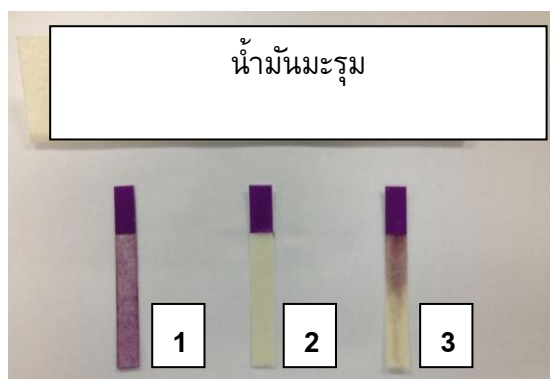
การทดสอบในผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ได้คัดเลือกมา ทำการทดสอบ ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ผงชาสำเร็จรูป ที่เป็นที่ยอมรับ ที่นำมาใช้ในการชง เพื่อดื่ม และผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของ น้ำมันเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบสามารถตรวจวัดได้หรือไม่ ผลการทดสอบจากภาพประกอบ 32 แสดงถึงความสามารถในการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ได้ แปลผลจากการเปลี่ยนสีของแผ่นสตริปจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และ เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นที่เป็นตัวควบคุมที่ไม่เปลี่ยนสี เป็นเพราะในชาอุดมไปด้วยสารเคอร์ซีทิน แกลลิก แอซิด และ รุทีน เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และจากภาพประกอบ 33 ทดสอบตรวจวัดสารที่อยู่ในรูปน้ำมันโดยการจุ่มลงในหลุมแสดงให้เห็นการเปลี่ยนสีม่วงของสาร DPPH บนแผ่นทดสอบซึ่งเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เป็นการยืนยันได้ว่าชุดทดสอบสามารถตรวจวัดสารที่อยู่ในน้ำมันได้ ซึ่งในน้ำมันมะรุม นั้นมีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น รุทีน และเคอร์ซีทิน จึงระบุได้ว่าผลิตภัณฑ์น้ำมันมะรุมมี คุณสมบัติเป็นผลิตภัณฑ์ ที่ส่วนประกอบเป็นสาร ที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้

ในการศึกษางานวิจัยนี้ได้นำความรู้การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยนำหลักการมา พัฒนาเพื่อเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบเบื้องต้นอย่างง่าย ในการทดสอบหาสารที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ สมุนไพร และพืชผักผลไม้ รวมถึงเป็นการพัฒนาวิธีการทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบมาใช้ในการเป็นวิธีการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ระบุถึงสรรพคุณให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ในอนาคต



ภาพประกอบ 32 แสดงผลการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยชุดทดสอบใน

ผลิตภัณฑ์ชาสำเร็จรูป 1-positive control 2- Negative control 3-ชาดำ 4-ชาอู่หลง 5-ชาลิปตัน 6-ชาผลไม้ และ 7-ชาใบหม่อน



ภาพประกอบ 33 แสดงผลการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยชุดทดสอบใน
ผลิตภัณฑ์น้ำมันมะรุม 1-Negative control 2- positive control 3-น้ำมันมะรุม



บทที่ 5

อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ โดยอาศัยหลักการแยกสารบนตัวกลางที่เป็นกระดาษเซลลูโลส เพื่อลด ต้นทุนในการวิเคราะห์ โดยการลดการใช้แผ่น TLC หรือแผ่น HPTLC ซึ่งมีราคาที่สูงกว่า รวมถึงอันตรายจากสารพิษตกค้างของซิลิกาที่ใช้ในการเคลือบ ซึ่งเป็นอันตรายส่งผลต่อผู้ใช้งานรวมถึงสารพิษตกค้างที่มีผลต่อธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การศึกษา ได้ประยุกต์ใช้ความรู้ด้าน เทคนิคเชิงภาพมา พัฒนาวิธีการวิเคราะห์งานวิจัย โดยการสแกนภาพและ แปลผลไฟล์ภาพหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มเข้มกับค่าพีเชล ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ซึ่งเป็นโปรแกรมพื้นฐานที่นิยมใช้ เนื่องจากใช้ง่าย สามารถหาได้โดยทั่วไปเป็นโปรแกรมที่อยู่ในคอมพิวเตอร์ที่สามารถนำไปใช้งานได้ทุกที่ ซึ่งการ นำมา ประยุกต์ ใช้ในการพัฒนาเป็นวิธีการทดสอบ เพื่อตรวจแยกสารผสม ที่มีอยู่ในธรรมชาติ สมุนไพร พืชผักผลไม้ และ ผลิตภัณฑ์รวมถึง สารสกัดที่ได้จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในการตรวจสอบสามารถตรวจ วัดสารในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้ และให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องน่าเชื่อถือ เหมาะสำหรับการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เป็นวิธีที่สะดวก ง่าย ประหยัด และปลอดภัยแก่ผู้ใช้งาน

งานวิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยสาร DPPH ในการตรวจวัดค่าความสามารถเป็นสารให้อิเล็กตรอนโดยการเปลี่ยนสีจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง โดยใช้สารบริสุทธิ์ แอสคอร์บิก แอซิด เป็นสารมาตรฐาน อีกทั้งวิธีการตรวจวัดได้นำหลักการแยกบนตัวกลางเพื่อแยกสารผสมหรือสารธรรมชาติที่ปนกัน มาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยคัดเลือกกระดาษเซลลูโลส มาใช้เป็นวัสดุภาคคงที่เพื่อทดแทนการใช้แผ่น TLC หรือแผ่น HPTLC กระดาษเซลลูโลสให้คุณสมบัติที่ดีในการดูดซับสาร แห้งไว ให้ขอบเขตของจุดสารและขอบเขตของสารอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสาร DPPH ที่ชัดเจน เนื่องจากมีความละเอียดของเนื้อสัมผัสของกระดาษเซลลูโลส สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำ ได้ มีความคงตัวในวัสดุภาคเคลื่อนที่โดยที่กระดาษเซลลูโลสมีคุณสมบัติในการตั้งลงในวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ดีและไม่อ่อนตัว

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นมานั้น ต้องผ่านการตรวจสอบ ความถูกต้องของวิธี เพื่อให้ได้วิธีที่ความถูกต้องและแม่นยำของวิธีการทดสอบตามข้อกำหนดตามเกณฑ์การยอมรับของ

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use⁽³⁸⁾ และ FDA guideline⁽³⁹⁾ โดยทดสอบตามหลักการการหา ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ โดยศึกษาในช่วงความเข้มข้นที่ 0.375-0.875 ไมโครกรัมต่อจุดสาร พบว่ามีความเป็นเส้นตรงที่ดี โดยมีสมการคือ $Y = 8266.6x - 133.01$ ค่า r^2 เท่ากับ 0.9962 ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนด (r^2 มากกว่า 0.995) แต่เมื่อเทียบกับวิธีการศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในแนวทางเดียวกันโดยวิธีของ Li paiwu และคณะ ที่ทำการศึกษาโดยใช้อุปกรณ์ในการบันทึกภาพด้วยกล้องที่มีความละเอียดสูง CCD กับวิธีการทดสอบ TLC-DPPH ทดสอบบนแผ่น TLC พบว่าให้ค่า r^2 อยู่ในช่วง 0.947 ถึง 0.996 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าวิธีการบันทึกภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์และแปลผลด้วย

โปรแกรม Adobe photoshop CS2 ของวิธี PC-DPPH มีสามารถในการให้ค่าความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ดี สามารถยอมรับได้ และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี ($r^2 = 0.9990$) ให้ค่าที่มากกว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น เนื่องจากวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรีเป็นการวัดค่าด้วยเครื่องมือที่ให้ผลการตรวจวัดที่มีความแม่นยำของสาร แต่ข้อจำกัดไม่สามารถแยกสารผสมได้ว่าเป็นสารใดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้ง ความสามารถตรวจวัดค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) ไม่สามารถระบุได้ ซึ่งวิธี การวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นให้ผล ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) คือ 0.009 และ 0.03 ไมโครกรัมต่อจุดสาร ตามลำดับ ซึ่งมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณต่ำได้ จากการแปลผลโดยเทคนิคเชิงภาพ การประเมินความถูกต้องของวิธี ค่า % recovery อยู่ในช่วง 101.50 ถึง 104.67 % และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ระหว่าง 0.84 ถึง 3.70 % (ตาราง 9) ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิดซ้ำทั้งในวันเดียวกัน (Intra-assay precision) และในต่างวันกัน (Inter-assay precision) ให้ค่าร้อยละของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ระหว่าง 2.29 ถึง 5.53 % และ 2.95 ถึง 4.19 % ตามลำดับ จากผลการทดสอบการใช้โปรแกรม Adobe photoshop cs2 ซึ่งเป็นโปรแกรมภาพพื้นฐานมาใช้ในการแปลผลการวิเคราะห์ให้ค่าที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานกำหนด สามารถใช้ในการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้

การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์โดยการทดสอบหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้ม 100 % ผลคือค่าความเข้มข้นที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของวิธีการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์สเปกโทรโฟโตเมตรีมีค่าเท่ากับ 10.17 ± 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหาจากการสร้างกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา และผลของวิธีเทคนิคเชิงภาพมีค่าเท่ากับ 102.27 ± 2.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้การคำนวณกราฟมาตรฐานแปลผลความเข้มข้นต่อฟิกเชลในจุดของ

สารที่เกิดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยโปรแกรม Graphpad prism 5 จากวิธีทั้งสองสามารถหาค่าความสัมพันธ์ของวิธีการทดสอบให้ค่าสหสัมพันธ์ ($r^2 = 0.9892$, $n = 15$) แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธี มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน และผลการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้ม 100% พบว่าวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงภาพให้ผลการวิเคราะห์ 16.24 ± 0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานสเปกโตรโฟโตเมตรีให้ผลที่ 13.86 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์ PC-DPPH assay แปลผลด้วยโปรแกรมเทคนิคเชิงภาพนั้น มีสามารถตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารผสมได้ โดยอาศัยหลักการแยกสารที่มีคุณสมบัติความมีขั้วที่ดี และสามารถวิเคราะห์สารในเชิงคุณภาพจากการเปลี่ยนสีของสาร DPPH ที่เป็นสีม่วงบนกระดาษไปเป็นสีเหลือง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังสามารถหาสารในเชิงปริมาณได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารกับค่าพิกเซลของจุดสารอนุมูลอิสระที่เกิดปฏิกิริยากับสาร DPPH

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เทคนิคเชิงภาพสามารถนำหลักการข้างต้นมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ บนตัวกลางที่เป็นกระดาษ อย่างง่าย เพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาบนตัวกลาง สามารถตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระบนตัวกลางที่เป็นกระดาษได้ จึงได้นำความรู้มาพัฒนาเป็นชุดทดสอบ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบเบื้องต้นของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่อ้างสรรพคุณและปริมาณของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีขายในท้องตลาด รวมถึงสมุนไพรและพืชผักผลไม้ โดยชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้น นี้ ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์หรือโปรแกรมในการแปลผล โดยศึกษาการเปลี่ยนสีของสาร DPPH บนตัวกลางที่เป็นกระดาษ

ชุดทดสอบที่ได้พัฒนามีวิธีการโดย การนำกระดาษกรองมาใช้เป็นแผ่นสตริป เพื่อใช้เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบกับสาร DPPH โดยในการทดสอบความเข้มข้นของสาร DPPH ที่เหมาะสมคือ 1.75 มิลลิโมล เนื่องจากการแปลผลด้วยการสังเกตด้วยตาเปล่า ดังนั้นใน การตัดสินใจมีความสำคัญ ในการทดสอบจึงจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ที่สูงกว่าวิธีเทคนิคเชิงภาพเพื่อให้มีการตัดสินใจที่มีความคงทนและระยะเวลานานบนตัวกลางกระดาษ เนื่องจากสาร DPPH มีการเสื่อมสลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนแสงหรือทำปฏิกิริยากับอากาศ

การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดปริมาณสาร ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ ในการศึกษาได้นำสารมาตรฐานที่พบมาก ในธรรมชาติ นำมาหาค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบสารได้ (LOD) ประกอบด้วยสารแอสคอร์บิก แอซิด เคอร์ซีทีน รูทีนและแกลลิก

แอซิด ผลค่าที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 7.80 62.5 125 และ 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดสอบสามารถยืนยัน ว่าชุดทดสอบมีประสิทธิภาพในการตรวจหาหรือสามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณที่ต่ำระดับไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ได้

การพัฒนาชุดทดสอบเพื่อใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่บ่งชี้ถึงสรรพคุณของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในงานวิจัยได้นำผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่นิยม ในปัจจุบัน ประกอบด้วยชาผงสำเร็จรูปและน้ำมันมะรุม มาใช้ในการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ผลที่ได้คือชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ โดยที่ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาบนตัวกลาง ของสาร DPPH กับผลิตภัณฑ์ในการเกิดปฏิกิริยาของการเปลี่ยนสีจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง พบว่าทั้งผลิตภัณฑ์ผงชาสำเร็จรูปและน้ำมันมะรุมมีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นความสามารถของชุดทดสอบสามารถตรวจวัดปริมาณสารที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติได้ เป็นการใช้ชุดทดสอบในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เบื้องต้นได้

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการแยกสารด้วยกระดาษเซลลูโลส ทำการเก็บข้อมูลด้วยการสแกนภาพ และแปลผลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 เป็นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อเป็นวิธีที่ความถูกต้องและแม่นยำของวิธีการทดสอบตามข้อกำหนดตามเกณฑ์การยอมรับของ International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use⁽³⁸⁾ และ FDA guideline⁽³⁹⁾ ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบเพื่อหาสาร ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้ เป็นวิธีทางเลือกที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สะดวก ง่าย ประหยัด ปลอดภัย แก่ผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม

อีกทั้งวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นเป็นพื้นฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้ในการทดสอบตรวจสอบหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นในผลิตภัณฑ์ เป็นการประยุกต์วิธีวิเคราะห์เพื่อพัฒนาเป็นชุดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอชสตริป ความสามารถคือใช้การทดสอบสารเบื้องต้นของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติได้ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เป็นวิธีที่สะดวก ง่าย และประหยัดเวลาเหมาะแก่การลงภาคสนาม เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือ ไม่จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างในการตรวจวัด

ในการทดสอบ สามารถตรวจสอบ และ แสดงผลการวิเคราะห์ ทั้งนี้ ยังเป็นการลดต้นทุนในการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใน การปฏิบัติการจุดสาร ลงบนกระดาษขนาด ของจุดสารและขอบเขตมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาและมีผลต่อการอ่านค่าฟลักเซล อีกทั้งวิธียังไม่เหมาะต่อการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ไม่มีขั้ว เนื่องจากตัวกลางเป็นกระดาษที่มีความมีขั้วสูง สารจึงไม่สามารถเคลื่อนที่ไปบนตัวกลางได้ และไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ สารที่มีฤทธิ์ในการต้าน อนุมูลอิสระที่มีสี เนื่องจากไปรบกวนการอ่านค่าฟลักเซลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในการทดสอบได้ศึกษาชนิดของวัสดุภาชนะที่และสภาวะวัสดุภาชนะเคลื่อนที่ที่เหมาะสมต่อสาร แอสคอร์บิก แอซิด จึงสามารถศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ เช่น แกลลิก แอซิด เคอร์ซีทิน เป็นต้น เพื่อใช้ในการแยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสมได้

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการ เป็นชุดทดสอบสาร ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาชุดทดสอบที่สามารถตรวจวัดสารในเชิงคุณภาพ เป็นการตรวจสอบ และการควบคุมคุณภาพในเบื้องต้นว่าผลิตภัณฑ์มีสารที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แต่สามารถไม่สามารถระบุได้ว่ามีปริมาณเท่าใด ซึ่งจากฐานความรู้สามารถนำไปประยุกต์และต่อยอดเพื่อพัฒนาชุดทดสอบสารในการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณเพื่อหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์



บรรณานุกรม

1. โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์, มาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. พี.เอส.พรีนซ์; 2549.
2. Enrique cadenzas, Lester packer. Handbook of antioxidants. New York. M. Dekker; 1996.
3. TPA Devasagayam, JC Tilak, KK Boloor, Ketaki S Sane, Saroj S Ghaskadbi, RD Lele. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. 2004; 52:794-804.
4. Abheri Das Sarma, Anisur Rahaman Mallick and A.K. Ghosh. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. 2010; 1: 185-192.
5. Lawrence J. Machlin. Handbook of Vitamins. 2nd ed. New York. Marcel Dekker; 1991.
6. Joseph Sherma, Bernard Fried. Handbook of Thin-layer Chromatography volume 71. 2nd ed. New jersey. Cherry Hill; 1996.
7. NCBI: National Center for Biotechnology Information [เข้าถึงเมื่อ 2557 ม.ค. 16]. เข้าถึงได้จาก:
http://www.cefishessentials.com/index.php?route=news/category&npath=1_10
8. Gregory S. Kelly. Quercetin: Alternative Medicine Review. 2011; 16-2: 172-194.
9. Preveen Kumar ashok, Bhawana Saini. HPLC analysis and isolation of Rutin from stem bark of *Ginkgo biloba* L. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2013; 2(4): 68-71.
10. A.B. Sharangi. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.)- A review. Food Research International. 2009; 42: 529-535.
11. Magdalena Jeszka-Skowron, Magdalena Krawczyk, Agnieszka Zgola-Grzeskowiak. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. Journal of Food Composition and Analysis. 2015; 40: 70-77.

12. มะรุม. [เข้าถึงเมื่อ 2558 เมษายน 1]. เข้าถึงได้จาก:
http://www.rd.go.th/publish/fileadmin/user_upload/buddhism_club/file/marum.pdf.
13. มะรุม [เข้าถึงเมื่อ 2558 เมษายน 1]. เข้าถึงได้จาก:
http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2256.
14. Sylwester Czaplicki. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. [เข้าถึงเมื่อ 2558 มกราคม 16]. เข้าถึงได้จาก: <Http://dx.doi.org/10.5772/55620>
15. Sigma Aldrich: MSDS ABTS. [เข้าถึงเมื่อ 2557 พ.ค. 1]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=TH&language=en&productNumber=A3219&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fa3219%3Flang%3Den>.
16. Sigma Aldrich: MSDS DPPH. [เข้าถึงเมื่อ 2557 ก.พ. 12] เข้าถึงได้จาก:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=TH&language=en&productNumber=D9132&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2Fd9132%3Flang%3Den>.
17. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย โสธนะพันธุ์, ประไพ วงศ์สินคณมน์. ทีแอลซี: วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี. สถาบันการแพทย์ไทย; 2551.
18. DPPH assay. [เข้าถึงเมื่อ 2557 พ.ค. 1]. เข้าถึงได้จาก:
http://www.damocos.co.kr/damo/language/english/lab_paper3.php.
19. Sagar B. Kedare, R. P. Singh. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of food Science and Technology. 2011; 48: 412-422.
20. Wikipedia Ultraviolet–visible spectroscopy. [เข้าถึงเมื่อ 2557 ก.ค. 5]. เข้าถึงได้จาก:
http://en.wikipedia.org/wiki/Ultraviolet%E2%80%93visible_spectroscopy.
21. Renyi Yan, Yangyang Cao, Bin Yang. HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Antioxidant Compounds Extracted from Semen Oroxyli. *Molecules*. 2014; 19: 4409-4417.

22. E. Heftmann. Chromatography: fundamentals and applications of chromatographic and eletrophoretic methods Part A: fundamentals and techniques. Amsterdam. Elsevier Scientific; 1983.
23. Raymond P.W. Scott. Techniques and Practice of Chromatography. New Jersey. Cherry Hill; 2005.
24. Attila Gaspar, Istvan Bacsi. Forced flow paper chromatography: a simple tool for separations in short time. Microchemical journal. 2009;92:83-86.
25. Wei Liu, Juan Kou, Huizhong Xing, Baoxin Li. Paper-based chromatographic chemiluminescence chip for the detection of dichlorvos in vegetables. Biosensors and Bioelectronice. 2014; 52: 76-81.
26. Natalia M. Leonardi, Guillermo A. Casale, Jorge Nicolini, Patricia D. Zubata, María J Salgueiro and Marcela B. Zubillage, Validation of a Paper Chromatographic Methodology as an Alternative for Determination of the Radiochemical Purity of Na 18F. Journals of Nuclear Medicine technology 2012; 271-274.
27. Yun-Qing Huang, Jing-Qing You, Junsheng Zhang, Wenjian Sun, Li Ding, Yu-Qi Feng. Coupling frontal elution paper chromatography with desorption corona beamionization mass spectrometry for rapid analysis of chlorphenamine in herbal medicines and dietary supplements. Journal of Chromatography A. 2011:7371-7376.
28. ปันตดา พัฒนาศิน. รงคเลขฝวบาง (Thin Layer Chromatography) การประกยูกตใ้ใน งานวิจัยยาและผลตภณฑรรมาชาติ. พมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. โรงพมพ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2550.
29. Cellulose. [เข้าถึงเมื่อ 2557 มิถุนายน 04]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.fibersource.com/f-tutor/cellulose.htm>
30. Li Peiwu, Anu hopia, Jani S., Teijo YrjÖnen and Heikki Vuorela. TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology. [เข้าถึงเมื่อ 2557 มี.ค. 14]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.regional.org.au>.

31. ลาวัลย์ ศรีพงษ์, ปนัดดา ไยภักดี, อุทัย โสธนะพันธุ์. การตรวจวัดปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันด้วยวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้เทคนิคเชิงภาพ. มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2546.
32. Ashok Kumar, lakshmana K. Yerneni. Semi-automated relative quantification of cell culture contamination with mycoplasma by Photoshop-based image analysis on immunofluorescence preparations. *Biologicals*. 2009:55-60.
33. Panadda Phattanawasin, Uthai Sotanaphun, Lawan Sriphong, Inthira Kanchanaphibool and Nusara Piyapolrungraj. A Comparison of image analysis software for quantitative TLC of Ceftriaxone sodium. *Silpakorn U. Science & Tech*.2011:7-13.
34. Panadda Phattanawasin, Uthai Sotanaphun, Tasamaporn Sukwattanasinit, Jariya Akkarawarantorn and Sarunyaporn Kitchaiya. Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method. *Forensic Science International*. 2011:96-100.
35. Eliangiringa Kaale, Bugusu C. Nyamweru, Vicky Manyanga, Mhina Chambuso, Thomas Layloff. The development and validation of a Thin Layer Chromatography densitometry method for the analysis of diclofenac sodium tablets. *International journal of chemical and analytical science*. 2013; 4: 73-79.
36. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. [เข้าถึงเมื่อ 2557 ม.ค. 06]. เข้าถึงได้จาก:
<http://oldweb.pharm.su.ac.th/thai/research48/datafile/data50/Thesis/Demo02.pdf>
37. Iwona Kowalska, lukaszCiesla, Tomasz Oniszcuk, Monika Waksmundzka-Hajnos, Wiesław Oleszek, Anna Stochmal. Comparison of two TLC-DPPH-image processing procedures for studying free radical scavenging activity of compounds from selected varieties of *MEDICAGO SATIVA*. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2013; 36:2387-2389.
38. Guidance for industry: Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. [เข้าถึงเมื่อ 2557 มี.ค. 27]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM386366.pdf>.

39. ICH Guideline. [เข้าถึงเมื่อ 2557 ม.ค. 24]. เข้าถึงได้จาก:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1Step4/Q2_R1__Guideline.pdf



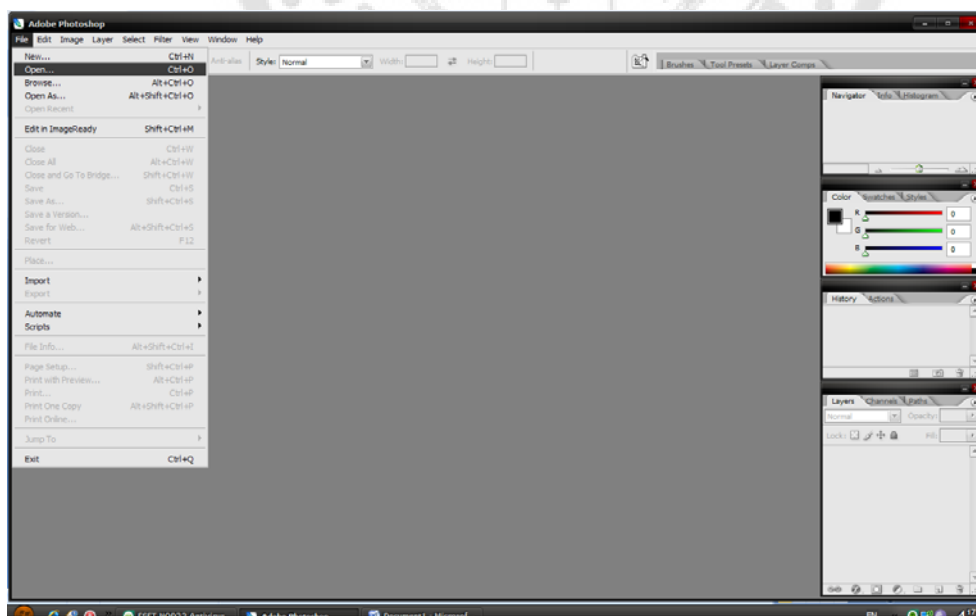


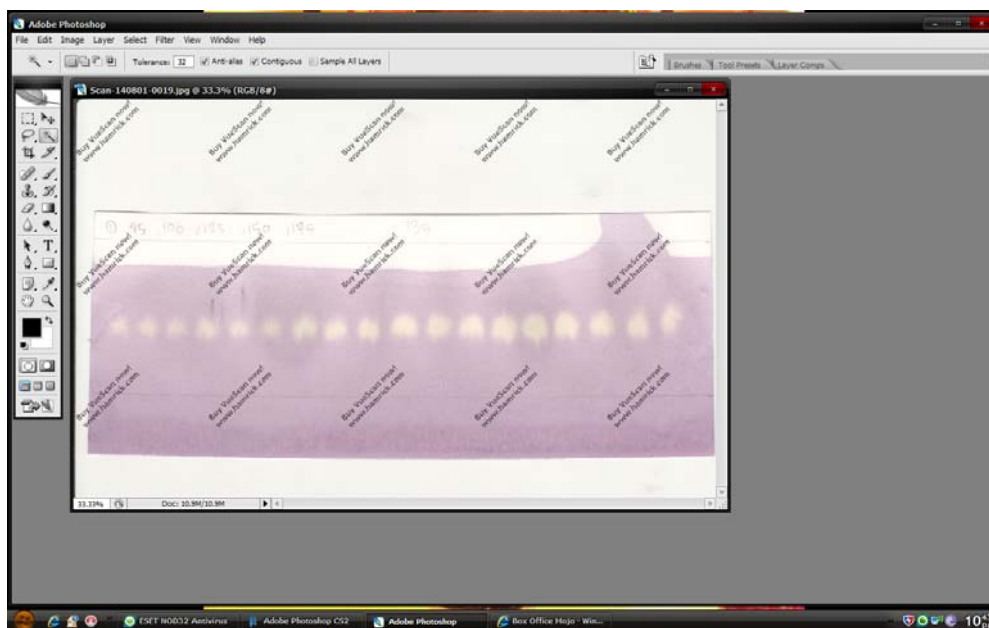
แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เชิงภาพด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2

1. เปิดโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ที่ไอคอนหน้าจอ แล้วหลังจากนั้นโปรแกรมจะขึ้นดั่งภาพข้างล่าง

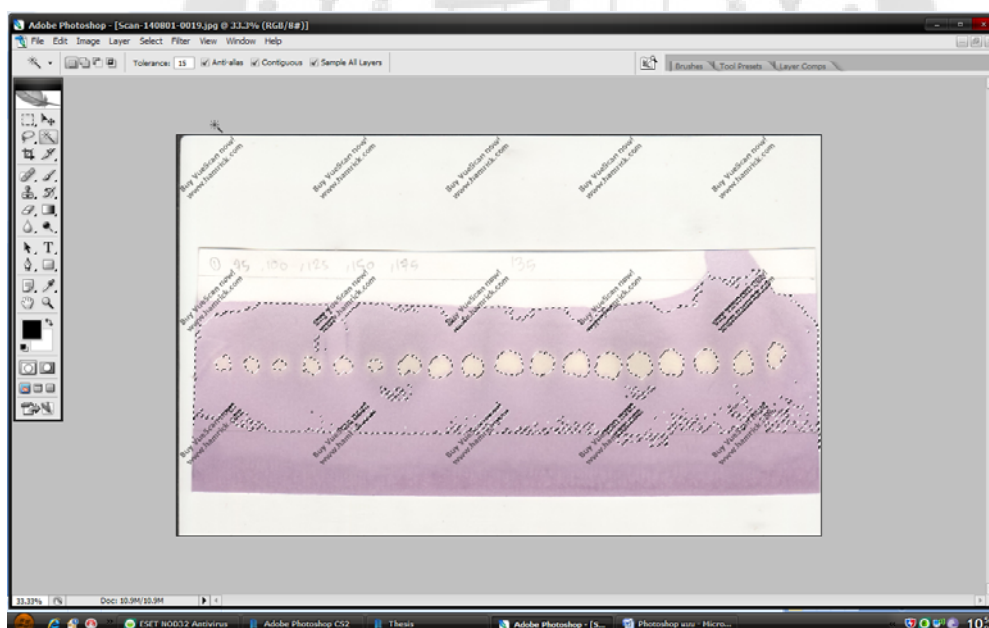


2. เปิดไฟล์ภาพที่ได้บันทึกไว้ จากนั้นเลือกโปรแกรม File เลือก Open เลือกไฟล์ภาพที่ต้องการวิเคราะห์

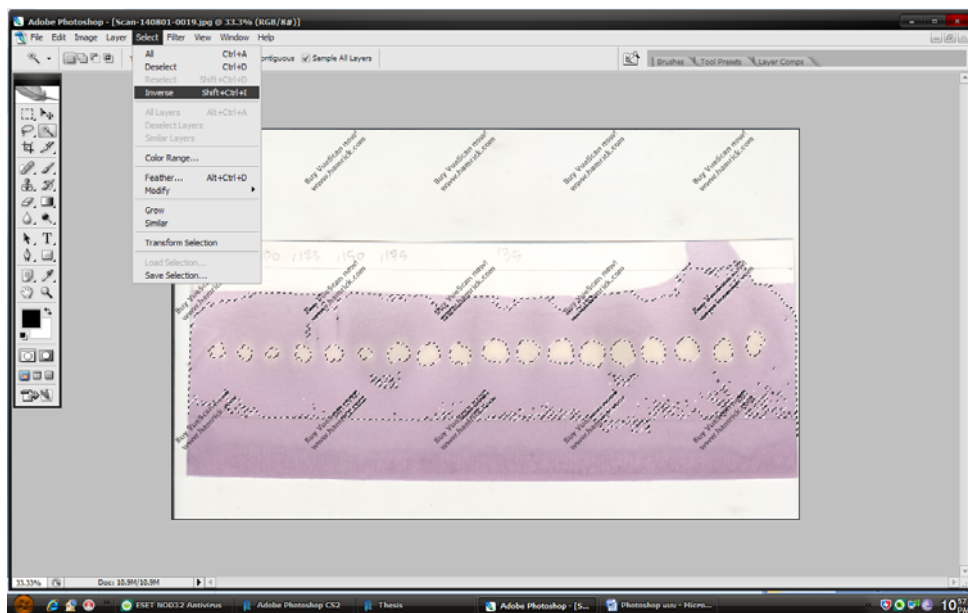




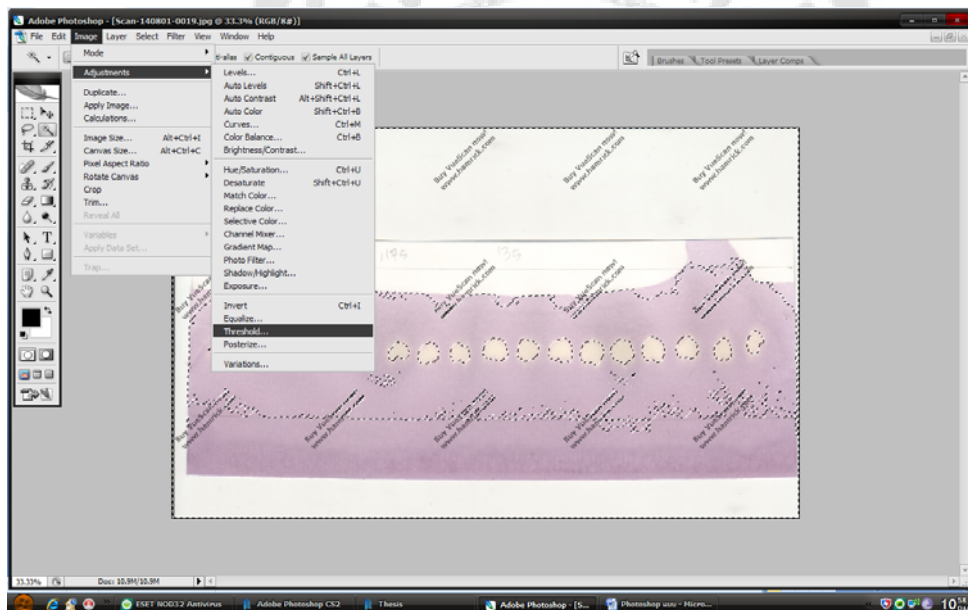
3. เมื่อได้ภาพที่ต้องการวิเคราะห์เทคนิคเชิงภาพให้กดเลือกเครื่องมือ Magic wand คลิกเลือกบริเวณที่เป็นพื้นหลังสีม่วง (กำหนดค่า tolerance = 15 ซึ่งจะกำหนดค่าได้มากกว่าหรือน้อยกว่านี้ได้ เพื่อให้สามารถเลือกบริเวณสีม่วงออกจากวงสีเหลืองได้) จะเกิดเส้นปะโดยรอบบริเวณที่เลือก



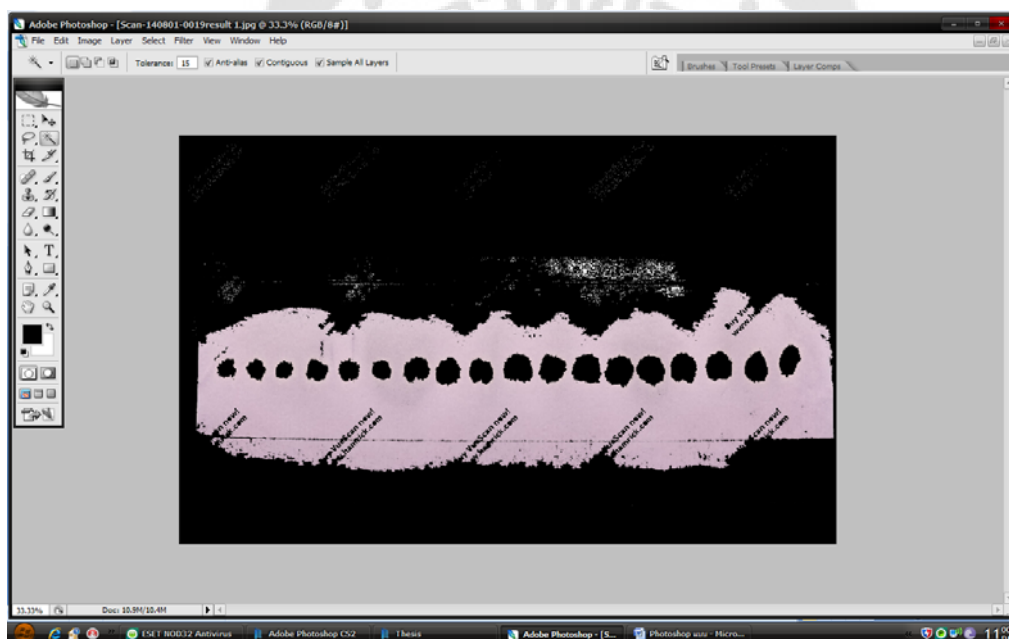
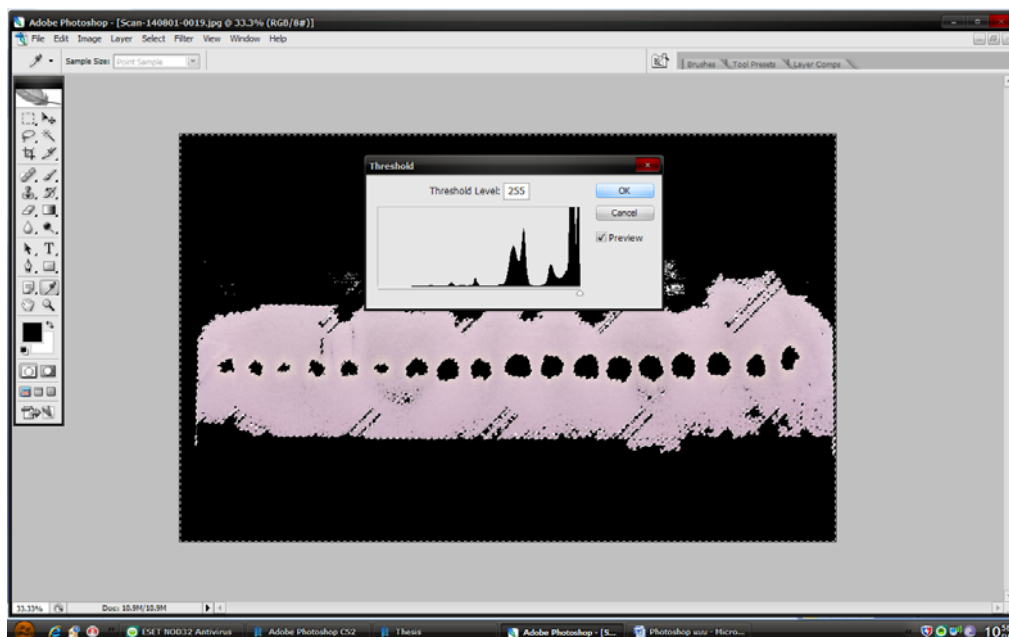
4. จากนั้นไปที่เมนู Select เลือก Inverse จะกลับไปเลือกพื้นที่ในทางตรงกันข้าม ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการเกิดสีเหลืองของสารต้านอนุมูลอิสระ



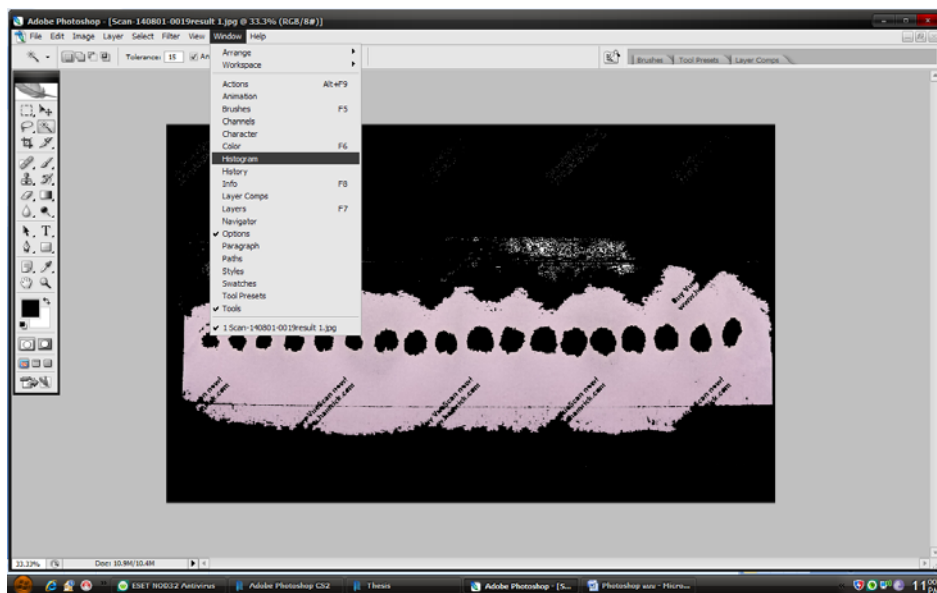
5. จากนั้นเลือกเมนู Image เลือก adjustment และกดเลือก threshold



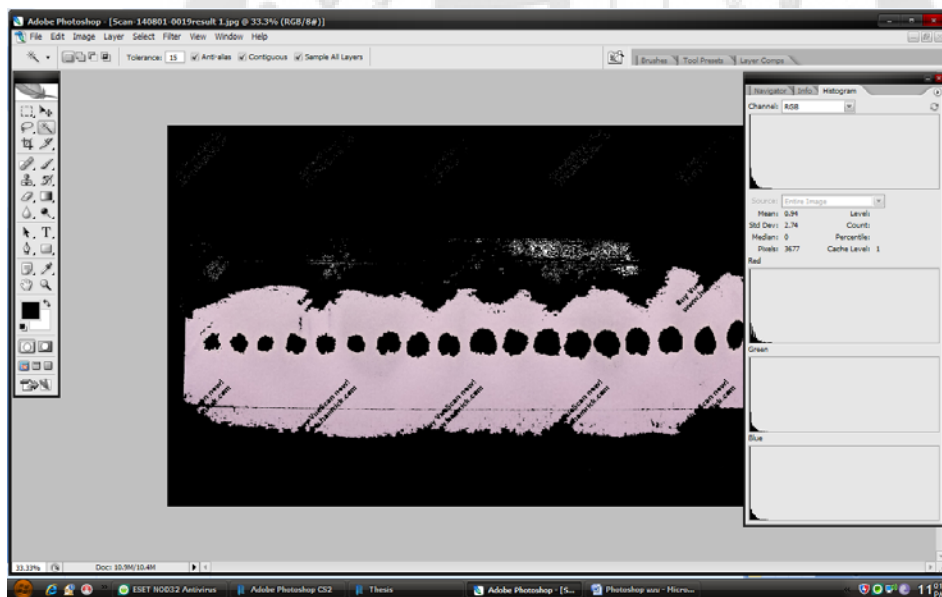
6. กำหนดค่า Threshold level เท่ากับ 255 จะทำให้วงสีเหลืองเปลี่ยนไปเป็นไปวงสีดำสม่ำเสมอ
จากนั้นกดคลิกเลือก ok



7. เข้าเมนูเลือก Window เพื่อเลือกโปรแกรม Histogram



8. ใช้เครื่องมือ Magic Wand กดเลือกบริเวณที่ Spot ที่เหลืดำทับแต่ละจุด เพื่อนำค่า Pixel มาศึกษาหาความสัมพันธ์เชิงเส้น



9. จากนั้นนำค่าทั้งหมดไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษากับค่า Pixel ที่ได้จากการทดสอบ



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	วันชัย อินทรพิทักษ์
วัน เดือน ปีเกิด	5 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ปัจจุบันอยู่ที่	281 ถนนนครหลวง ซอย 13 แขวงบางไผ่ เขตบางแค กทม. 10160
ตำแหน่งหน้าที่	เจ้าหน้าที่พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
ที่ทำงาน	บริษัท แอลบีเอส แลบบอราตอรี จำกัด
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2545	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนจันทร์ประดิษฐารามวิทยาคม
พ.ศ. 2549	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2558	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาการเภสัชภัณฑ์ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ผลงานที่ผ่านมา	
พ.ศ. 2554	ปัญหาพิเศษเรื่อง การยับยั้งเชื้อรา <i>Collectotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่ง โดย <i>Bacillus thuringiensis</i> : การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ ธรรมชาติและจัดการทางสังคม (National Symposium on Natural Science and Social Management)
พ.ศ. 2557	รางวัลผลงานระดับดีเด่นสิ่งประดิษฐ์ ชุดทดสอบฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอชสตริป (DPPH Strip for Antioxidant Activity Test) ในงานประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยและ สิ่งประดิษฐ์ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 32 เนื่องในงาน 40 ปี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ