



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ระบบวิเคราะห์ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ
อย่างรวดเร็วด้วยไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่

โดย

ดร. มะลิวรรณ อมตธงไชย และคณะ

7 มิถุนายน 2555



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ระบบวิเคราะห์ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว
ด้วยไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่

A high throughput screening method for assessing total antioxidant
capacity using new biosensors

คณะผู้วิจัย

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. ดร. มะลิวรรณ อมตธงไชย | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| 2. นางสาวเสาวนีย์ เหล่าสิงห์ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| 3. นาง รัตนาพร ทิระพล | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| 4. ผศ.ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ที่ปรึกษา) |

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานงบประมาณ
ประจำปีงบประมาณ 2554
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานประมาณแผ่นดินที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2554 ทำให้สามารถทำงานวิจัยชิ้นนี้ได้สำเร็จ ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. ดวงใจ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัย และขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย และนักศึกษาทุกท่านที่ได้ช่วยเสนอความคิด และได้ทำงานวิจัยอย่างเต็มที่ ทำให้งานวิจัยและการนำเสนอผลงานในระดับต่าง ๆ ประสบความสำเร็จด้วยดี

สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)	i
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
บทที่ 1 บทนา	
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.1.1 อนุมูลอิสระ (free radical)	1
1.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	1
1.1.3 ไบโอสเซนเซอร์ (biosensor)	2
1.1.4 ความสำคัญในการประเมินปริมาณสารอนุมูลอิสระ	3
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	6
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
2.1 ความสำคัญในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ	8
2.2 เทคนิคในการประเมินปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วย	9
เทคนิค colorimetric assay	
2.2.1 วิธี Trolox Equivalent Antioxidant (TEAC) assay	9
2.2.2 วิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	10
radical scavenging capacity assay	
2.3 เทคนิคในการประเมินปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยปฏิกิริยา	10
ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	
2.3.1 Luminol based assay	10
2.4 เทคนิคในการประเมินปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี	11
บทที่ 3 การทดลอง	
3.1 อุปกรณ์	15
3.2 สารเคมี	15
3.3 วิธีการทดลอง	16
3.3.1 การเตรียมสารเคมี	16
3.3.2 การเตรียมสารละลายอนุภาคทองคำนาโน (gold nanoparticles)	17
3.3.3 การเตรียมไบโอสเซนเซอร์	19
3.3.3.1 การทำความสะอาดขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน	19
3.3.3.2 การโม่ติฟายด์ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน	19
3.3.5 ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรี	21
3.3.6 การเตรียมตัวอย่าง	21

สารบัญ (ต่อ)

3.3.6.1 ตัวอย่างพืช-ผักพื้นบ้าน	22
3.3.6.2 ตัวอย่างชา	22
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การศึกษาหองค์ประกอบที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์	23
4.2 การศึกษาหาชนิดของคาร์บอนนาโนทิวป์ที่เหมาะสมในการโมดิฟายด์ไบโอเซนเซอร์	24
4.3 การศึกษาเพื่อเพิ่มสภาพไวของไบโอเซนเซอร์โดยใช้อนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)	25
4.4 โซลลิกโวลแทมโมแกรมของสารต้านอนุมูลอิสระ	27
4.5 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น	28
4.5.1 ผลของ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือ	28
4.5.2 ผลของปริมาณคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันอะมิโน (CNT-NH ₂)	28
4.5.3 ผลของปริมาณอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)	29
4.5.4 ผลของปริมาณเอนไซม์แลคเคส (Lac)	30
4.5.5 ผลของปริมาณสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA)	31
4.5.6 ผลของปริมาณสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ (Glu)	32
4.6 การประยุกต์ใช้แลคเคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี (FI-laccase biosensor)	33
4.6.1 ศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม	33
4.6.2 ศึกษาหาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสม	34
4.7 คุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น	35
4.7.1 ศึกษาความเสถียรของไบโอเซนเซอร์	35
4.7.2 ศึกษาช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง (linearity range)	36
4.7.3 การศึกษาผลของตัวรบกวน (Interference study)	38
4.8 การประยุกต์ใช้ระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่พัฒนาขึ้นในการวัด ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพืช-ผักพื้นบ้าน	38
4.8.1 ประเมินประสิทธิภาพของระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่พัฒนาขึ้น	38
4.8.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในตัวอย่างสารสกัดจากพืชผักพื้นบ้านและชา	40
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	42
เอกสารอ้างอิง	44



บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

ชื่อโครงการวิจัย ระบบวิเคราะห์ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วด้วยไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่

A high throughput screening method for assessing total antioxidant capacity using new biosensors

ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงิน 249,700 บาท

ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน/ปี) ตุลาคม 2553 ถึง (เดือน/ปี) กันยายน

2554

รายนามหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมดำเนินการวิจัย

1) ดร. มะลิวรรณ อมตธงไชย 2) น.ส. เสาวนีย์ เหล่าสิงห์ 3) นางรัตนพร ทิวะพล
ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ผศ.ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา

งานวิจัยนี้สนใจจะพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่ง่ายและสะดวกเพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาสมบัติของพืชสมุนไพร และผลไม้ชนิดต่าง ๆ ของไทยในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะเป็นเทคนิควิเคราะห์แบบอัตโนมัติในระบบ โฟลอินเจกชันอะนาไลซิส ที่อาศัยการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ (Flow injection analysis with amperometric detection on new biosensor) โดยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจะเป็น นาโนคอมโพสิตระหว่างคาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotube; CNT) และเอนไซม์แลคเคส โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีสภาพไวสูง (high sensitivity) มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็วขึ้น (rapid response) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) สามารถนำไปใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารอนุมูลอิสระแบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ ศึกษาและพัฒนาาระบบวิเคราะห์ที่รู้ผลเร็วสำหรับหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิส (Flow Injection Analysis) ที่ตรวจวัด ด้วยเทคนิค แอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้เป็นระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ สามารถวัดปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็ว ใช้สารเคมีและปริมาณตัวอย่างน้อย ในการพัฒนาแลคเคสไบโอเซนเซอร์ที่มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูงในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ จะใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่อะมิโน (CNT-NH₂) อนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) เอนไซม์แลคเคส (Lac) กับสารละลายโบลิวินซีรัมอัลบูมิน (BSA) และสารละลายกลูตาไรต์ไฮด (Glu) หรือขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu ใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีในการศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของ caffeic acid ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า คือ สารละลาย CNT-NH₂ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร AuNPs ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลายผสมระหว่าง Lac ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 % อัตราส่วน 20:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และสารละลาย Glu ความเข้มข้น 1 % ได้พัฒนาระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรดี โดยสัญญาณที่ได้จากการฉีด caffeic acid ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (จำนวน 20 ซ้ำ) ให้ค่า % R.S.D. เท่ากับ 3.09 สารต้านอนุมูลอิสระทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (caffeic acid, catechin, gallic acid และ chlorogenic acid) ให้กราฟมาตรฐานแบบเป็นเส้นตรง ชีดกำจัดในการตรวจวัดอยู่ระดับต่ำถึงพีพีเอ็ม วิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรไทยได้อย่างรวดเร็วถึง 29 ตัวอย่างต่อชั่วโมง เหมาะสมสำหรับใช้เป็น ระบบวิเคราะห์ที่รู้ผลเร็วสำหรับหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ในตัวอย่างจริงระบบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณของสารอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารสกัดจากผัก -พืชพื้นบ้านและชา

Key words: ไบโอเซนเซอร์, แลคเคส, สารต้านอนุมูลอิสระ, ระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิส, พืชสมุนไพร

Abstract

This work presents a high throughput screening (HTS) of antioxidant analysis system using flow injection analysis coupled with amperometric detection on the laccase-based biosensor. The development of amperometric detection on laccase based-biosensor in the flow injection system that enables rapid and automated determination for the total antioxidant capacity assay using minute amount of reagents and small sample volumes was focused. A sensitive and selective laccase biosensor using glassy carbon modified with composites of NH_2 functionalized carbon nanotube (CNT-NH_2), gold nano particles (AuNPs), laccase enzyme (Lac), bovine serum albumin (BSA) and glutaraldehyde (Glu) was developed for antioxidant assay. Reduction of caffeic acid was first studied at a developed biosensor, GC/ CNT-NH_2 /AuNPs/Lac+BSA/Glu, using cyclic voltammetry. Results indicated that the optimum condition for modified solution were CNT-NH_2 of 3 mg/mL, AuNPs of 10 μL , mixtures of 5 mg/mL laccase and 1% BSA of 20:1 (v/v), and 1 % Glu, respectively. Flow-injection analysis system with amperometric detection on the biosensor was developed for quantitation of antioxidants. The system provides an impressively good precision (%R.S.D. = 3.09) for 20 μL injections ($n = 20$) of 10 ppm caffeic acid. The linear calibration curves were observed for all tested antioxidants (caffeic acid, catechin, gallic acid and chlorogenic acid). The detection limits at a low ppm level were obtained. This method was successfully applied to evaluate antioxidant content in some plant extracts such as Thai indigenous herb with rapid sample throughput (29 samples/h). The developed flow injection-laccase biosensor is therefore suited for mass screening of real-world samples. This method was successfully applied to evaluate antioxidant contents in some plant extracts such as Thai indigenous vegetables/herbs and teas.

Key words: biosensor, laccase, antioxidant, flow injection analysis, herb

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

1.1.1 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular) , อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) , โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) รวมทั้งการแก่ก่อนวัย ริ้วรอย ฝ้า กระ จุดด่างดำ ซึ่งอนุมูลอิสระเกิดจากของเสียในกระบวนการสันดาปอาหารเพื่อให้ได้พลังงาน และปัจจัยภายนอกซึ่งเป็นผลเสียที่เกิดจากแสงแดดหรือสารพิษต่าง ๆ เห็นได้ว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติส่งผลให้เกิดสภาวะออกซิเดทีฟ สเตรส (oxidative stress) ขัดขวางการทำงานของเซลล์ในไขมัน โปรตีน หรือ DNA เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ โดยในภาวะที่ผิดปกติ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการ สะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง ก็คือระบบสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็สามารถชะลอหรือป้องกันการปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้

อนุมูลอิสระ (free radicals) อยู่ในกลุ่มของ Reactive Oxygen Species (ROS) เป็นโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยปกติแร่ธาตุต่างๆในร่างกายจะมีอิเล็กตรอนอยู่จนครบเป็นจำนวนคู่ ทำให้โมเลกุลมีความคงตัว ในกรณีที่มีการสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนมาอีกเพียง 1 ตัว จะทำให้โมเลกุลนั้นไม่คงตัว จึงต้องไปดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่น ซึ่งเป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ร่างกายจึงมีการสร้าง สารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเป็นกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านั้น

ตัวอย่างของอนุมูลอิสระชนิด Reactive Oxygen Species (ROS) ได้แก่

$O_2^{\cdot -}$	Superoxide anion	อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์
$OH^{\cdot}$	Hydroxyl radical	อนุมูลไฮดรอกซิล
$ROO^{\cdot}$	Peroxy radical	อนุมูลไฮเปอร์ออกซิ
H_2O_2	Hydrogen Peroxide	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ร่างกายมีกลไกที่จะกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ โดย 2 วิธี คือ ใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น Superoxide dismutase (SOD) และไมใช้เอนไซม์ ได้แก่ วิตามินอี (tocopherol) เบต้าแคโรทีน (beta carotene) และ วิตามินซี (ascorbic acid) เนื่องจากมีผู้สังเกตว่า เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้กำจัดอนุมูลอิสระ เช่น SOD มีได้จำกัด แต่สารที่เราสามารถหาเสริมได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเบต้าแคโรทีนมีมากในผัก และผลไม้บางชนิด จึงมีการสนับสนุนให้ทานสิ่งเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น โดยมีความเชื่อว่าอาจลดการก่อมะเร็ง ลดการเป็นโรคหัวใจ ขาดเลือด และโรคอื่น ๆ

1.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็สามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดออกซิเดชัน (oxidation) ของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ เป็นศัพท์ที่แปล

มาจากคำว่า antiradical ปัจจุบันได้ ถูกบัญญัติใหม่เป็นสารขจัดหรือกำจัดอนุมูล (radical scavenger) เพื่อให้ตรงกับหน้าที่การทำงาน และอาจใช้คำว่า “สารแอนติออกซิแดนท์” แทน อย่างไรก็ตามในภาษาไทยยังคงใช้คำว่าสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ [1] ชนิดและโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารแสดงดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ชนิดและโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหาร [2]

Compound	Substituent	Structure
Benzenes		
Catechol	1,2-OH	
Resorcinol	1,3-OH	
<i>p</i> -Hydroquinone	1,4-OH	
Pyrogallol	1,2,3-OH	
Benzoic acid		
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	4-OH	
Vanillic acid	3-OCH ₃ ; 4-OH	
Syringic acid	3,5-OCH ₃ ; 4-OH	
Gallic acid	3,4,5-OH	
Cinnamic acids		
<i>p</i> -Coumaric acid	4-OH; R = H	
Ferulic acid	3-OCH ₃ ; 4-OH; R = H	
Caffeic acid	3,4-OH; R = H	
Chlorogenic acid	3,4-OH; R = quinic acid	
Rosmarinic acid (a)		
Flavans		
(+) - Catechin	3,5,7,3',4'-OH	
(-) - Epicatechin	3,5,7,3',4'-OH	
Flavonols		
Quercetin	3,5,7,3',4'-OH	
Morin	3,5,7,2',4'-OH	
Rutin	5,7,3',4'-OH; 3-rutinoside	
Kaempferol	3,5,7,4'-OH	
Flavones		
Apigenin	5,7,4'-OH	
Luteolin	5,7,3',4'-OH	
Flavonones		
Naringenin	5,7,4'-OH	
Hesperetin	5,7,3'-OH; 4'-OCH ₃	
Tannin		
Ellagic acid (b)		

1.1.3 ไบโอเซนเซอร์ (biosensor)

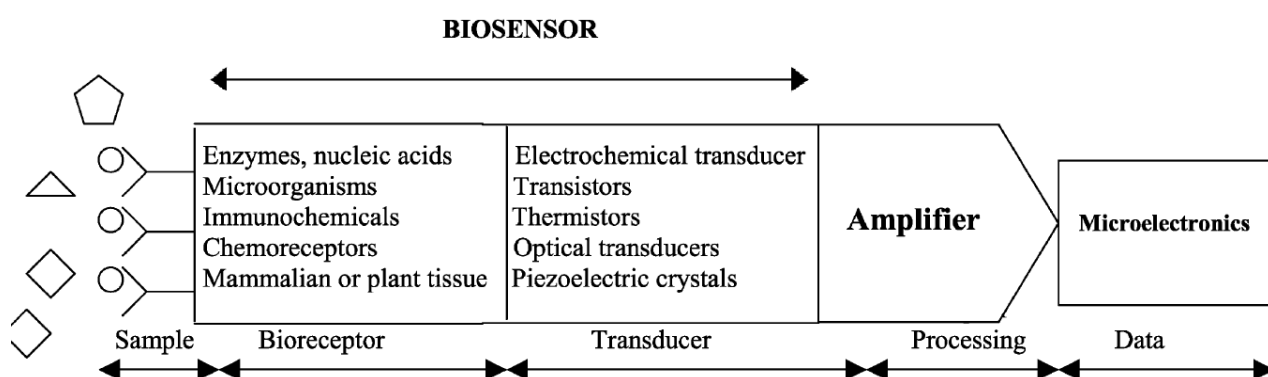
ไบโอเซนเซอร์ เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณของสารใดๆ โดยใช้สัญญาณที่ได้จากการเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า คุณสมบัติเด่นของไบโอเซนเซอร์คือ มีความเฉพาะเจาะจง (selectivity) และความไว (sensitivity) สูงเมื่อเทียบกับเทคนิคการตรวจวัดชนิดอื่น ๆ เช่น ยูวี - วิสเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Vis spectrophotometry) ความจำเพาะของไบโอเซนเซอร์เป็นผลมาจากความจำเพาะของไบโอรีเซพเตอร์ ที่ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะระหว่างตัวถูกวิเคราะห์กับไบโอรีเซพเตอร์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพ เช่น การผลิตไอออน, อิเลคตรอน, การผลิตและการใช้แก๊สความร้อน การเปลี่ยนแปลงมวลสมบัติของสีหรือแสง ซึ่ง

การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ที่เหมาะสม จึงเป็นการลดขั้นตอนยุ่งยากและสารเคมีที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์

ไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1) ส่วนของสารทางชีวภาพ (biomaterials) ที่ทำหน้าที่จดจำ (recognition) หรือเลือกเฉพาะ (selection) สารตัวอย่างที่จะทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีอย่างจำเพาะ ส่วนที่ 1 นี้จะถูกตรึง (immobilization) อยู่บนผิวหน้าของส่วนที่ 2

2) ทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งทรานสดิวเซอร์นี้จะทำหน้าที่ในการส่งผ่านสัญญาณดังกล่าวไปยังส่วนประมวลผล (processor) เพื่อวัดหรือแสดงสัญญาณให้เราได้ทราบ (signal elaboration) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการวัดสัญญาณและแปรค่าออกมาเป็นหน่วยต่างๆ ที่ต้องการ โดยอะแกรส่วนประกอบของ ไบโอเซนเซอร์แสดงได้ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ขั้นตอนในการตรวจวัดสารที่สนใจ (analytes) ด้วยไบโอเซนเซอร์ [3]

เอนไซม์ (Enzyme) เป็นชีวโมเลกุล ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาชีวภาพที่สังเคราะห์โดยเซลล์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่จำเพาะ โดยการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยาชีวเคมีที่แน่นอน ภายใต้สภาวะที่อ่อนโยน ข้อดีของตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพเหนือตัวเร่งปฏิกิริยาอนินทรีย์ คือ มีความจำเพาะเจาะจงสูงและอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ สามารถละลายน้ำได้ดี สามารถสลายตัวได้ สามารถทำซ้ำภายใต้สภาวะการทดลองปกติ ในสภาวะความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง

1.1.4 ความสำคัญในการประเมินปริมาณสารอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระมีที่มาจากทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ภายในเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ ส่วนภายนอกได้แก่ มลพิษจากสิ่งแวดล้อม ควันบุหรี่ รังสี หรือแสงแดด อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่คงตัวจึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ของร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นไขมัน โคเลสเตอรอล กรดไขมันไม่อิ่มตัว โปรตีน และสารพันธุกรรมของร่างกาย จึงทำให้โครงสร้างและบทบาทการทำงานของสารชีวโมเลกุลนี้มีความผิดปกติไป และสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเนื่องจากสารชีวโมเลกุลหนึ่งไปยังสารชีวโมเลกุลอื่นจนเกิดอนุมูลอิสระใหม่เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ ทำให้เกิดสภาวะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ อาจถูกทำลายได้ในที่สุด ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอ และทำให้มีการสร้างยีนที่ผิดปกติอาจทำให้เกิดกลายเป็นเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ มากมาย เช่น โรค

เกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular) อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พาร์กินสัน (Parkinson's disease) หรือแม้แต่การแก่ก่อนวัย (aging) [4-6]

ในคนปกติร่างกายจะมีระบบสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กลุ่มของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ catalase เป็นต้น และกลุ่ม metal-binding protein ได้แก่ ferritin, ceruloplasmin, transferrin และ uric acid [4] เพื่อรักษาระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับสมดุล แต่ถ้าในสภาวะที่ระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระไม่อยู่ในระดับสมดุล คือมีปริมาณของสารอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ สภาวะเช่นนี้เรียกว่า เกิด “สภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress)” ซึ่งการมีอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องที่เป็นผลิตภัณฑ์ของสารอนุมูลอิสระที่มีความไวและอันตรายสูงมากเกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะต้านทานไว้ได้ จะก่อให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล (ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและสารพันธุกรรม) เป็นอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ [1, 7]

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในสมุนไพร ผัก และผลไม้ ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และวิตามินชนิดต่างๆ สารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกได้แก่ flavonoids, flavones, gallic acid, ellagic acid, anthocyanins, carotenoids และอนุพันธ์ของ cinnamic acid [8] สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สรรพคุณทางยา คือ ลดการอักเสบ ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านโรคมะเร็ง และมะเร็ง [1,9] สารต้านอนุมูลอิสระอีกชนิดที่พบในผักผลไม้ และสมุนไพรได้แก่ วิตามินชนิดต่างๆ เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินเอ (β -carotene) และวิตามินอี (α -tocopherol) วิตามินซีเป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้ดี มีสรรพคุณทางยา คือ ช่วยในการสังเคราะห์คอลลาเจน ช่วยในการสลายโคเลสเตอรอล ลดการอักเสบ และต้านมะเร็ง [10] ร่างกายไม่สามารถสร้างวิตามินชนิดนี้ได้ จึงจำเป็นต้องได้จากการรับประทานเข้าไป อาหารที่มีวิตามินซีสูง ได้แก่ ผักสด ผลไม้สด ที่มีรสเปรี้ยว

โครงการวิจัยนี้สนใจจะพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่ง่ายและสะดวกเพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาสมบัติของพืชสมุนไพร และผลไม้ชนิดต่าง ๆ ของไทยในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะเป็นเทคนิควิเคราะห์แบบอัตโนมัติในระบบที่มีการไหล ที่อาศัยการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ (Flow injection analysis with amperometric detection on new biosensor) โดยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจะเป็น nano composite ระหว่างคาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotube; CNT) และเอนไซม์แลคเคส โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีสภาพไวสูง (high sensitivity) มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็วขึ้น (rapid response) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) สามารถนำไปใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารอนุมูลอิสระแบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์

1) ศึกษาและพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อหาค่าประกอบของ นาโนคอมโพสิต และเอนไซม์ที่เหมาะสมในไบโอเซนเซอร์ เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ 7 ชนิดที่สนใจ ได้แก่ catechin, caffeic acid, trolox, cinnamic acid, quercetin, rutin และ gallic acid

2) ศึกษาถึงผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อสภาพไวของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น pH ของสารละลาย, เทคนิคในการตรึง (immobilize) เอนไซม์แลคเคสลงบน nano composites, ปริมาณของ CNT ที่ใช้ในการโมดิฟายด์, ปริมาณของเอนไซม์แลคเคส, ปริมาณสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA) ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็น biocatalyst ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็วขึ้น และมีความจำเพาะเจาะจงสามารถนำไปใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารอนุมูลอิสระแบบแอมเพอร์โรเมทรีได้

3) ออกแบบและพัฒนาเทคนิควิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่ว ไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารอนุมูลอิสระ เพื่อให้เป็นวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติอย่างรวดเร็วในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะเป็นเทคนิควิเคราะห์แบบโพลินเจกชันที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ (Flow injection technique with amperometric detection on new biosensor) ซึ่งมีการตอบสนองที่รวดเร็ว (high response) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity)

4) ประเมินคุณลักษณะของเทคนิคในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วที่ชั่วไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการเปรียบเทียบการนำไปใช้ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระกับเทคนิคมาตรฐาน

5) ประยุกต์เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในตัวอย่างสารสกัดจากผัก พืชสมุนไพร และผลไม้ ประมาณ 20 ชนิด เช่น ผักตบชวา ผักแว่น ผักหวาน สะเดา ผักทอง หลาก ผักอีหล้า สมอไทย ลูกหว้า ฯลฯ เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้เป็นฐานข้อมูลในการบ่งชี้ว่าผัก สมุนไพรและผลไม้ชนิดใดบ้างในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีองค์ประกอบหลักที่เป็นสาร phenolic compounds และมีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระสูง และพืชผักชนิดใดบ้างที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ปรุงอาหารหรือนำไปบริโภคเพื่อเป็นอาหารสุขภาพ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เมื่อทำงานวิจัยเสร็จแล้วผลที่คาดว่าจะได้รับคือ

1. ได้ไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่มีสภาพไว และความจำเพาะเจาะจงสูง ที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ ที่พัฒนาขึ้นจากการ immobilize เอนไซม์ลงบน nano composites ให้เป็น biocatalyst ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำ ๆ โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมขึ้นมา นี้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง

2. ได้ระบบวิเคราะห์แบบใหม่ที่เป็นเทคนิคอัตโนมัติที่รวดเร็ว (high throughput) สามารถนำไปใช้ในการคัดกรอง หรือ วิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเช่น polyphenols, phenolic acid, flavan และ flavonols ในตัวอย่างพืชสมุนไพรอย่างรวดเร็ว

3. ได้องค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาศักยภาพไบโอเซนเซอร์ เพื่อนำมาใช้ เป็นเครื่องมือในการสกรีนนิ่งหาพืช ผักสมุนไพรที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูง เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของพืชผักสมุนไพรของไทย เช่น ผักตบชวา ผักแพ้ว ตะขบ ฯลฯ รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้กับผู้สนใจที่ต้องการนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นไปพัฒนาไบโอเซนเซอร์ให้มีประสิทธิภาพ และ /หรือสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อขนาดให้ระบบวิเคราะห์มีขนาดเล็กลงได้ (miniaturize)

4. เพื่อจัดทำฐานข้อมูลและเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับประเภทและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในพืชสมุนไพรไทย หน่วยงานที่คาดว่าจะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ คณะวิทยาศาสตร์ และ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) หรือผลิตภัณฑ์สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำมาจากพืชสมุนไพรไทย ผลงานที่ได้พัฒนาขึ้นจะถูกถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการนำผลการทดลองที่ได้ไปแสดงหรือบรรยายในที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ หรือนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ใน

5. เพิ่มขีดความสามารถและความเข้มแข็งของทีมนักวิจัยไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทีมนักวิจัยในระดับภูมิภาคให้ทัดเทียมกับระดับนานาชาติ

6. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป กลุ่มเป้าหมายได้แก่ คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) หรือผลิตภัณฑ์สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำมาจากพืชสมุนไพรไทย

7. เป็นส่วนหนึ่งในการส่งเสริมการเรียนการสอนและวิจัยในระดับปริญญาโท-เอก ในระดับภูมิภาค โดยเฉพาะในมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้สนใจจะพัฒนาเทคนิคและวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่รวดเร็ว เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อใช้ในการศึกษาสมบัติของพืชสมุนไพร และผลไม้ชนิดต่าง ๆ ของไทยในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะเป็นเทคนิควิเคราะห์แบบอัตโนมัติในระบบที่มีการไหลที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ชีวไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ (Flow injection analysis with amperometric detection on new biosensor) โดยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจะเป็น nano composite ระหว่างคาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotube; CNT) และเอนไซม์แลคเคส โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีสภาพไวสูง (high sensitivity) มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็วขึ้น (rapid response) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) สามารถนำไปใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารอนุมูลอิสระแบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการกลั่นกรองคัดสรรหรือสกรีนนิ่ง (screening) หาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็วว่าพืชสมุนไพรไทย และ ผลไม้ไทยในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือใดบ้างที่มี ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง

ดังนั้นจึงคาดว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถนำมาใช้ในการกลั่นกรองคัดสรรหรือสกรีนนิ่ง หาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ โดยใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์อย่างรวดเร็วในการตรวจหาพืชผักที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง พืชสมุนไพรและผลไม้ที่สนใจคือพืชพรรณที่มีอยู่ทั่วไปในภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ผักต้ว ผักแว่น ผักหวาน สะเดา ผักทองกลาง ผักอีหล้า สมอไทย ลูกหว้า ฯลฯ เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับประเภทและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรในแถบภาค ตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อนำมาใช้ในการสกัดเพื่อให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระแทนการสังเคราะห์ต่อไป หรือใช้เป็น แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระในการนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา เทคนิคที่พัฒนาขึ้นยังสามารถนำไป ประยุกต์ใช้ในการตรวจหาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย ซึ่งหากค้นพบแหล่ง ผลิตผลการเกษตรใดที่เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก ๆ ก็จะสามารถนำไปประชาสัมพันธ์ได้อีกด้วย ทำให้ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าไทยด้วย นอกจากนี้ เทคนิคที่พัฒนาขึ้นยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการ ประเมินหาสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารสุขภาพต่าง ๆ และสามารถนำข้อมูลเหล่านี้เป็นฐานข้อมูลในการบ่งชี้ว่า อาหารสุขภาพชนิดใดที่มีความเหมาะสมในการนำไปบริโภค

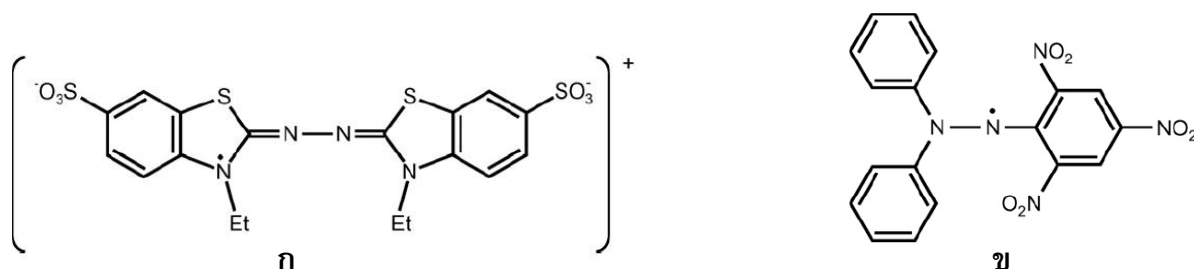
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ความสำคัญในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

การประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพร ผัก ผลไม้ มีความสำคัญและมีผู้ให้ความสนใจทำการวิจัยเป็นจำนวนมาก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาพืชที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นฐานข้อมูลในการบ่งชี้ว่าสมุนไพรและผลไม้ชนิดใด ที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ปรุงอาหารหรือนำไปบริโภคเพื่อเป็นอาหารสุขภาพ การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินเอ หรือสารประกอบฟีนอลิก [8] แต่ในความเป็นจริงสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างหนึ่งๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายๆ ชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งรวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่ทราบว่าเป็นสารชนิดใดแน่นอน และสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าเป็นสารใด ดังนั้นการที่จะประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดและแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างจึงเป็นการยากและไม่จำเป็น เพราะโดยความเป็นจริงแล้วเมื่อมีสารผสมกันหลายชนิดในอาหาร เครื่องดื่ม หรือวิตามิน สิ่งที่เราควรสนใจตรวจวัดควรจะเป็นการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidant capacity, TAC) มากกว่าที่จะต้องวิเคราะห์จนระบุชี้ชัดว่าเป็นสารใด ซึ่งการวัดเป็น TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า [11]

ในการวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไป มักจะมีการสร้างหรือเตรียมสารอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจวัด โดยวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือก็ได้ สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น สารประกอบกลุ่มเอโซโซ $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) [12] ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 2.1ก หรือ สารอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [13] รูปที่ 2.1ข สารอนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่ใช่สารที่มีอยู่ในธรรมชาติ เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาเลียนแบบอนุมูลอิสระพวก Reactive Oxygen Species (ROS) หรือ Reactive Nitrogen species (RNS) ที่พบในร่างกาย



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารอนุมูลอิสระ (ก) $ABTS^{\bullet+}$ [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)] และ (ข) $DPPH^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [14]

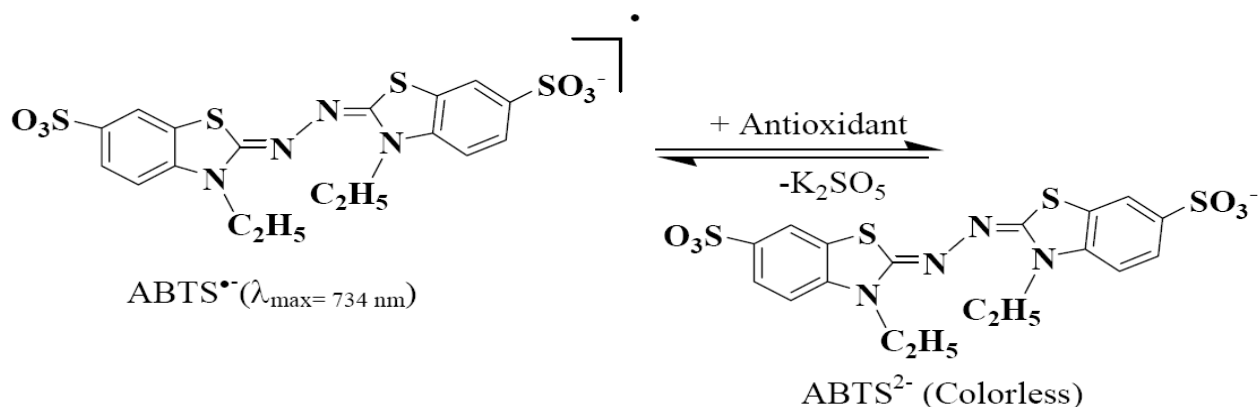
ได้มีการพัฒนาเทคนิควิเคราะห์หลายเทคนิคขึ้นมาเพื่อใช้ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพร ผัก ผลไม้

2.2 เทคนิคในการประเมินปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค colorimetric assay

การวิเคราะห์ค่า TAC ด้วยเทคนิค colorimetric assay โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง หรือขจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจวัด โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือ สารที่นิยมใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระมักจะใช้สารประกอบ ที่มีสี และวัดการลดลงของสีเพื่อประเมินหาค่า TAC

2.2.1 วิธี Trolox Equivalent Antioxidant (TEAC) assay

รายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1993 โดย N. J. Miller [12] และได้พัฒนาต่อมาโดยกลุ่มของ Re-R Pellegrini [15] เทคนิคนี้จะใช้ตัว $ABTS^{\bullet+}$ ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา persulfate oxidation ของสาร 2, 2'-azinobis (3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) เป็นตัว oxidant โดยจะใช้สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mmol ทำปฏิกิริยากับกับ potassium persulfate จากนั้นนำไปทำให้เจือจางด้วย ethanol แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือค่าแอมซอร์แบนซ์ที่ความยาวคลื่น 734 nm ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง $0.7 (\pm 0.02)$ ปีเปตสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เจือจางปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวต เติมนีแทนอลปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ในคิวเวตเก็บไว้ในที่มืด 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ($A_{Control}$) ปฏิกิริยาระหว่าง $ABTS^{\bullet+}$ และสารต้านอนุมูลอิสระดังแสดงในรูปที่ 2.2 สร้างกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (trolox) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ (50, 100 และ 200 พีพีเอ็ม) โดยใช้สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์แทนเมทานอล ($A_{Measure}$) คำนวณหาค่า %ABTS radical cation scavenging activity โดยใช้สมการที่ 1 และนำค่า %ABTS radical cation scavenging activity มาพล็อตกับความเข้มข้นของโทรลอกซ์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

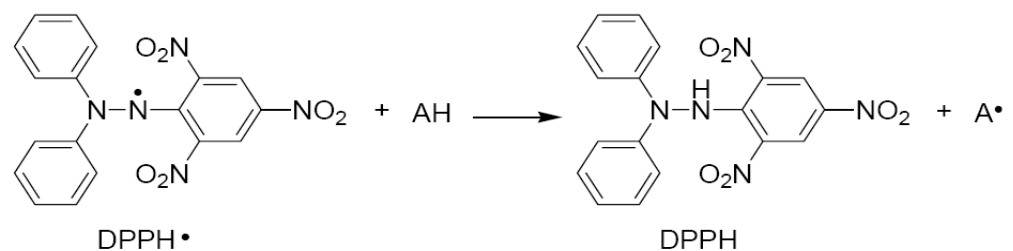


รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาแสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค Trolox Equivalent Antioxidant (TEAC) assay

$$\%ABTSradical\ cation\ scavenging\ activity = \left[\frac{A_{Control} - A_{Measure}}{A_{Control}} \right] \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

2.2.2 วิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay

เทคนิคนี้จะใช้สารอนุมูลอิสระที่มีชื่อว่า 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่ง DPPH เป็นสารที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 nm เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ค่าแอมซอร์แบนซ์ที่วัดได้มีค่าลดลง ปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH radical scavenging capacity assay เมื่อ AH คือสารต้านอนุมูลอิสระ

ค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า $\%DPPH_{rem}$ และสามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 2

$$\%DPPH_{rem} = \frac{100 \times [DPPH]_{rem}}{[DPPH]_{T=0}} \quad (2)$$

ความแรงของสารต้านอนุมูลอิสระจะรายงานด้วยค่า EC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% [16]

2.3 เทคนิคในการประเมินปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.3.1 Luminol based assay

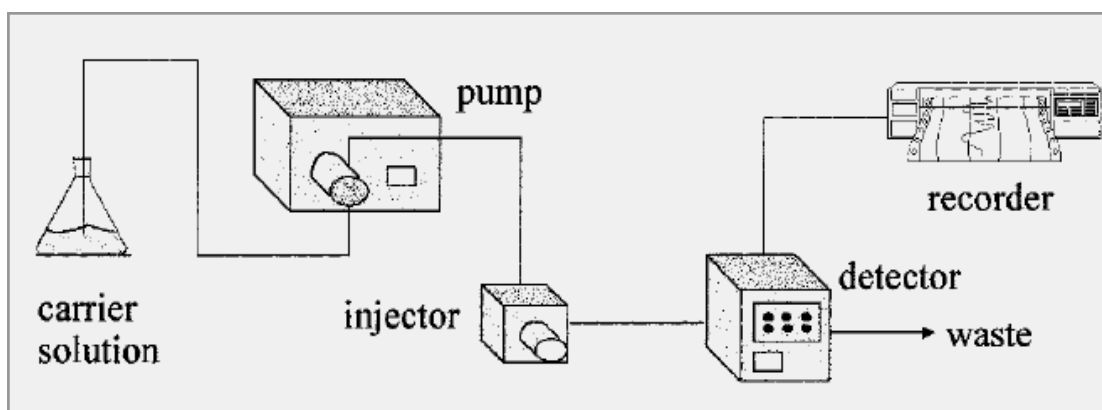
ในปี ค.ศ. 2003 T. Toyo'oka และคณะ [17] ได้พัฒนาเทคนิคในการประเมินหาสารต้านอนุมูลอิสระแบบออนไลน์ดีเทกชัน (on-line detection) โดยจะตรวจวัดแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์ (chemiluminescence) ของสาร luminol กับ hydrogen peroxide โดยสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อผ่านการแยกด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แล้วจะถูกพาออกมาผ่านระบบตรวจวัด การลดลงของแสงจากปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ

S. Girotti และคณะ [18,19] ได้เสนอเทคนิคการวิเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์ของสาร luminol ที่มี horseradish peroxidase เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งปฏิกิริยาการเกิดแสงเกิดจากการเกิด free radical ระบบวิเคราะห์ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระฯ

และการลดลงของแสงจากปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งถึงแม้ว่าวิธีนี้จะมีข้อดีเรื่องความถูกต้องของค่าที่วัดได้ แต่เนื่องจากปฏิกิริยาต้องใช้เอนไซม์ในการทำให้เกิดแสง เทคนิคนี้จึงมีข้อด้อยในเรื่องของสารรบกวน

2.4 เทคนิคในการประเมินปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี

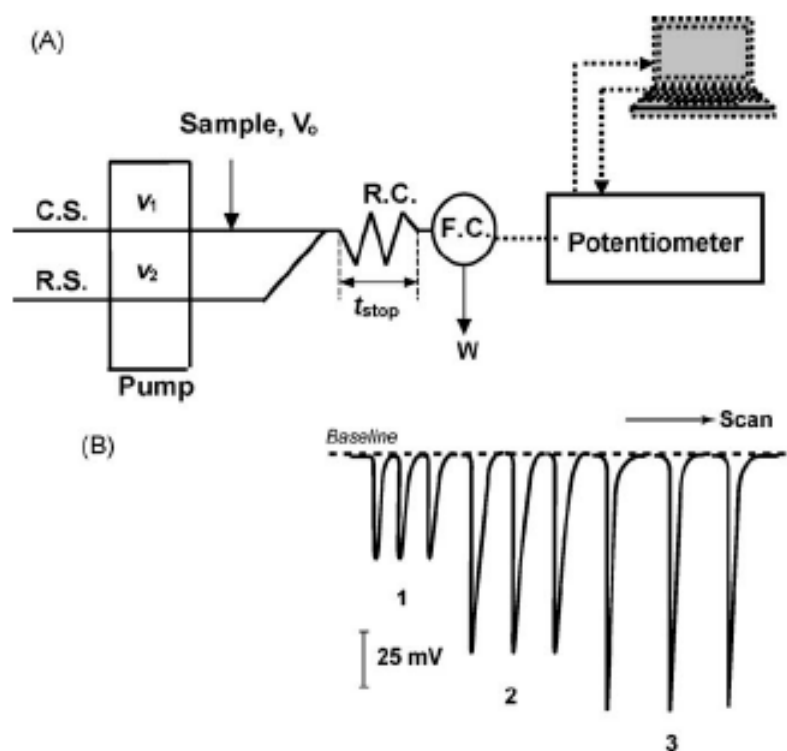
ในปี ค.ศ. 2001 S. Buratti และคณะ [20] ได้เสนอเทคนิค flow injection system ที่มีตัวตรวจวัดแบบเคมีไฟฟ้าในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกส์ (phenolic compounds) (รูปที่ 2.4).



รูปที่ 2.4 ระบบ flow injection analysis ที่มีตัวตรวจวัดแบบเคมีไฟฟ้าในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ [21].

ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้จะวัดแบบเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี โดยใช้ ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (glassy carbon electrode) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน วัดค่ากระแสที่ค่าศักย์ไฟฟ้า +0.5 V (เทียบกับ Ag/AgCl) เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดีอย่างสารสกัดจากพืช

ในปี ค.ศ. ในปี ค.ศ. 2006 L.K. Shpigun และคณะ [21] ได้เสนอเทคนิค flow injection system ที่มีตัวตรวจวัดแบบเคมีไฟฟ้าชนิดโพเทนชิโอเมทริกในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในสารสกัดจากพืช (รูปที่ 2.5) สัญญาณของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมที่ได้จากการตรวจวัดที่ใช้ flow-type platinum electrode แสดงดังรูป B เมื่อใช้สารละลาย carrier เป็น $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$



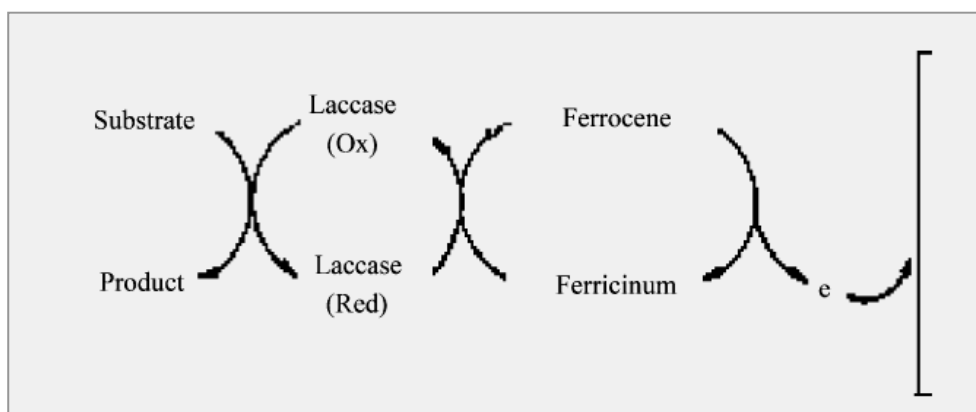
รูปที่ 2.5 (A) ระบบ flow injection ที่มีตัวตรวจวัดแบบ potentiometric method ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (B) ตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการวัดสารปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นต่าง ๆ [21].

ในปี ค.ศ. 2004 A. Jarosz-Wilkolazka และคณะ [22] ศึกษากระบวนการใช้เอนไซม์แลคเคสชนิด *Cerrena unicolor* มาโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้าใช้งานชนิดกราไฟต์ และใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระ พวก flavonoids ในสารสกัดจากพืชด้วยเทคนิคการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรี การเตรียมไบโอเซนเซอร์ทำได้โดย หยดเอนไซม์แลคเคสลงบนขั้วไฟฟ้ากราไฟต์เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เมื่อแห้งแล้วล้างด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) แล้วจุ่มใน citrate buffer pH 5.0 เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น caffeic acid, prodelphinidin B3, catechin, epicatechin gallate และ epicatechin ได้

ในปี ค.ศ. 2005 J. J. Roy และคณะ [23] ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์มาใช้ในการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลโดยอาศัยการเกิด Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) ของ laccase ใช้ขั้วไฟฟ้าทองเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (Clark's electrode) สามารถเตรียมขั้วไฟฟ้าได้โดย ผสม CLEC กับ 30% polyvinylpyrrolidone (PVP) gel ใน cellophane membrane ทำให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที แล้วติดบนขั้วไฟฟ้าใช้งาน สามารถตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น 2-amino phenol, guaiacol, catechol, catechin, pyrogallol และ ABTS(non-phenolic) โดยสามารถตรวจวัดสารประกอบฟีนอลที่ความเข้มข้น 50-1000 μmol ได้

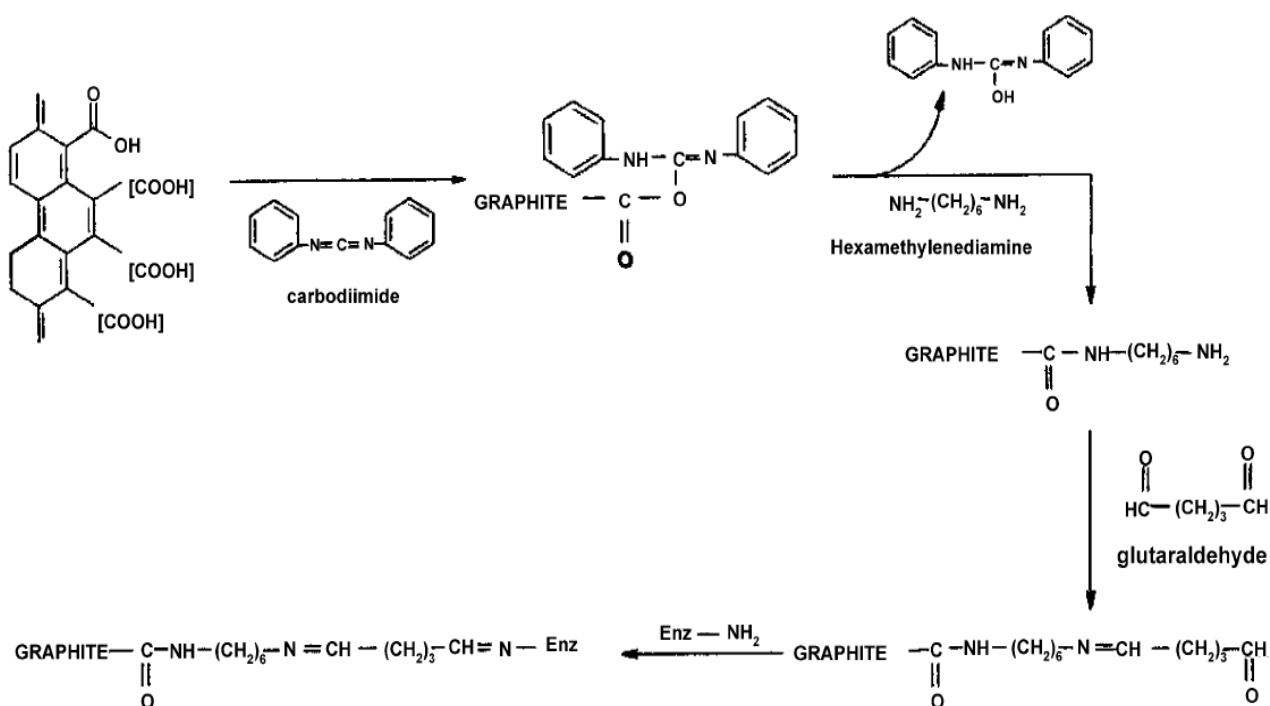
ในปี ค.ศ. 2007 D. Odaci และคณะ [24] ศึกษาการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกส์ โดยใช้เอนไซม์แลคเคสชนิด *Trametes versicolor* มาโมดิฟายด์เป็นไบโอเซนเซอร์ 2 ชนิด โดยใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานชนิด oxygen electrode (Clark's electrode) และ ferrocene-modified screen-printed graphite electrode สำหรับขั้นตอนการเตรียมไบโอเซนเซอร์จากขั้วไฟฟ้าทั้ง 2 ชนิด เตรียมโดยผสม 10 mg gelatin ลงในสารละลาย laccase 250 μ L (สารละลายแลคเคสความเข้มข้น 4 U ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 50 mM) เขย่าให้ผสมกัน 2-3 นาที (38 °C) นำสารละลายที่ได้มาหยดลงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 45 นาที จุ่มใน 2.5% กลูตารัลดีไฮด์ (ความเข้มข้น 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5) เป็นเวลา 5 นาที จะได้ไบโอเซนเซอร์ 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 พัฒนามาจาก oxygen electrode และ ชนิดที่ 2 มาจาก ferrocene-modified screen-printed graphite electrode ในอิเล็กโทรดชนิดที่ 2 การใช้ ferrocene เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอนมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยาแสดงได้ดังรูปที่ 2.6

ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น [24] สามารถใช้สำหรับตรวจวัด phenolic compounds 3 ชนิดได้แก่ caffeic acid, ferulic acid และ syringic acid และสามารถนำมาใช้ได้ในตัวอย่าง human plasma



รูปที่ 2.6 หลักการในการทำงานของ ferrocene-mediated laccase biosensor [24]

ในปี ค.ศ. 2006 M. Portaccio และคณะ [25] ได้ศึกษาและพัฒนาไบโอเซนเซอร์ 3 ชนิด โดยใช้เอนไซม์แลคเคสชนิด *Trametes versicolor* มาโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้าชนิดกราไฟต์ โดยชนิดแรก (type A electrode) โมดิฟายด์โดยใช้กระบวนการแอดซอร์พชัน (adsorption) ส่วนชนิดที่สองและสามจะโมดิฟายด์โดยใช้พันธะโควาเลนต์ผ่านหมู่ carboxylic ที่สร้างขึ้นที่ขั้วไฟฟ้าชนิดกราไฟต์และใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์และ hexamethylenediamine เป็น coupling agent โดยชนิดที่สอง (type B electrode) โมดิฟายด์โดยใช้พันธะโควาเลนต์ผ่านหมู่ carboxylic ที่สร้างขึ้นด้วยกระบวนการ electric potential difference และชนิดที่สาม (type C electrode) โมดิฟายด์โดยใช้พันธะโควาเลนต์ผ่านหมู่ carboxylic ที่สร้างขึ้นด้วยกรดไนตริก ปฏิกิริยาที่ใช้ในการโมดิฟายด์ไบโอเซนเซอร์ชนิดที่สองและสามแสดงได้ดังรูปที่ 2.7 จากผลการศึกษาเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของไบโอเซนเซอร์ทั้ง 3 ชนิด [16] พบว่าไบโอเซนเซอร์ชนิดที่สามให้สัญญาณที่มีสภาพไวที่สุดและมีความเสถียรสูงที่สุด มีเสถียรภาพ (stability days) นานถึง 60 วัน และเมื่อนำมาทดสอบใช้งานในระบบ flow injection analysis สามารถใช้ในการตรวจวัด catechol ได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.1 mM



รูปที่ 2.7 กระบวนการตรึงเอนไซม์ในไบโอเซนเซอร์ชนิดที่สองและสาม (type B และ type C electrode) [25]

M. Gamella และคณะ [26] (2006) ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยใช้กลูตาไรลดีไฮด์ในกระบวนการตรึงให้เอนไซม์แลคเคสเกิดพันธะ (cross-linking) บนขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน เพื่อนำมาใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม โดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีทั้งในระบบแบบแบทช์ (batch) และในระบบเอฟไอเอ (flow injection analysis) ในการเตรียมไบโอเซนเซอร์จะใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคสชนิด *Trametes versicolor* ความเข้มข้น $1.18 \text{ U}/\mu\text{L}$ ปริมาตร $6 \mu\text{L}$ มาโม่ตีฟายด์บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน ที่ไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่เตรียมได้มาจุ่มในสารละลาย 25% กลูตาไรลดีไฮด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน และได้ศึกษาหาช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับไบโอเซนเซอร์และความเสถียร (stability) ของไบโอเซนเซอร์ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบข้อดี -ข้อเสียกับไบโอเซนเซอร์ก่อนและหลังการโม่ตีฟายด์ ในการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมในตัวอย่างไวน์สามารถตรวจวัดโดยเทียบกับ caffeic acid

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 อุปกรณ์

งานวิจัยนี้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลองดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือ-อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
Potentiostat, e-Corder	EA161, 210	eDAQ, Australia
Data System	e-Chem	eDAQ, Australia
Working electrode	Glassy carbon electrode (3 mm)	CH Instruments, USA
Reference electrode	Ag/AgCl electrode (3 M KCl)	CH Instruments, USA
Auxiliary electrode	Pt wire	CH Instruments, USA
Thin layer flow cell	CHI 130	CH Instruments, USA
Flow meter	100624-103	Kofloc, Japan
Injector	20 μ L injection loop	Rheodyne, USA.
Pump	LC-10AD	Shimadzu, Japan

3.2 สารเคมี

ที่ใช้ในการทดลองในงานวิจัยนี้ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารเคมี เกรด และบริษัทผู้ผลิตสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

Chemical and reagent	Grade	Supplier
Laccase from <i>Trametes versicolor</i> (22.4 U/mg)	AR	Fluka
Gold colloid solution (particle size: 20 nm)	AR	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin (BSA)	AR	Sigma-Aldrich

ตารางที่ 3.2 สารเคมี เกรด และบริษัทผู้ผลิตสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ).

Chemical and reagent	Grade	Supplier
Citric acid	AR	Reagent
Dimethyl formamide (DMF)	AR	Kemika
Glutaraldehyde (Glu) (50%)	Photographic	Kemika
Catechin	AR	Sigma
Caffeic acid	AR	Sigma
Gallic acid	AR	Sigma
Chlorogenic acid	AR	Sigma
Multi-walled carbon nanotube (CNT)	95% pure	Nanolab inc. (MA, USA)
NH ₂ functionalized carbon nanotube (CNT-NH ₂)	95% pure	Nanolab inc. (MA, USA)
COOH functionalized carbon nanotube (CNT-COOH)	95% pure	Nanolab inc. (MA, USA)
di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na ₂ HPO ₄)	AR	Carlo Erba
Chitosan (CS)	Medium molecular weight, 78-85% de-acetylated	Sigma-Aldrich

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารเคมี

สารละลายแลคเคส เตรียมโดยชั่งเอนไซม์แลคเคส 25 mg ละลายด้วย citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 5.0 ปริมาตร 1 mL จะได้เป็นสารละลายแลคเคส 560 U/mL

สารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน เตรียมโดยปิเปตโบวินซีรัมอัลบูมินมา 100 μ L ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 10 mL จะได้ 1% โบวินซีรัมอัลบูมิน

สารละลายคาร์บอนนาโนทิวป์ เตรียมโดยชั่งคาร์บอนนาโนทิวป์ 3.0 mg เติมสารละลายไตรเมทิกฟอรัมมายด์ ปริมาตร 1 mL นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 1% เตรียมโดยชั่งไคโตซาน 1.00 กรัม ละลายด้วย acetic acid ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10 mL กวนจนไคโตซาน ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

สารละลาย citric acid ความเข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยนำ citric acid มา 5.2500 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตรเล็กน้อยเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL ปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำ DI เก็บไว้ในขวดแก้ว เก็บสารขนาด 250 mL กำหนดให้เป็นสารละลาย A

สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 M เตรียมโดยนำ Na_2HPO_4 มา 8.9000 กรัมละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตรเล็กน้อยเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL ปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำ DI เก็บไว้ในขวดแก้วเก็บสารขนาด 250 mL กำหนดให้เป็นสารละลาย B

สารละลาย CITRATE BUFFER pH 5.0 เตรียมโดยนำ สารละลาย A ปริมาตร 49 mL ผสมกับ สารละลาย B ปริมาตร 51 mL จะได้สารละลาย citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 5.0 ปริมาตร 100 mL ที่ใช้สำหรับการทดลอง

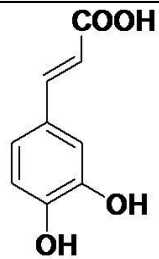
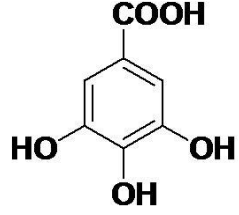
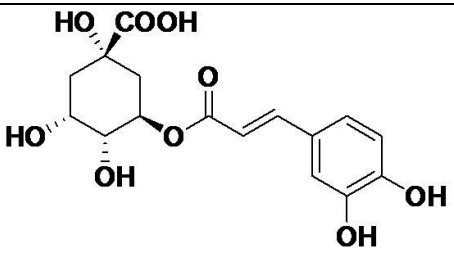
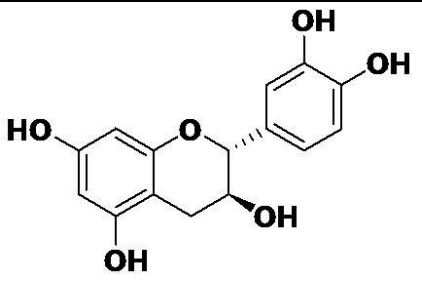
สารต้านอนุมูลอิสระ ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ มี 4 ชนิดดังนี้ แสดงดังนี้ caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid และ catechin สูตรโครงสร้างแสดงดังตารางที่ 3.3

สารละลาย สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เตรียมโดยนำสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานเช่น catechin 0.100 กรัม ใส่ในปิกรอร์ขนาด 50 mL ละลายด้วยสารละลาย 60% เอทานอลปริมาตรเล็กน้อย เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย 60% เอทานอลจนถึงขีด จะได้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน catechin ความเข้มข้น 1,000 ppm

สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ เตรียมโดยปิเปต 50% glutaraldehyde 250 μL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 5 mL จะได้ 2.5% glutaraldehyde ปริมาตร 5 mL

สารละลาย gold nanoparticles (AuNPs) ความเข้มข้น 0.01% เตรียมโดยปิเปตสารละลาย HAuCl_4 มา 10 μL เจือจางด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยน้ำ DI จากนั้นปิเปต สารละลาย HAuCl_4 มาปริมาตร 5 mL นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที พร้อมกวนตลอดเวลา จากนั้นเติม 1% Sodium Citrate ปริมาณ 170 μL ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125°C พร้อมกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 30 นาที จะได้ AuNPs ความเข้มข้น 10 mM

ตารางที่ 3.3 กลุ่มและสูตรโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

Groups	antioxidants	Structure
Polyphenol	Caffeic acid	
	Gallic acid	
	Chlorogenic acid	
Flavonoid	Catechin	

3.3.2 การเตรียมสารละลายอนุภาคทองคำนาโน (gold nanoparticles)

การเตรียมสารละลาย 10 mM HAuCl_4

ชั่ง Chloroauric acid (HAuCl_4) มา 0.0200 g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตรเล็กน้อยและเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้เป็น 10 mL ด้วยน้ำ DI

การเตรียมสารละลาย gold nanoparticles

สารละลายอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) ความเข้มข้น 1.0 mM เตรียมตามวิธีของ D. A. McFarland และคณะ (2004) [27] โดยปีเปตสารละลาย HAuCl_4 ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 1.0 mL เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยน้ำ DI หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มาให้ความร้อนจนเดือดพร้อมกับทำการกวนตลอดเวลาบนเตาให้ความร้อน เมื่อสารละลายเดือดเติมสารละลาย sodium citrate ความเข้มข้น 38.8 mM ปริมาตร 1 mL โดยค่อย ๆ หยดลงในสารละลายทีละน้อย ให้ความร้อนพร้อมกับกวนสารละลายต่อประมาณ 10 นาที จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงจึงจะได้สารละลาย AuNPs

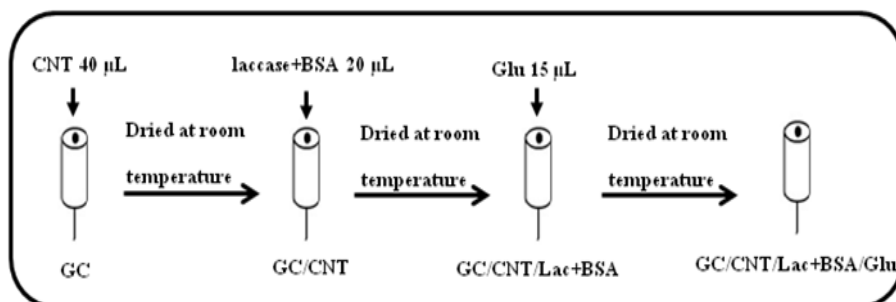
3.3.3 การเตรียมไบโอเซนเซอร์

3.3.3.1 การทำความสะอาดขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน

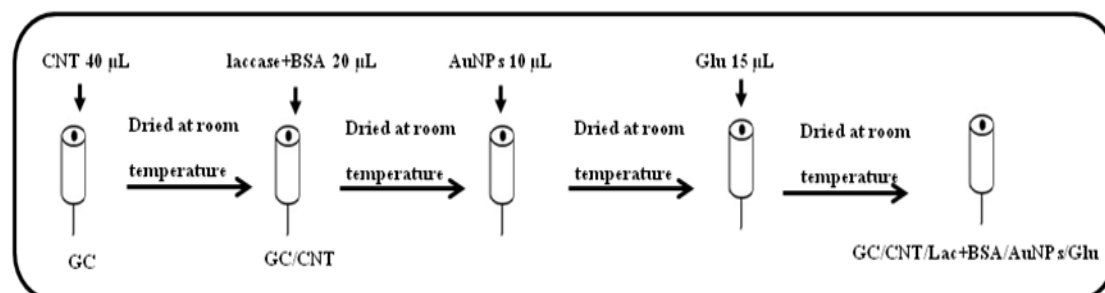
ทำความสะอาดขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน โดยขัดผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยผง อะลูมินากับผ้าสักหลาด ขัดขั้วไฟฟ้าโดยใช้ผง อะลูมินาขนาด 1.0 , 0.3 และ 0.05 ไมครอน ตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate กับน้ำ DI เป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

3.3.3.2 การโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน

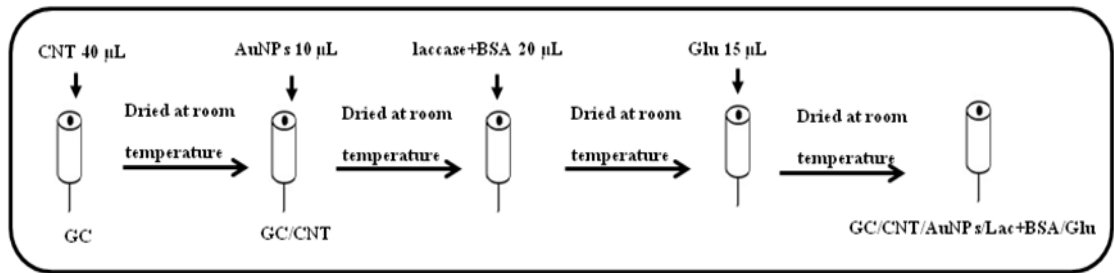
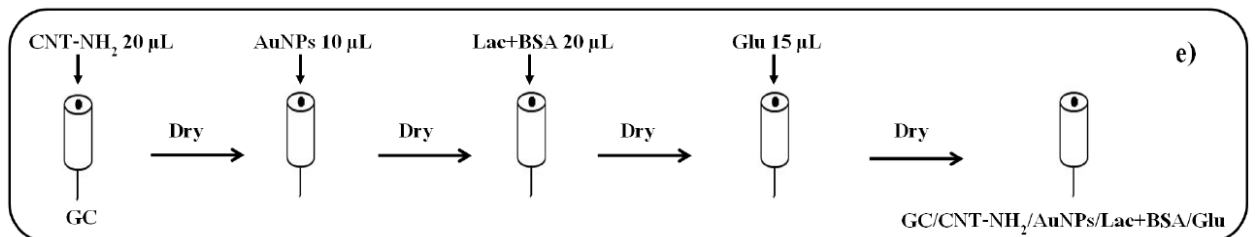
a) GC/CNT/Lac+BSA/Glu



b) GC/CNT/Lac+BSA/AuNPs/Glu

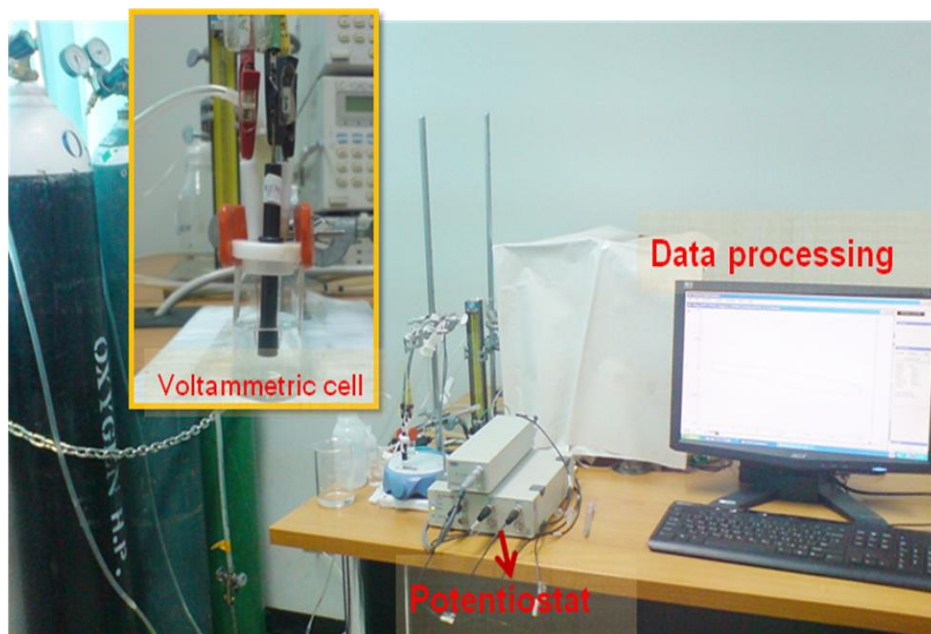


c) GC/CNT/AuNPs/Lac+BSA/Glu

d) GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu

3.3.4 ไซคลิกโวลแทมเมทรี (Cyclic voltammetry)

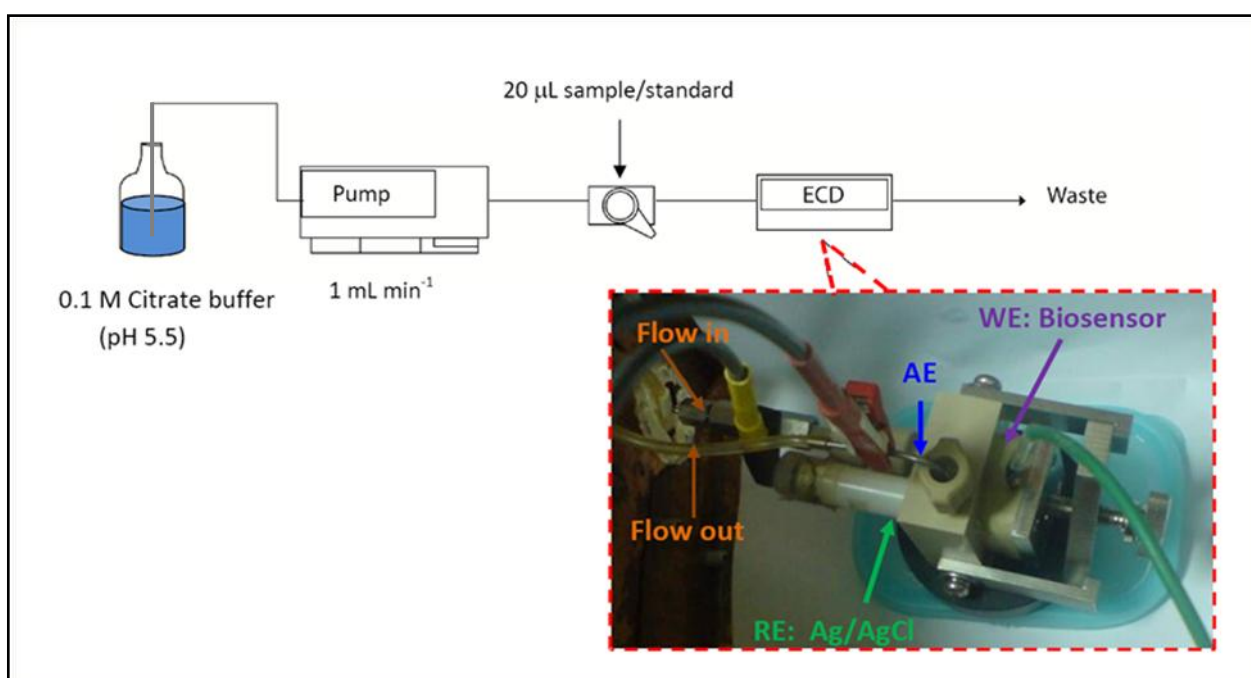
การทดลองไซคลิกโวลแทมเมทรีแสดงดังรูปที่ 3.1 เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210 (บริษัท EDAQ) และ โวลแทมเมทริกเซลล์ ขนาด 25 mL (รูปแทรก, รูปที่ 3.1) ประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา (3 mm diameter) หรือ ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่โมดิฟายด์ด้วยคาร์บอนนาโนคอมโพสิตและเอนไซม์แลคเคสเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงและ ใช้ลวด Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย



รูปที่ 3.1 การทดลองไซคลิกโวลแทมเมทรีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง รูปแทรกแสดงโวลแทมเมทริกเซลล์

3.3.5 ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรี

ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น (GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu) แสดงดังรูปที่ 3.2 HPLC ปัมป์ รุ่น LC-10AD (บริษัท Shimadzu), Injector ปริมาตร loop 20 μ L (บริษัท Rheodyne), เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210 (บริษัท eDAQ) และ thin layer flow cell (รูปแทรก, รูปที่ 3.2) ประกอบด้วยชั่วไฟฟ้า 3 ชั่ว ได้แก่ชั่วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่ดีฟายด์ด้วยคาร์บอนนาโนคอมโพสิตและเอนไซม์แลคเคสเป็นชั่วไฟฟ้าใช้งาน, ชั่วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นชั่วไฟฟ้าอ้างอิง และใช้ท่อ stainless steel เป็นชั่วไฟฟ้าช่วย active area สำหรับชั่วไฟฟ้าใช้งานเท่ากับ 0.06 cm² ใช้สารละลาย citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 M เป็นสารละลายตัวพา (carrier solution)



รูปที่ 3.2 แมนิโฟลด์ของระบบโพลีอิเล็กโทรไลต์ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วไฟฟ้า laccase biosensor ที่พัฒนาขึ้น (GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu) รูปแทรกแสดงภาพของ thin layer flow cell

3.3.6 การเตรียมตัวอย่าง

3.3.6.1 ตัวอย่างพืช-ผักพื้นบ้าน

พืช-ผักพื้นบ้านที่ใช้ในงานวิจัยในส่วนของ การประเมินประสิทธิภาพของ ระบบโพลีอิเล็กโทรไลต์ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วไฟฟ้า laccase biosensor ที่พัฒนาขึ้น มี 13 ชนิด ได้แก่ กระเพรา, ฟักทะลายโจร, ขิง, สะตอ,ทองพันชั่ง, ผักพวย, ขมิ้น, บอระเพ็ด, ผักกาดฮีน, ใบมะตูม, กะหล่ำมวง, ใบบัวบก และ มะเมี๊ยะ ซึ่งซื้อจากร้านค้าของชุมชนในเขตจังหวัดอุบลราชธานีในช่วงเดือน พฤษภาคม -มิถุนายน 2554 ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย ระบบโพลีอิเล็กโทรไลต์ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วแลคเคสไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ต้องผ่านเตรียมตัวอย่างและการสกัดดังนี้

นำพืช-ผักพื้นบ้านมาล้างทำความสะอาดแล้วผึ่งลมให้แห้ง แยกเอาเฉพาะส่วนใบ หรือส่วนที่ใช้รับประทาน อบที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 ชั่วโมงด้วยตู้อบลมร้อน จนได้น้ำหนักที่คงที่ นำไปบดหรือปั่นให้ได้ตัวอย่างแห้งที่เป็นเนื้อเดียวกันบรรจุลงในภาชนะที่ปิดมิดชิด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -18°C การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสารตัวอย่างพัฒนาจากวิธีของ S. Silva [28] โดยชั่งตัวอย่างแห้งหนัก 2.5 ± 0.0001 g มาสกัดเพื่อกำจัดเม็ดสี (pigment) และไข (wax) ด้วย เฮกเซนปริมาตร 25.00 mL (สกัด 3 ครั้ง) นำกากที่เหลือมาสกัดด้วย 80% เมทานอล ปริมาตร 25.00 mL และ 2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ปริมาตร 5.00 mL (สกัด 3 ครั้ง) นำชั้นของเหลวที่สกัดได้มารวมกัน จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างในภาชนะสีชาที่มีฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิประมาณ 7°C

3.3.6.2 ตัวอย่างชา

ตัวอย่างชา ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ชามะลิ, ชาใบหม่อน และ ชาเขียว นำมาเตรียมและสกัดก่อนนำไปวิเคราะห์ ด้วยระบบโพลินเจคชันอะนาลิซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วแลคแคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ดังนี้

ชาใบหม่อน และ ชาเขียว เป็นผลิตภัณฑ์บรรจุ 1 ซองมีน้ำหนักเท่ากับ 1.40 g ส่วน ชามะลิ, 1 ซอง น้ำหนักเท่ากับ 3.50 g นำชาแต่ละชนิด 1 ซอง มาชงด้วยน้ำร้อน (อุณหภูมิประมาณ 100°C) ปริมาตร 50 mL คนและทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

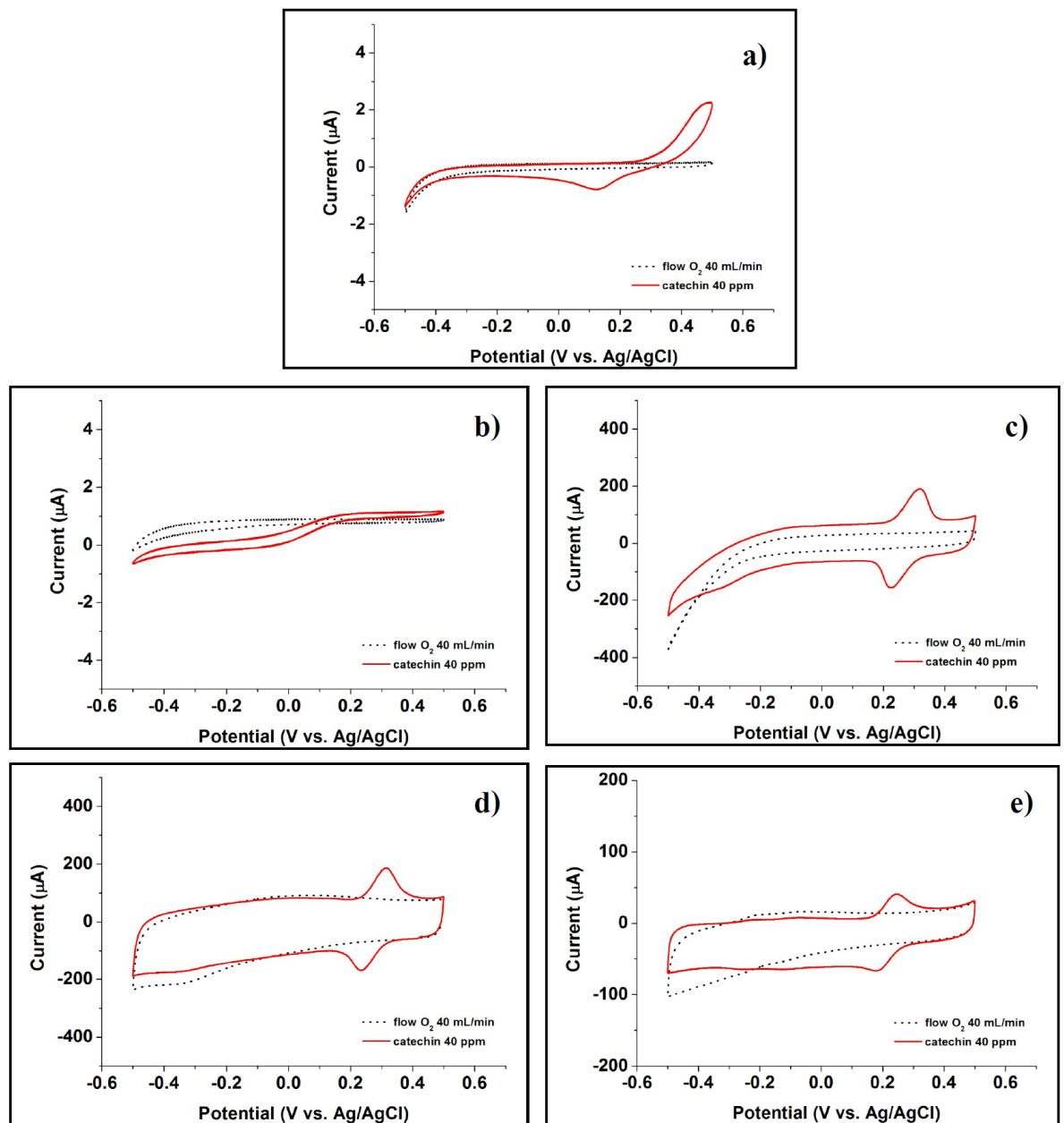
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาหาค่าประกอบที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์

ในการศึกษาหา องค์ประกอบของไบโอเซนเซอร์ ที่เหมาะสม ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ทำการศึกษาโดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนธรรมดา (GC) และขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่โมดิฟายด์อีก 4 ชนิดได้แก่ GC/Lac+BSA/Glu, GC/CNT, GC/CNT/Lac+BSA และ GC/CNT/Lac+BSA/Glu เพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน catechin ภายใต้บรรยากาศของออกซิเจน (40 mL/min) เหนือสารละลายสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน (สารละลายcitrate buffer pH 5.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.1

ผลการทดลองจากรูปที่ 4.1 พบว่าที่ขั้วไฟฟ้า GC ธรรมดา และขั้วไฟฟ้า GC ที่โมดิฟายด์พบพีครีดักชันของ catechin แต่มีเฉพาะขั้วไฟฟ้า GC/Lac+BSA/Glu (รูป 1b) และ GC/CNT/Lac+BSA/Glu (รูป 1e) เท่านั้นที่สามารถวัดรีดักชันของ catechin ได้ในช่วงศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม คือตั้งแต่ -0.2 ถึง 0.0 V ซึ่งในช่วงศักย์ไฟฟ้างกล่าวจะไม่มีสัญญาณรบกวนจากสารอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบสภาพไวของขั้วไฟฟ้าทั้งสองพบว่า ขั้วไฟฟ้า GC/CNT/Lac+BSA/Glu มีสภาพไวที่สูงกว่า GC/Lac+BSA/Glu ถึง 20 เท่า ดังนั้นองค์ประกอบที่เหมาะสมของขั้วไฟฟ้าคือ GC/CNT/Lac+BSA/Glu

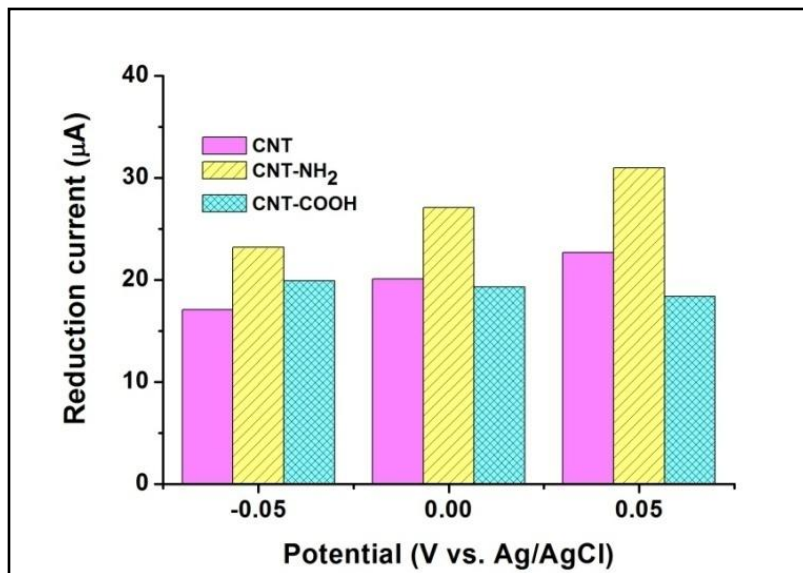


รูปที่ 4.1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ catechin ความเข้มข้น 40 ppm ที่ขั้วไฟฟ้าดัดแปรชนิด a) GC, b) GC/Lac+BSA/Glu, c) GC/CNT, d) GC/CNT/Lac+BSA และ e) GC/CNT/Lac+BSA/Glu เส้นประแสดง กระแสพื้น (back ground current) ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนู, citrate buffer pH 5.0

4.2 การศึกษาหาชนิดของคาร์บอนนาโนทิวป์ที่เหมาะสมในการโมดิฟายดีไบโอเซนเซอร์

ในการศึกษาหาชนิดของคาร์บอนนาโนทิวป์ที่เหมาะสมในการโมดิฟายดีไบโอเซนเซอร์ ทำการศึกษา โดยใช้คาร์บอนนาโนทิวป์ 3 ชนิด ได้แก่ CNT, CNT-NH₂ และ CNT-COOH มาใช้ในการโมดิฟายดีขั้วไฟฟ้า กลาสซีคาร์บอนดังข้อ a (GC/CNT/Lac+BSA/Glu) ในหัวข้อ 3.3.3.2 ใช้สารละลาย citrate buffer pH 5.0 ระบบวิเคราะห์ในการประเมินความสามารถด้านอณูอิเล็กทรอนิกส์

ความเข้มข้น 0.1 M เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนึ่ ทำการทดลองโดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี เพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน catechin ผลการทดลองในการศึกษาหาชนิดของคาร์บอนนาโนทิวป์ที่เหมาะสมในการโมดิฟายด์ไบโอเซนเซอร์ แสดงดังรูปที่ 4.2

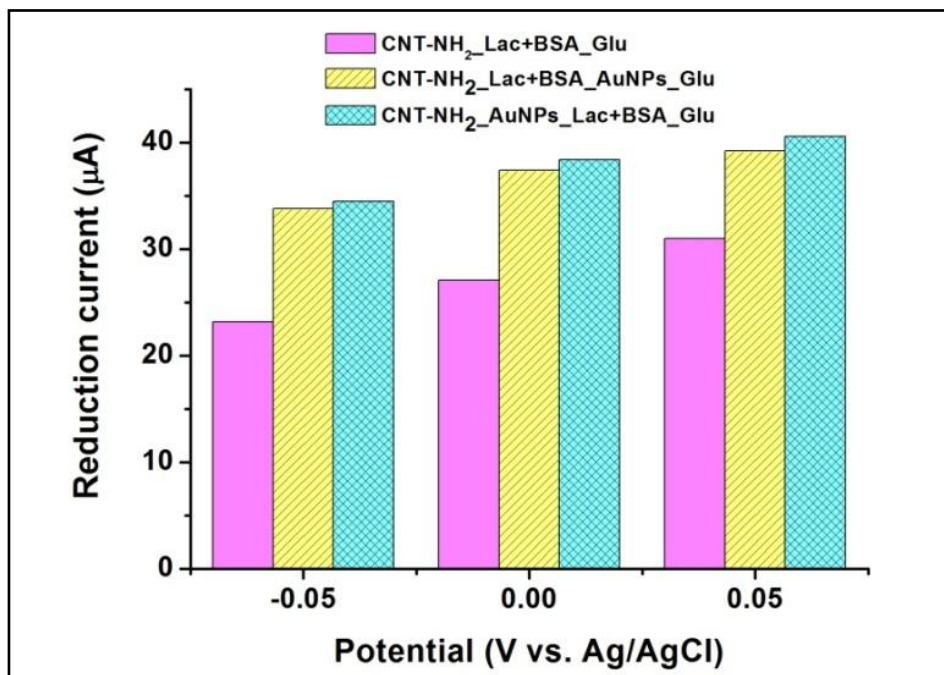


รูปที่ 4.2 ค่ากระแสของ catechin ความเข้มข้น 40 ppm ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.05, 0.0 และ 0.05 V ที่ได้จากขั้วไฟฟ้าชนิด GC/CNT/Lac+BSA/Glu ซึ่งใช้คาร์บอนนาโนทิวป์ CNT, CNT-NH₂ และ CNT-COOH (ค่ากระแสเฉลี่ยจากการเตรียมขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว (3 replicates) และ error bar แสดงค่า S.D. จากการวัด)

จากรูปที่ 4.2 พบว่าขั้วไฟฟ้าชนิด GC/CNT/Lac+BSA/Glu ซึ่งใช้คาร์บอนนาโนทิวป์ชนิด CNT-NH₂ จะให้สัญญาณค่ากระแสรีดักชันของ catechin ที่สูงที่สุดเมื่อวัดค่ากระแสที่ ศักย์ไฟฟ้า -0.05, 0.00 และ +0.05 V ทั้งนี้เนื่องจาก CNT-NH₂ ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน NH₂ เกาะอยู่ที่พื้นผิวของคาร์บอนนาโนทิวป์ มีสภาพพื้นผิวที่เหมาะสมทำให้สามารถจุปริมาณเอนไซม์ แลคเคสได้ดี ส่งผลให้ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ CNT-NH₂ ในการโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้าได้ค่ากระแสรีดักชันของ catechin ที่สูงที่สุด

4.3 การศึกษาเพื่อเพิ่มสภาพไวของไบโอเซนเซอร์โดยใช้อนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)

ในการศึกษาเพื่อเพิ่มสภาพไวของไบโอเซนเซอร์ จะศึกษาผลของการเติม AuNPs ปริมาตร 10 μL ลงไปในไบโอเซนเซอร์ ชนิด GC/CNT-NH₂/Lac+BSA/Glu ก่อนและหลังชั้นของ Lac+BSA จะได้ขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วไฟฟ้าได้แก่ GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu และ GC/CNT-NH₂/Lac+BSA/AuNPs/Glu นำค่ากระแสรีดักชันของ catechin ความเข้มข้น 40 ppm ที่ศักย์ไฟฟ้าค่า -0.05, 0.0 และ 0.05 V ที่ได้จากทั้งสองขั้วไฟฟ้ามาเปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/Lac+BSA (ไม่มี AuNPs) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3

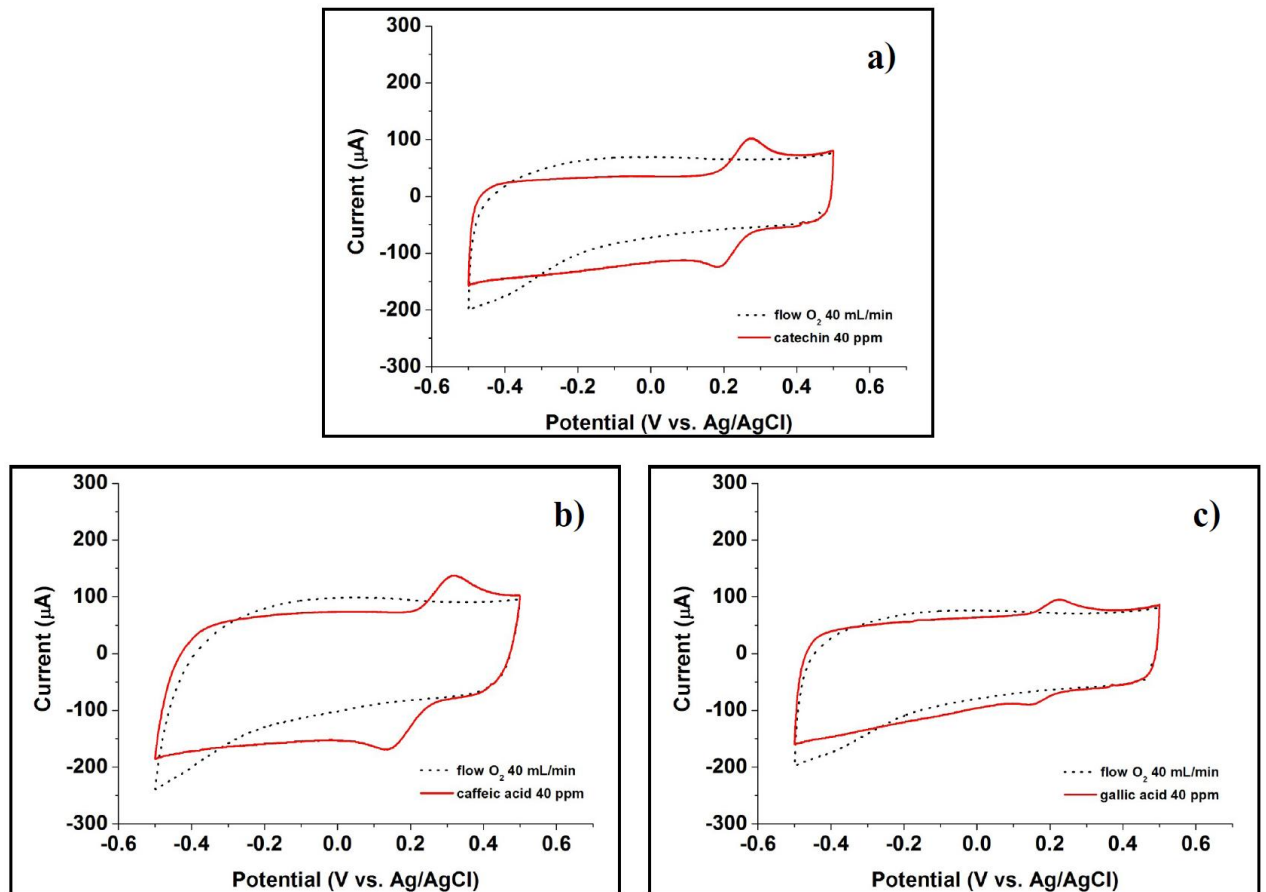


รูปที่ 4.3 ค่ากระแสรีดักชันของ catechin ความเข้มข้น 40 ppm ที่ได้จากขั้วไฟฟ้าชนิด GC/CNT-NH₂/Lac+BSA (ไม่มี AuNPs) และขั้วไฟฟ้าที่มีการเติม AuNPs ก่อน (ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu) และหลังชั้นของ Lac+BSA (ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/Lac+BSA/AuNPs/Glu) ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.05, 0.0 และ 0.05 V (ค่ากระแสรีดักชันที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการเตรียมขั้วไฟฟ้า 3 ครั้ง (3 replicates) และ error bar แสดงค่า S.D. จากการวัด)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/Lac+BSA/Glu (ไม่มี AuNPs) และขั้วไฟฟ้าที่มีการเติม AuNPs ทั้งสองขั้วไฟฟ้าคือ GC/CNT-NH₂/Lac+BSA/AuNPs/Glu และ GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu พบว่าขั้วไฟฟ้าที่มีการเติม AuNPs เข้าไปโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้าได้สัญญาณรีดักชันของ catechin ที่สูงขึ้นกว่าขั้วไฟฟ้าที่ไม่มีการเติม AuNPs ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติการนำไฟฟ้าที่ดีของ AuNPs ทำให้ขั้วไฟฟ้าที่โมดิฟายด์ด้วยวัสดุเชิงประกอบที่มี AuNPs จะสามารถนำไฟฟ้าได้ดีขึ้น สัญญาณที่ได้จึงมีสภาพไวสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติม AuNPs ลงไปในโพลิเมอร์ชนิด GC/CNT-NH₂/Lac+BSA/Glu ก่อนและหลังชั้นของ Lac+BSA พบว่าค่ากระแสจากทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม การเติม AuNPs ก่อนหลังชั้นของ Lac+BSA ให้ค่ากระแสสูงกว่าเล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกสภาวะขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu เป็นสภาวะที่เหมาะสม

4.4 โพลีเมอร์โวลแทมโมแกรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

โพลีเมอร์โวลแทมโมแกรมของสารต้านอนุมูลอิสระ (catechin, caffeic acid และ gallic acid) ที่ได้จาก ขั้วไฟฟ้าชนิด GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu แสดงดังรูปที่ 4.4



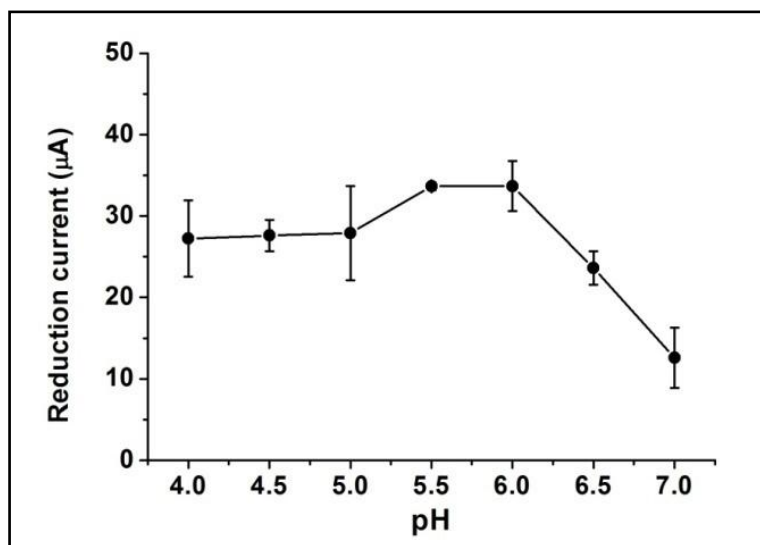
รูปที่ 4.4 โพลีเมอร์โวลแทมโมแกรม ของ (a) catechin, (b) caffeic acid, and (c) gallic acid (เส้นทึบ) ความเข้มข้น 40 ppm ที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu เส้นประแสดงกระแสพื้น (background current) ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนู, citrate buffer pH 5.0

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถวัดรีดักชันของสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 4 ชนิดนี้ได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ ในช่วง 0.05 ถึง -0.05 V การวัดค่ากระแสในช่วงศักย์ต่ำๆ นี้จะมีข้อดีของการวัดคือ มีสภาพไวสูง เนื่องจากสัญญาณของกระแสพื้นมีค่าต่ำ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากสารรบกวนต่างชนิดต่าง ๆ ไม่ให้สัญญาณในช่วงศักย์นี้

4.5 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

4.5.1 ผลของ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน

ผลของ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน (0.1 M citrate buffer solution) ศึกษาโดยวัดปฏิกิริยารีดักชันของ catechin ความเข้มข้น 40 ppm ที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลายcitrate bufferพีเอช ช่วง 4.0 ถึง 7.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5

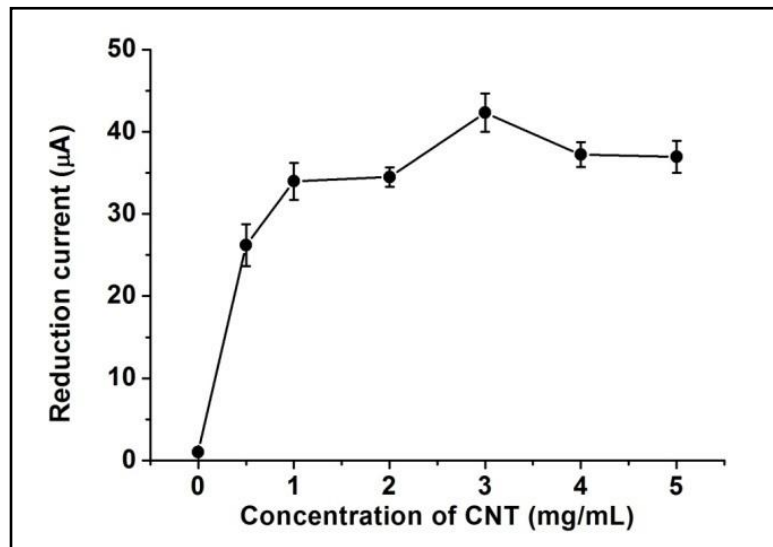


รูปที่ 4.5 ผลของ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน (0.1 M citrate buffer solution) ต่อค่ากระแสของ caffeic acid ความเข้มข้น 40 ppm ที่วัดโดยใช้ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu (วัดค่ากระแสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.05 V)

ผลการทดลองจากรูป 4.5 พบว่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ค่าพีเอชของสารละลายซีเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในช่วง 5.5 ถึง 6.0 ให้ค่ากระแสสูงที่สุด แต่ค่าพีเอชของสารละลายcitrate bufferที่ พีเอช 5.0 จากการวัด 3 ครั้งให้ค่าเบี่ยงเบน (SD) ที่น้อยกว่า ดังนั้นพีเอชของสารละลายซีเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เหมาะสมในการวัดคือ พีเอช 5.5

4.5.2 ผลของปริมาณคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันอะมิโน (CNT-NH₂)

ในการศึกษาหาปริมาณ CNT-NH₂ ที่เหมาะสมในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า จะเตรียมไบโอเซนเซอร์ GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu โดยใช้สารละลายของ CNT-NH₂ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 mg/mL ปริมาตร 20 μL ในขั้นตอนการเตรียมขั้วไฟฟ้า ผลของปริมาณ CNT-NH₂ ต่อการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของ catechin แสดงดังภาพที่ 4.6

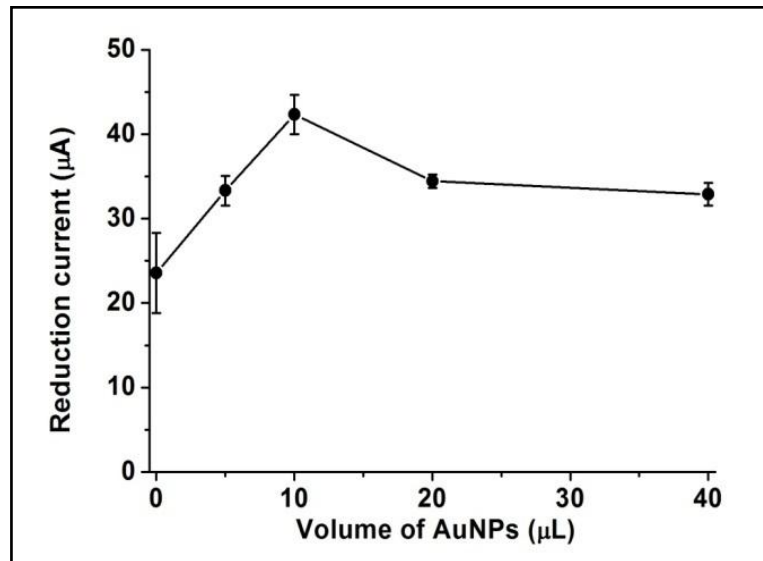


รูปที่ 4.6 ผลของปริมาณ CNT-NH₂ (ปริมาตร 20 μL) ที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu ต่อค่ากระแสของ caffeic acid ความเข้มข้น 40 ppm (วัดค่ากระแสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.05 V)

ผลการทดลองจากรูป 4.6 พบว่าเมื่อปริมาณ CNT-NH₂ ในวัสดุเชิงประกอบเพิ่มมากขึ้นค่ากระแสของ catechin มีค่าเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ CNT-NH₂ ในสารละลายโมดิฟายด์ เป็น 3 mg/mL ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ CNT-NH₂ เป็น 3 mg/mL เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

4.5.3 ผลของปริมาณอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)

ผลของปริมาตร อนุภาคทองคำนาโน AuNPs (μL) ที่ใช้ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า ศึกษาโดยวัดปฏิกิริยารีดักชันของ 40 ppm catechin ที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (ในสารละลาย citrate buffer พีเอช 5.5) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7

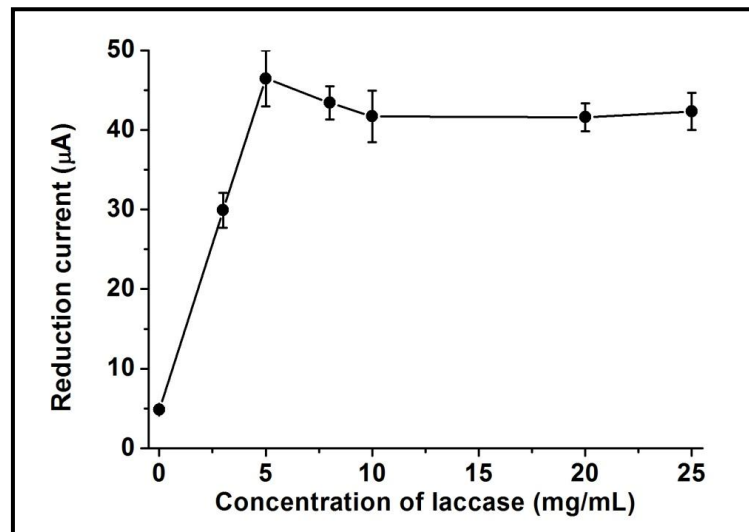


รูปที่ 4.7 ผลของปริมาตร AuNPs (μL) ที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu ที่มีต่อค่ากระแสของ caffeic acid ความเข้มข้น 40 ppm (วัดค่ากระแสที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.05 V)

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ AuNPs ค่ากระแสที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น จาก 0 ถึง 10 μL และเริ่มคงที่เมื่อใช้ปริมาตรของ AuNPs มากกว่า 10 μL เมื่อเปรียบเทียบกับโพลีเมอร์ที่ไม่มี AuNPs (0 μL) กับโพลีเมอร์ที่ใช้ปริมาตรของ AuNPs เป็น 10 μL พบว่าค่ากระแสที่ได้เพิ่มขึ้นจากเดิมถึงสองเท่า ซึ่งค่ากระแสที่มากขึ้นเมื่อมีการเติม AuNPs คาดว่ามาจากคุณสมบัติการเป็นตัวนำไฟฟ้าของ AuNPs และ AuNPs ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำให้เอนไซม์แลคเคสสามารถ ถูกดูดซับได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นสภาพไวในการวิเคราะห์จึงมีค่าสูงขึ้น

4.5.4 ผลของปริมาณเอนไซม์แลคเคส (Lac)

การศึกษา หาปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์แลคเคส ในสารละลายโมดิฟายด์ ในการทดลองจะนำสารละลายเอนไซม์แลคเคส มาผสมกับสารละลายโพลีเมอร์อัลบูมิน ในอัตราส่วน 20 : 1 โดยใช้สารละลายโพลีเมอร์อัลบูมิน ความเข้มข้น 1% และจะศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 0.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10.0, 20.0 และ 25.0 mg/mL ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8

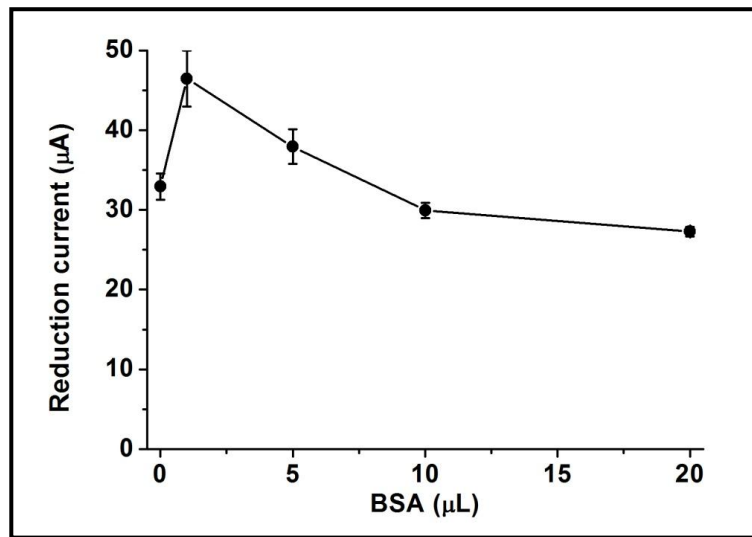


รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายมาตรฐาน caffeic acid ความเข้มข้น 40 ppm กับความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคส (mg/mL), (laccase : 1% BSA , 20 :1)

จากผลการศึกษาผลของ ปริมาณเอนไซม์แลคเคส พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์แลคเคสจาก 0 – 5 mg/mL ค่ากระแสเพิ่มมากขึ้นเป็นผลจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส โดยปริมาณเอนไซม์แลคเคส 5 mg/mL จะให้ค่ากระแสที่สูงที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากขึ้นอีกกลับทำให้ค่ากระแสลดลงเนื่องจากปริมาณที่มากเกินไปของเอนไซม์ไปขัดขวางการทำงานของตัวมันเอง ทำให้เกิดการต้านทานในการถ่ายเทอิเล็กตรอน ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 5 mg/mL ในการใช้งานต่อไป

4.5.5 ผลของปริมาณสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน (BSA)

การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน ซึ่งในการทดลองจากนำสารละลายเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 5 mg/mL ผสมกับสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 1% ในอัตราส่วน 20 : 1, 20 : 2, 20 : 5, 20 :10 และ 20 : 20 ผลการทดลองดังรูปที่ 4.9

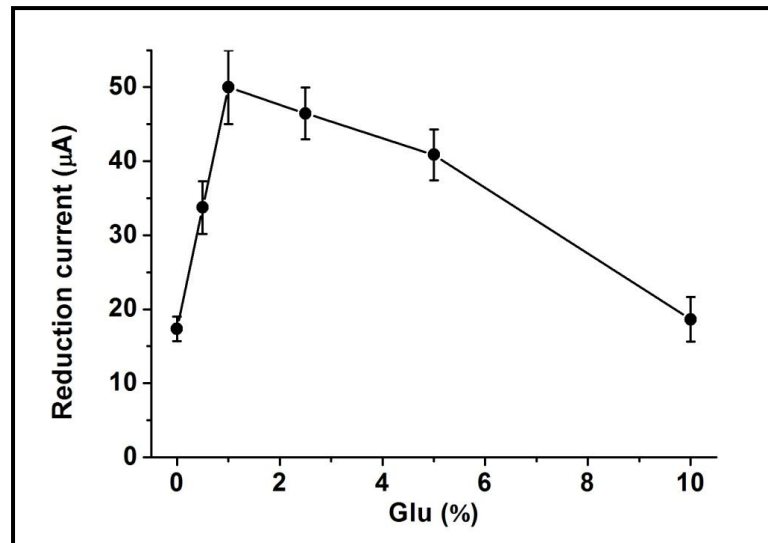


รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายมาตรฐาน caffeic acid ความเข้มข้น 40 ppm กับอัตราส่วนของเอนไซม์แลคเคสต่อสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (5 mg/mL laccase : 1% BSA ที่ 20 : 1, 20 : 2, 20 : 5, 20 : 10 และ 20 : 20)

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.9 พบว่าสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมินช่วยในการคงตัวของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น แต่ปริมาณที่มากเกินไปของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมินกลับทำให้ได้ค่ากระแสลดลงเนื่องจากโบวีนซีรัมอัลบูมินเป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งไม่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้า ทำให้เกิดการขัดขวางการถ่ายเทอิเล็กตรอน ทำให้ลดความสามารถในการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ดังนั้นอัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 5 mg/mL : 1% สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน ที่เหมาะสมคือ 20 : 1

4.5.6 ผลของปริมาณสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (Glu)

การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการโมดิฟายขั้วไฟฟ้าเพื่อใช้ในการตรึงเอนไซม์ให้เกาะติดบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าได้ดี โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0% ได้ผลดังรูปที่ 4.10



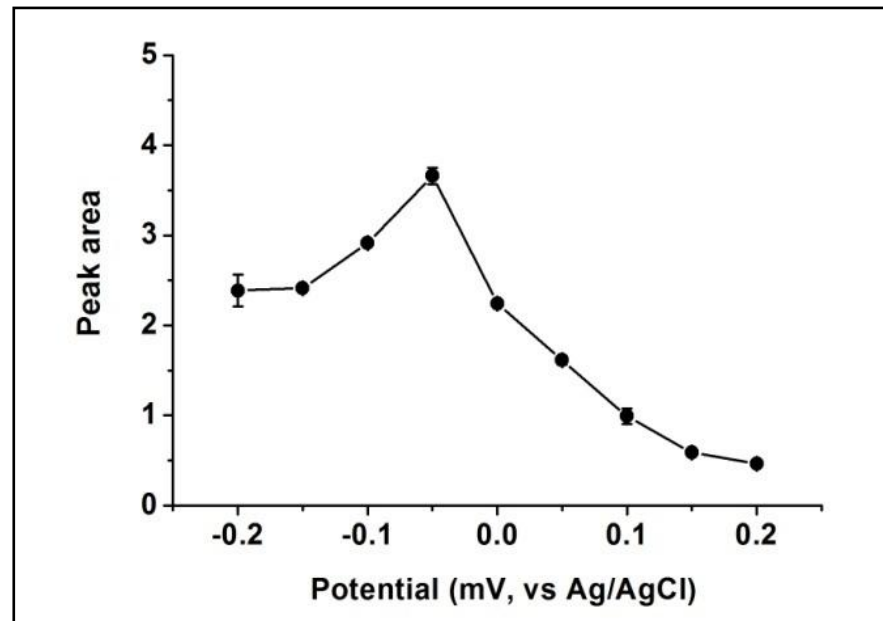
รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายมาตรฐาน caffeic acid ความเข้มข้น 40 ppm กับความเข้มข้นของสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ (%)

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.10 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ สารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ จาก 0 ถึง 1.0 % ค่ากระแสที่ได้เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์เป็นตัวช่วยในการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้า ขั้วไฟฟ้า ทำให้ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ สารละลายกลูตาไรลดีไฮด์มากกว่า 1% กลับทำให้ค่ากระแสลดลง ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์มี คุณสมบัติที่เป็นโพลิเมอร์เมื่อมีความเข้มข้นสูงๆ จึงเคลือบบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำให้ขัดขวางการทำงานของ เอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ดี ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ความเข้มข้น 1% ในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์และนำไปใช้ในระบบของการไหลแบบอัตโนมัติต่อไป

4.6 การประยุกต์ใช้แลคเคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบโพลีเมอร์เจกชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัด ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี (FI-laccase biosensor)

4.6.1 ศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม

ศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม ในการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์ ในระบบโพลีเมอร์เจกชันอะนาไลซิส ที่ ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี (รูปที่ 3.2) โดยตรวจวัดสัญญาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศักย์ไฟฟ้าค่า ต่าง ๆ โดยศึกษาในช่วง -0.2 ถึง 0.2 V โดยการตรวจวัดสัญญาณกระแสของ caffeic acid ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 20 µL ที่ฉีดเข้าไปในระบบโพลีเมอร์เจกชันอะนาไลซิส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11

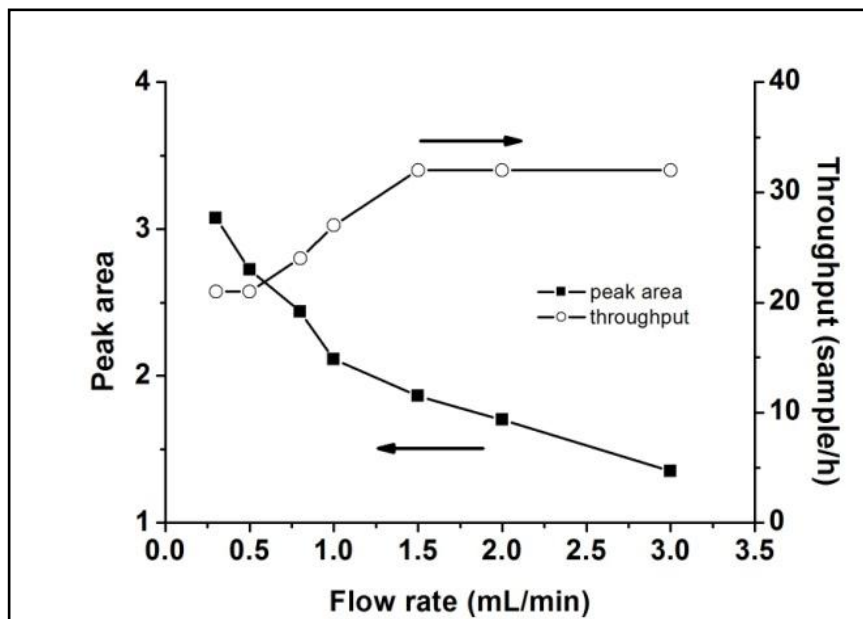


รูปที่ 4.11 การตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ (GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu) จากปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายมาตรฐาน caffeic acid ความเข้มข้น 10 ppm ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง 0.2 โวลต์

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าที่ให้จาก -0.2 ถึง -0.05 V พื้นที่ใต้พีคของสัญญาณกระแสรีดักชันมีค่าเพิ่มขึ้น ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.05 V จะให้สัญญาณที่สูงที่สุด และเริ่มลดลงเมื่อให้ค่าศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเลือกศักย์ไฟฟ้า -0.05 V ซึ่งให้สัญญาณที่สูงที่สุดเป็นค่าที่เหมาะสม มีสัญญาณรบกวนที่ต่ำ สามารถวัดสารได้ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ และสามารถลดผลจากตัวรบกวนในตัวอย่างได้อีกด้วย

4.6.2 ศึกษาหาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสม

ในการศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ของสารละลายตัวพา หรือ carrier solution (0.1 M citrate buffer pH 5.5) ที่เหมาะสมจะศึกษาในช่วงอัตราการไหล 0.25-3.00 mL/min ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 ผลของอัตราการไหลของสารละลายตัวพา (0.1 M citrate buffer pH 5.5) ต่อพื้นที่ใต้พีคของสัญญาณกระแสรีดักชัน (peak area) และจำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมง (sample throughput)

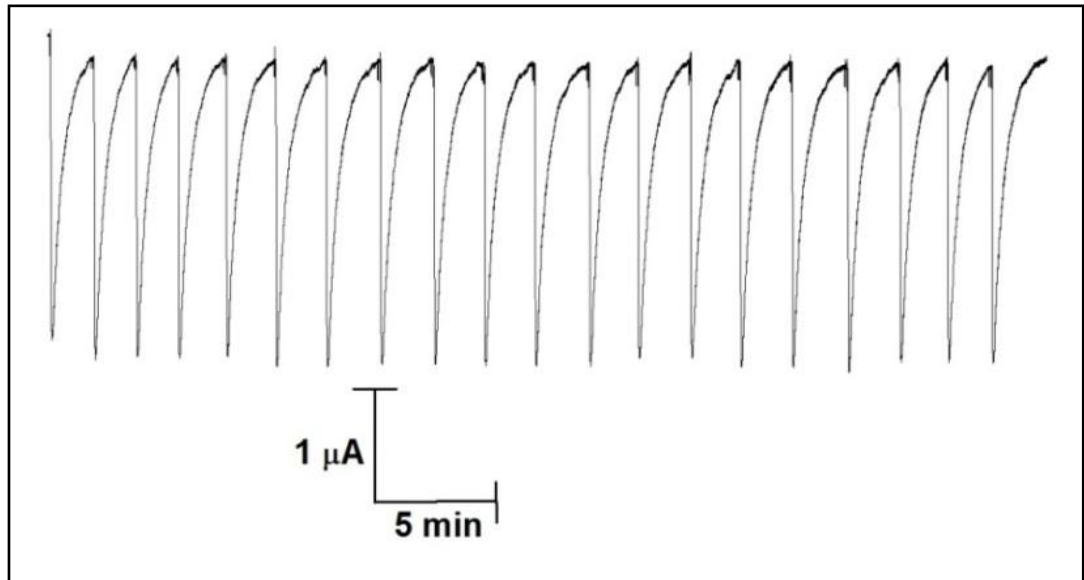
ผลการทดลองจากรูปที่ 4.12 พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของสารละลายตัวพาจะทำให้ได้ค่ากระแสที่ต่ำลง แต่ใช้เวลาในการตรวจวัดสารตัวอย่าง สั้นลงซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปของการวิเคราะห์แบบ enzyme-based assay ในระบบที่มีการไหล สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Fernández-Sánchez และคณะ [29] เมื่อใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพาเพิ่มขึ้นจำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมง (sample throughput) มีค่าสูงขึ้น ดังนั้นเพื่อพัฒนาระบบวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวัดได้รวดเร็ว ดังนั้นจึงพิจารณาข้อมูลของ throughput พบว่าเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นจาก 0.5-1.5 mL/min สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้จำนวนมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเพิ่มอัตราการไหลมากขึ้นเกิน 1.5 mL/min จำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมงเริ่มคงที่ ดังนั้นจึงเลือก อัตราการไหลที่ 1.5 mL/min เป็นค่าที่เหมาะสมและนำไปใช้ในการทดลอง ต่อไปเนื่องจากสามารถตรวจวัดตัวอย่างได้รวดเร็วถึง 32 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

4.7 คุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

4.7.1 ศึกษาความเสถียรของไบโอเซนเซอร์

การทดลองนี้จะทำการทดสอบความเสถียรของแลคเคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาใน ระบบโพลีเมอร์เจกซ์อะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี ทำการทดลองโดยฉีดสารละลายมาตรฐาน caffeic acid ความเข้มข้น 10 ppm ($n = 20$) ในระบบโพลีเมอร์เจกซ์อะนาไลซิส โดยตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วย

เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.05 V ใช้สารละลาย 0.1 M citrate buffer pH 5.5 เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.5 mL/min ผลการทดลองดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 FIA gram ของสารละลายมาตรฐาน caffeic acid ความเข้มข้น 10 ppm ที่ได้จากระบบโฟลอินเจกชันอะนาลิซิส ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ ที่พัฒนาขึ้น (วัดค่ากระแสที่ศักย์ไฟฟ้า -0.05 V, อัตราการไหล 1.5 mL/min)

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.13 พบว่า เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐาน caffeic acid ความเข้มข้น 10 ppm ร ไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดได้โดยให้ค่ากระแสที่มีความเที่ยง (precision) สูง เมื่อนำหาค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาค่า RSD พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.09% แสดงให้เห็นว่าระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติในระบบที่มีการไหลที่ใช้การตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ให้สัญญาณการตรวจวัดที่มีความเสถียรและ การตอบสนองดี การวิเคราะห์มีความรวดเร็ว (48 ตัวอย่างต่อชั่วโมง)

4.7.2 ศึกษาช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง (linearity range)

ในการทดลองหาช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงของระบบโฟลอินเจกชันอะนาลิซิส ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ได้ศึกษา ในสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ caffeic acid, catechin, gallic acid และ chlorogenic acid ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ความสามารถของไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 4 ชนิด

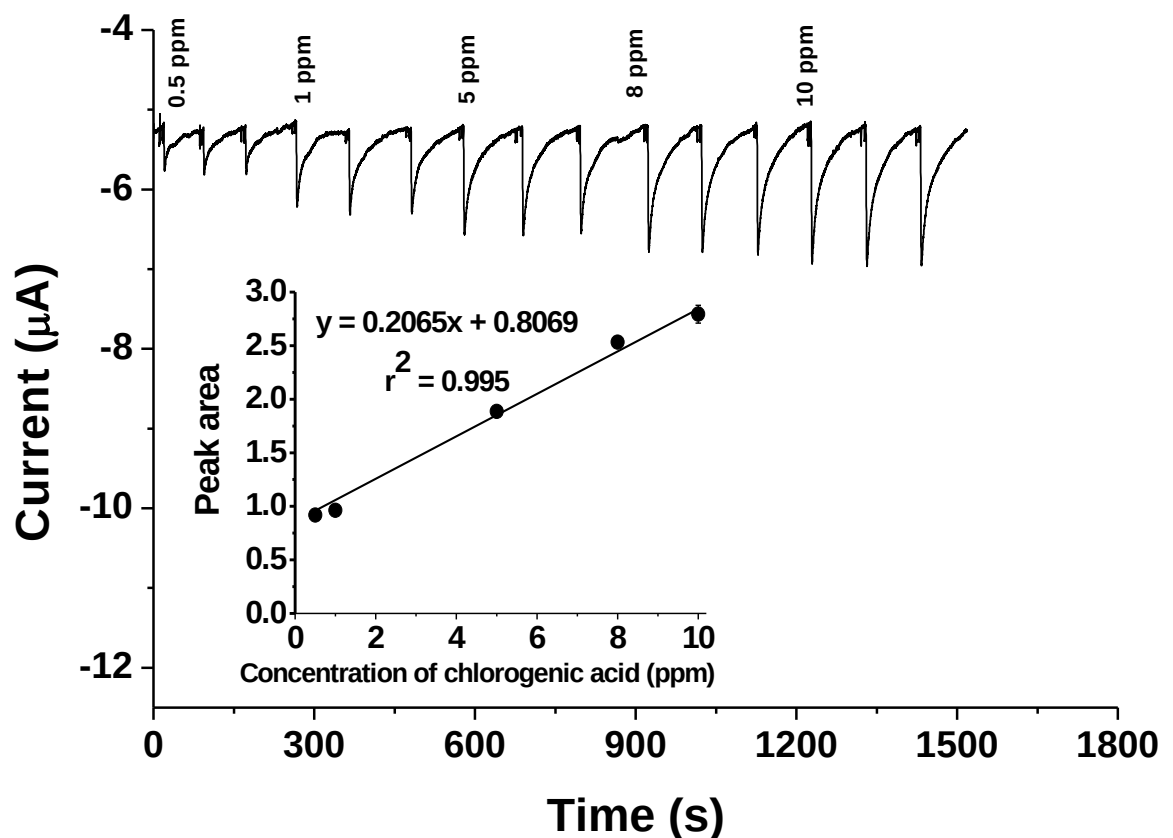
Antioxidants	Linearity range (mg L ⁻¹)	Linear equations	r ²	LOD ^a (mg. L ⁻¹)	%RSD ^b
Caffeic acid	0.5 - 8	y = 0.7528x + 0.6320	0.997	0.07	2.40
Catechin	0.5 - 100	y = 0.1420x + 1.0165	0.997	0.07	2.60
Gallic acid	0.5 - 10	y = 0.1687x + 0.5825	0.999	0.05	1.70
Chlorogenic acid	0.5 - 10	y = 0.2065x + 0.8069	0.995	0.07	2.20
Trolox	0.5 - 8	y = 0.8793x + 1.1219	0.997	0.03	2.16

^a คำนวณจากพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการฉีดสารต้านอนุมูลอิสระปริมาตร 20 µL ความเข้มข้นต่ำที่สุดใน working range ของสารแต่ละชนิด (n=7)

^b คำนวณจาก 3σ (n=7) ของสัญญาณสารต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นต่ำที่สุดใน working range ของสารแต่ละชนิด

ตัวอย่างของสัญญาณและกราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระ chlorogenic acid แสดง ดังรูป

ที่



รูปที่ 4.13 ตัวอย่างของ FIA gram ของสารละลายมาตรฐาน chlorogenic acid ความเข้มข้น 0.5 ถึง 10 ppm ที่ได้จากระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น และกราฟมาตรฐาน

4.7.3 การศึกษาผลของตัวรบกวน (Interference study)

ในการศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีต่อระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ตัวรบกวนที่นำมาศึกษาได้แก่ fructose, sucrose และ ascorbic acid ทำการทดสอบโดยนำสัญญาณค่ากระแสของสารละลายมาตรฐาน chlorogenic acid ความเข้มข้น 10 ppm ที่มีตัวรบกวนความเข้มข้นต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน chlorogenic acid ความเข้มข้น 10 ppm ที่ไม่มีตัวรบกวน ถ้าสัญญาณของค่ากระแสมีความแตกต่างกันเกิน $\pm 5\%$ ถือว่ามีการรบกวนต่อการวิเคราะห์ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาตัวรบกวน

ตัวรบกวน	ช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (ppm)	Tolerance limit ^a (ppm)
Fructose	10-1,000	Does not interfere
Sucrose	10-1,000	200
Ascorbic acid	10-50	50

^a การเปลี่ยนแปลงสัญญาณเกิน $\pm 5\%$ ถือว่ารบกวน

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 พบว่า fructose ไม่รบกวนการวิเคราะห์ในช่วงที่ศึกษา (0-1,000 ppm) sucrose ให้สัญญาณรบกวนเมื่อมีความเข้มข้นประมาณ 200 ppm ขณะที่ ascorbic acid จะรบกวนระบบวิเคราะห์เมื่อมีความเข้มข้นเพียง 50 ppm แต่เนื่องจากในตัวอย่างเป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรและชา มักพบปริมาณของ ascorbic acid หรือวิตามินซีในปริมาณต่ำ [30] ดังนั้นความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างที่จะนำไปประยุกต์ใช้จึงเป็นที่น่าพอใจ

4.8 การประยุกต์ใช้ ระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิส ที่พัฒนาขึ้นในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจาก สารสกัดพืช-ผักพื้นบ้าน

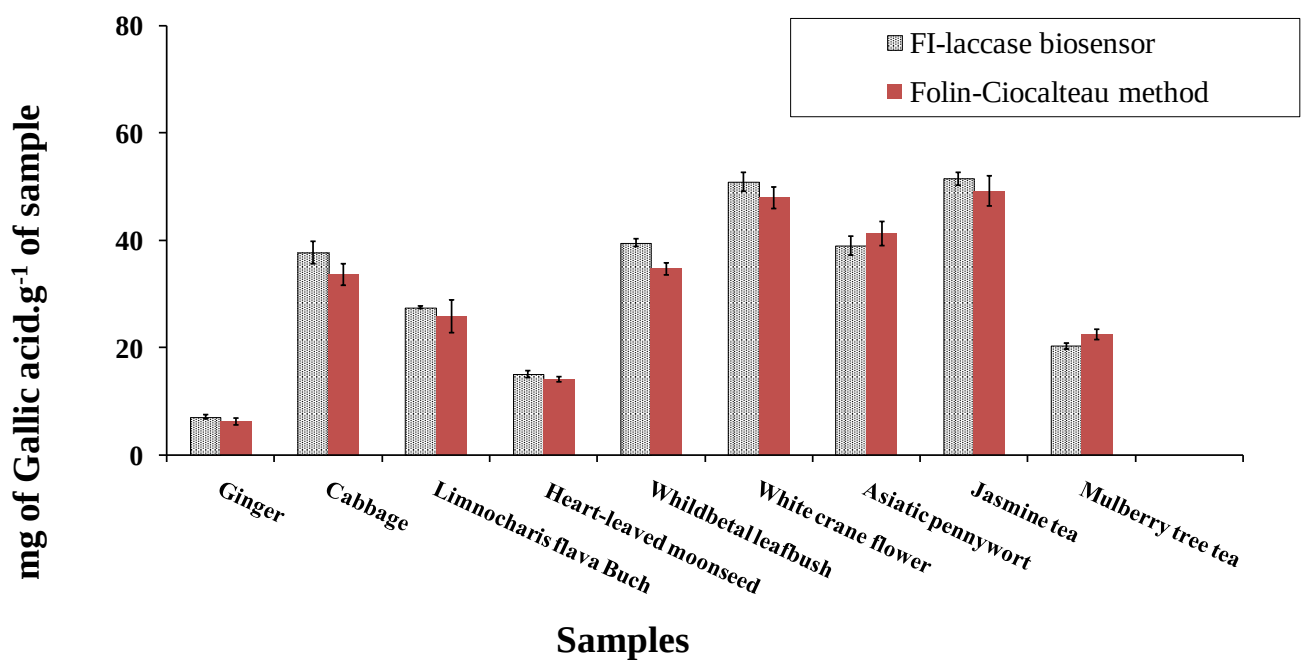
4.8.1 ประเมิน ประสิทธิภาพของระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่พัฒนาขึ้น

ประเมินประสิทธิภาพ ของระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วแลคเคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (FI-laccase biosensor) โดยการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) ในตัวอย่างสารสกัดจากพืช-ผักพื้นบ้านจำนวน 7 ชนิด และชา จำนวน 2 ชนิด ซึ่งซื้อจากร้านค้าของชุมชนในเขตจังหวัดอุบลราชธานีในช่วงเดือนพฤษภาคม -มิถุนายน 2554 ชื่อพืช-ผักพื้นบ้านและ ชาที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

นำผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้ จากระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วแลคเคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น มาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานได้แก่ วิธีวัดโดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent (FCR method) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณรวมของสารฟีนอลิกส์ที่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน พบว่าได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.14

ตารางที่ 4.4 ชื่อพืช-ผักพื้นบ้าน และชาที่นำมา ประเมินประสิทธิภาพของ ระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่ พัฒนาขึ้น

ชื่อสามัญ	ชื่อภาษาอังกฤษ
จิง	Ginger
กะหล่ำม่วง	Cabbage
ผักพาย	Limnocharis flava Buch.
บอระเพ็ด	Heart-leaved moonseed
ชะพลู	Wildbetal Leafbush
ทองพันชั่ง	White crane flower
ใบบัวบก	Asiatic pennywort
ชามะลิ	Jasmine tea
ชาใบหม่อน	Mulberry Tree tea



รูปที่ 4.16 ค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ของค่า TAC ที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดจากผักและพืชสมุนไพรทั้ง 8 ชนิด (ตัวอย่างละ 3 replicate) จากการวิเคราะห์ด้วย ระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสตรวจวัดที่ชั่วไฟฟ้า laccase biosensor ที่พัฒนาขึ้น (FI-laccase biosensor) และวิธีวิธีมาตรฐานแบบ Folin-Ciocalteu ที่มีการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

รูปที่ 4.16 แสดงผลลัพธ์วิเคราะห์ของค่า TAC จากการวิเคราะห์ด้วย ระบบระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วแลคเคสไปโอเซนส์เซอร์ที่พัฒนาขึ้น (FI-laccase biosensor)

และวิธีวิธีมาตรฐานแบบ Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu method) ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างสารสกัดจากผักและพืชสมุนไพรพื้นบ้านจำนวน 7 ชนิด และชา จำนวน 2 ชนิด จากการทดลองพบว่าปริมาณ TAC ที่พบในสารสกัดจากพืช-ผักพื้นบ้าน เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ทองพันชั่ง > ชะพลู ~ใบบัวบก > กะหล่ำปลีม่วง > ผักพวย > ชะพลู > ชิง ตามลำดับ และปริมาณ TAC ที่พบในชามะลิ > ชาใบหม่อน ผลจากการทดสอบด้วยสถิติ t -test พบว่า ผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิค ที่พัฒนาขึ้น (FI-laccase biosensor) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคมาตรฐาน (Folin-Ciocalteu method) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($t_{\text{observed}} = 1.8061$, เมื่อ $t_{\text{critical}} = 2.3060$)

4.8.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในตัวอย่างสารสกัดจากพืชผักพื้นบ้านและชา

นาระบบ โฟลอินเจกชันอะนาลิซิส ที่ตรวจวัด ด้วยเทคนิค แอมเพอร์โรเมท รีที่ขั้วแลคเคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (FI-laccase biosensor) นำไปใช้ในการศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) ในตัวอย่างสารสกัดจากผักและพืชสมุนไพรไทย 13 ชนิด (กระเพรา, ฟักทะลายโจร, ชิง, ชะพลู, ทองพันชั่ง, ผักพวย, ขมิ้น, บอระเพ็ด, ผักกาดฮีน, ใบมะตูม, กะหล่ำม่วง, ใบบัวบก และ มะเมี) และชาจำนวน 3 ชนิด (ชามะลิ, ชาใบหม่อน และ ชาเขียว) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity; TAC) ตรวจวัดด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น (FI-laccase biosensor) ในตัวอย่างสารสกัดพืชพื้นบ้าน และ ชาที่ (ค่าที่แสดงแต่ละตัวอย่างเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ซ้ำ)

ชื่อสามัญ	ชื่อภาษาอังกฤษ	TAC* (mg/g)
กระเพรา	Basil	114.62 ± 1.86
ฟักทะลายโจร	Kirayat	102.58 ± 0.91
ทองพันชั่ง	White crane flower	50.95 ± 1.79
ชะพลู	Wildbetal Leafbush	39.58 ± 0.71
ใบบัวบก	Asiatic pennywort	39.08 ± 1.79
กะหล่ำม่วง	Cabbage	37.78 ± 2.12
ผักพวย	Limnocharis flava Buch.	27.55 ± 0.21
ขมิ้น	Turmeric	22.16 ± 1.42
บอระเพ็ด	Heart-leaved moonseed	15.13 ± 0.62
ผักกาดฮีน	Cruciferae	7.61 ± 0.49
ชิง	Ginger	7.12 ± 0.38
มะเมี	Antidesma ghaesembilla Gaertn	6.11 ± 0.51
ใบมะตูม	Bael leaves	4.39 ± 0.06
ชามะลิ	Jasmine tea	51.53 ± 1.18
ชาใบหม่อน	Mulberry Tree tea	20.39 ± 0.56
ชาเขียว	Green tea	24.63 ± 1.44

* $\bar{X} \pm \text{S.D. (n= 3)}$

จากผลการทดลองเพื่อประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระโดย ระบบโพลินเจนค ซันอะนาลิซิส ที่พัฒนาขึ้นในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพืชสมุนไพร ในผัก-พืชพื้นบ้าน จำนวน 13 ชนิดที่นิยมบริโภคในจังหวัดอุบลราชธานี และ ชาที่วางจำหน่าย จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าจาก ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและพืชสมุนไพรที่นำมาศึกษา สามารถแบ่งผักและพืชสมุนไพรออกตาม ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (TAC, mg/g) ที่พบเป็น 3 ประเภทดังนี้

- 1) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ กระเพรา (114.62) และ ฟักทะลายโจร (102.58)
- 2) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระปานกลาง ได้แก่ ทองพันชั่ง (50.95), ชะพลู (39.58), ใบบัวบก (39.08), กระหล่ำมวง (37.78) และ ผักพาย (27.55)
- 3) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ได้แก่ ขมิ้น (22.16), บอระเพ็ด (15.13), ผักกาดฮืด (7.61), จิง (7.12), มะเฒ่า (6.11), และใบมะตูม (4.39)

ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและสมุนไพรทั้ง 13 ชนิดมีค่าที่แตกต่างกัน ตั้งแต่เพียงเล็กน้อยจนถึงประมาณเกือบ 20 เท่าขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ผลลัพธ์วิเคราะห์จากการทดลองในผัก และพืชสมุนไพรทั้ง 13 ชนิดสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการเลือกรับประทานผักและสมุนไพร เหล่านี้ ให้เหมาะสมกับความต้องการ

ส่วนประมาณ รวมของสารต้านอนุมูลอิสระ ในชา 3 ตัวอย่าง พบว่าชามะลิมีปริมาณรวมของ สารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (51.53) รองลงมาคือ ชาเขียว (24.63) และชาใบหม่อน (20.39) ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้จะพัฒนา ระบบวิเคราะห์ที่รู้ผลเร็วสำหรับหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วย ระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิส ที่ตรวจวัด ด้วยเทคนิค แอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่มีสภาพไวและมีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระ โดยในการศึกษาถึงองค์ประกอบที่เหมาะสมในไบโอเซนเซอร์จะใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีในการศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของ caffeic acid ผลการทดลองพบว่า ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีหมู่อะมิโน (CNT-NH₂) โกลด์นาโนพาทิเคิล (AuNPs) เอนไซม์แลคเคส (Lac) กับสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) และสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์ (Glu) (GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu) เป็นขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสม ผลการทดลองจากไซคลิกโวลแทมโมแกรม แสดงให้เห็นว่าสามารถวัดรีดักชันของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สนใจทั้ง 4 ชนิด (caffeic acid, catechin, gallic acid และ chlorogenic acid) ได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำ ๆ ในช่วง 0.05 ถึง -0.05 V การวัดค่ากระแสในช่วงศักย์ต่ำ ๆ นี้จะมีข้อดีของการวัดคือ มีสภาพไวสูง เนื่องจากสัญญาณของกระแสพื้นมีค่าต่ำ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากสารรบกวนต่างชนิดต่าง ๆ ไม่ให้สัญญาณในช่วงศักย์นี้

ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า คือสารละลาย CNT-NH₂ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร AuNPs ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลายผสมระหว่าง Lac ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 % อัตราส่วน 20:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และสารละลาย Glu ความเข้มข้น 1 % ค่า pH ของสารละลาย citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ที่เหมาะสมในการวัดคือ พีเอช 5.5

ได้พัฒนาระบบวิเคราะห์โดยนำการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ ในระบบวิเคราะห์โพลีอินเจกชันอะนาไลซิส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรดี โดยสัญญาณที่ได้จากการฉีด caffeic acid ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 20 μ L (จำนวน 20 ซ้ำ) ให้ค่า % R.S.D. เท่ากับ 3.09 สารต้านอนุมูลอิสระทุกชนิด (caffeic acid, catechin, gallic acid และ chlorogenic acid) ที่นำมาทดสอบให้กราฟมาตรฐานแบบเป็นเส้นตรง ชีดกำจัดในการตรวจวัดอยู่ระดับต่ำถึงพีพีเอ็ม สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ รวดเร็วถึง 29 ตัวอย่างต่อชั่วโมง เมื่อนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้น (FI-laccase biosensor) มาทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดจากพืช-ผักพื้นบ้านจำนวน 7 ชนิด และชาจำนวน 2 ชนิด พบว่าผลลัพธ์วิเคราะห์ของค่า TAC จากเทคนิคที่พัฒนาขึ้นให้ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับ วิธีวิธีมาตรฐานแบบ Folin-Ciocalteu ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($t_{\text{observed}} = 1.8061$, เมื่อ $t_{\text{critical}} = 2.3060$) เมื่อทดสอบด้วยสถิติ t-test วิธีที่พัฒนาขึ้นมีคุณลักษณะที่ดีและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืช-ผักพื้นบ้านไทยได้

จากผลการทดลองเพื่อประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิสที่พัฒนาขึ้นในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพืชสมุนไพร ในผัก-พืชพื้นบ้านจำนวน 13 ชนิดที่นิยมบริโภคในจังหวัดอุบลราชธานี และ ชาที่วางจำหน่าย จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าจากปริมาณ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและพืชสมุนไพรที่นำมาศึกษา สามารถแบ่งผักและพืชสมุนไพรออกตามปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (TAC, mg/g) ที่พบเป็น 3 ประเภทดังนี้

- 1) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ กระเพรา (114.62) และ ฟักทะลายโจร (102.58)

2) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระปานกลางได้แก่ ทองพันชั่ง (50.95), ชะพลู (39.58), ใบบัวบก (39.08), กะหล่ำม่วง (37.78) และ ผักพวย (27.55)

3) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ได้แก่ ขมิ้น (22.16), บอระเพ็ด (15.13), ผักกาดฮีด (7.61), ชิง (7.12), มะเฒ่า (6.11), และใบมะตูม (4.39)

ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและสมุนไพรทั้ง 13 ชนิดมีค่าที่แตกต่างกันตั้งแต่เพียงเล็กน้อยจนถึงประมาณเกือบ 20 เท่าขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ผลลัพธ์วิเคราะห์จากการทดลองในผักและพืชสมุนไพรทั้ง 13 ชนิดสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการเลือกรับประทานผักและสมุนไพรเหล่านี้ให้เหมาะสมกับความต้องการ ส่วนประมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในชา 3 ตัวอย่าง พบว่าชามะลิมีปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (51.53) รองลงมาคือ ชาเขียว (24.63) และชาใบหม่อน (20.39) ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

1. โอภา วัชรคุปต์. (2550). *สารต้านอนุมูลอิสระ RADICAL SCAVENGING AGENT*. กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์.
2. Mello, L. D. and Kubota, L. T. “Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation” *Talanta* **2007**, 72, 335–348,.
3. Adhikari, B. and S. Majumdar. “Polymers in sensor applications” *Progress in Polymer Science*, **2004**, 29: 699-766,.
4. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1998). **Free Radicals in Biology and Medicine**. Clarendon Press: Oxford, UK.
5. ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์, ประกาศรี ภูวเสถียร และริญ เจริญศิริ . (2538) **โภชนาการและส่งเสริมสุขภาพ**. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.
6. มะลิวรรณ อมตงไชย “วิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมอย่างรวดเร็ว” วารสารวิชาการ ม.อบ. ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 หน้า 49-59.
7. Mittler, R.(2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*,7(9), 405-410.
8. Zulueta, A., Esteve, M. J., Frasset, I., & Frigola, A. (2007). “Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain” *Food Chem.*, 103(4), 1365-1374.
9. Garcia-Alonso, M., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). “Evaluation of the antioxidant properties of fruits” *Food Chem.*,84 (1), 13-18.
10. Wannamethee, S.G., Lowe, G.D., Rumley, A., Bruckdorfer, K. P. and Whin, P.H. (2006) “Associations of vitamin C status, fruit and vegetable intakes and markers of inflammation and hemostasis” *Am. J. Clin. Nutr.* 83: 567-574.
11. Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). “Total Antioxidant Capacity of Fruits” *J. Agric. Food Chem.*, 44(3), 701-705.
12. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). “A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates” *Clin. Sci.* 84, 407-412.
13. Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity” *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25-30.
14. Megalhaes, L. M., Santos, M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. (2009) “Flow injection based method for fast screening of antioxidant capacity” *Talanta* 77, 1559-1566.
15. Pellegrini, Re-R; Proteggente, N.; Pannala, A.; Yand, M.; Rice-Evan, C. (1999). *Free Radical Biology and Medicine*; 26: 1231-1237.
16. Huang , D.J.; Ou, B.X.; Prior, R.L. (2005) “The chemistry behind antioxidant capacity assays” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841-1856.

17. Toyo'oka, T.; Kashiwazaki, T.; Kato, M. (2003) "On-line screening methods for antioxidants scavenging superoxide anion radical and hydrogen peroxide by liquid chromatography with indirect chemiluminescence detection" *Talanta*, 60, 467-475.
18. Girotti, S.; Ferri, E.; Maccagnani, L.; Budini, R.; Bianchi, G. (2002) "Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays" *Talanta* 56, 407-414.
19. Girotti, S.; Ferri, E.; Fini, F.; Bolelli, L.; Sabatini, A. G.; Budini, R.; Sichertova, D. (2004) "Automated and manual luminescent assay of antioxidant capacity: analytical features by comparison" *Talanta*, 64, 665-670.
20. Buratti, S.; Pellegrini, N.; Brenna, O.V.; Mannino, S. (2001) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5136-5141.
21. Shpigun, L.K.; Arharova, A.M.; Brainina, K.Z.; Ivanova, A.V. (2006) "Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts" *Analytica Chimica Acta* 573, 419-426.
22. Wilkolazka, A. J.; Ruzgas, T.; Gorton, L. (2004) *Enzyme and Microbial Technology* 35, 238-241.
23. Roy, J. J.; Abraham, T. E.; Abhijith, K. S., Kumar, P.V. S; Thakur, M. S. (2005) "Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase" *Biosensors and Bioelectronics* 21, 206-211.
24. Odaci, D.; Timur, S.; Pazarlioglu, N.; Montereali, M. R.; Vastarella, W.; Pilloton, R.; Telefoncu, A. (2007) "Determination of phenolic acids using *Trametes versicolor* laccase" *Talanta*, 71, 312-317.
25. Portaccio, M.; Martino, S. Di; Maiuri P.; Durante, D.; Luca, P. De; Lepore, M.; Bencivenga, U.; Rossi, S.; Maio, A. De; Mita, D.G. (2006) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 41, 97-102.
26. Gamella, M; Campuzano, S.; Reviejo, A. J.; Pingarron, J. M. (2006) "Electrochemical Estimation of the Polyphenol Index in Wines Using a Laccase Biosensor" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 , 7960-7967.
27. McFarland, D. A.; Haynes, L. C.; Mirkin, A. C.; Van Duyne, P. R.; Godwin, A. H. (2004) *Journal of Chemical Education*. 81, 544A-544B.
28. S. Silva, L.G., F. Leitão, A. V. Coelho, and L. Vilas Boas. (2006) "Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves" *Food Science and Technology International*. 12: 385-395
29. Fernández-Sánchez, C., et al. (2002) "Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions" *Bioelectrochemistry*. 58: 149-156.
30. Cardwell, T.J. and Christophersen, M.J. (2000) "Determination of sulfur dioxide and ascorbic acid in beverages using a dual channel flow injection electrochemical detection system" *Analytica Chimica Acta*. 416: 105-110.

ภาคผนวก

รายงานสรุปการเงิน

โครงการ: ระบบวิเคราะห์ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วด้วยไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน นางสาว มะลิวรรณ อมตงไชย

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค. 2553 **ถึงวันที่** 30 ก.ย. 2554

รายการ	งบปี 2554	รายจ่าย	คงเหลือ
1. งบดำเนินการ	112,000		
1.1 ค่าตอบแทน ใช้สอยและวัสดุ			
1.1.1 ค่าตอบแทน (ค่าทำการนอกเวลาราชการ)	5,000	5,000	0
1.1.2 ค่าใช้สอย			
-ค่าจ้างเหมาผู้ช่วยวิจัย (12 เดือน x 8,000 บาท)	96,000	96,000	0
-ค่าจ้างอื่น ๆ เช่น เหมาพิมพ์/จัดทำรูปเล่มรายงาน ,	5,000	3,050	1,950
วิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ			
-ค่าใช้สอยในการติดต่อสื่อสารเช่น ส่งพัสดุ , Fax,	6,000	6,559	-599
โทรศัพท์			
2. ค่าวัสดุและสารเคมี	115,000		
-สารเคมีและเครื่องแก้ว	30,000	66,360.75	-36,360.75
-อุปกรณ์และวัสดุวิทยาศาสตร์	70,000	31,582.55	38,417.45
-วัสดุหนังสือ วารสารและตำรา	5,000	315	4,685
-วัสดุสิ้นเปลืองในห้องปฏิบัติการ/สำนักงาน	10,000	18,612.50	-8,612.50
2.2 ค่าสาธารณูปโภค			
-ค่าสาธารณูปโภค (คณะ 5% ,มหาวิทยาลัย 5%)	22,700	22,700	0
รวมงบประมาณทั้งสิ้น	249,700	250,219.80	-519.80

ผลผลิต (Output)ของโครงการ

1. ผลผลิตของโครงการในเรื่องของงานตีพิมพ์สรุปได้ดังนี้

1.1 ผลงานวิจัยที่อยู่ในระหว่างการส่งผลงานตีพิมพ์

- M. Amatatongchai, Y. Sensri, S. Laosing, R. Tiwapol, D. Nacapricha “Rapid screening method for assessing total phenolic content using simple flow injection system with laccase based-biosensor” กำลังเตรียม manuscript

1.2 ผลงานที่ตีพิมพ์แล้ว

1.2.1 วารสารระดับชาติ 1 เรื่อง

-เสาวนีย์ เหล่าสิงห์ , ศิริธร อ่างแก้ว และ มะลิวรรณ อมตธงไชย “เทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ ” วารสารวิทยาศาสตร์ ม.อุบลฯ ฉบับพิเศษ ปีที่ 1 (มกราคม-ธันวาคม 2554) 10-20. (ผลงานวิจัยต่อยอดจาก ทุนวิจัยปีงบประมาณ 2552)

1.2.2 วารสารนานาชาติ 1 เรื่อง

-M. Amatatongchai, S. Laosing, O. Chailapakul and D. Nacapricha “Simple Flow Injection for Screening of Total Antioxidant Capacity by Amperometric Detection of DPPH Radical on Carbon Nanotube Modified-Glassy Carbon Electrode”, Talanta 2012, **97**, 267-272.

1.3 นำเสนอในงานประชุม

1.3.1 ระดับชาติ

-S. Laosing, R. Tiwapol, Y. Sensri, D. Nacapricha and M. Amatatongchai, “Simple Flow Injection for Screening of Total Antioxidant Capacity by Amperometric Detection on Laccase Based-Biosensor” 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38) 17 - 19 October 2012 (Chiang Mai, Thailand).

1.3.2 ระดับนานาชาติ

-M. Amatatongchai, Y. Sensri and D. Nacapricha “Development of Flow Injection System with Amperometric Detection on Laccase-Based Biosensor for Antioxidant Assay” The 6th Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2012) 11-13 January 2012 (Chiang Mai, Thailand).

2 ผลผลิตของโครงการในเรื่องของผลการวิจัยสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. ได้ไปโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่มีสภาพไว และความจำเพาะเจาะจงสูง ที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

2. ได้ระบบวิเคราะห์แบบใหม่ที่เป็นเทคนิคอัตโนมัติที่รวดเร็ว (high throughput) สามารถนำไปใช้ในการสกรีนนิ่ง วิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารสารต้านอนุมูลอิสระ ในตัวอย่างพืช-ผักพื้นบ้านอย่างรวดเร็ว

3. ได้องค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาศักยภาพไบโอเซนเซอร์ เพื่อนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการสกรีนนิ่งหาพืช ผักสมุนไพรที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูง เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของพืชผักสมุนไพรของไทย เช่น กระเพรา ฟักทะลายโจร ทองพันชั่ง ฯลฯ รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้กับผู้สนใจที่ต้องการนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นไปพัฒนาไบโอเซนเซอร์ให้มีประสิทธิภาพ และ /หรือสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อขนาดให้ระบบวิเคราะห์มีขนาดเล็กลงได้ (miniaturize)

4. เป็นส่วนหนึ่งในการส่งเสริมการเรียนการสอนและวิจัยในระดับปริญญาโท-เอก ในระดับภูมิภาค โดยเฉพาะในมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

5. ได้ข้อมูล ความรู้ และความเข้าใจเกี่ยวกับประเภทและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในพืช -ผักพื้นบ้านของไทย หน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ คณะวิทยาศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) หรือผลิตภัณฑ์สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำมาจากพืชสมุนไพรไทย

5. ผลงานวิจัยที่ได้พัฒนาขึ้นได้ถูกถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการนำผลการทดลองที่ได้ไปแสดงหรือบรรยายในที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ และนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

6. โครงการวิจัยนี้สามารถเอื้อให้มีการผลิตมหาบัณฑิต ทางด้าน เคมี จำนวน 1 คน องค์ความรู้จากงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการ วิจัยต่อยอดเป็นสารนิพนธ์สำหรับนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จำนวน 1 เรื่อง

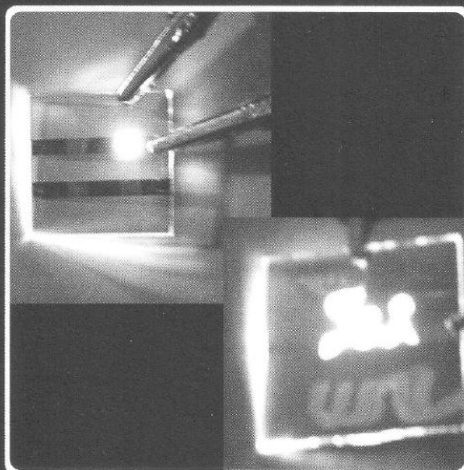
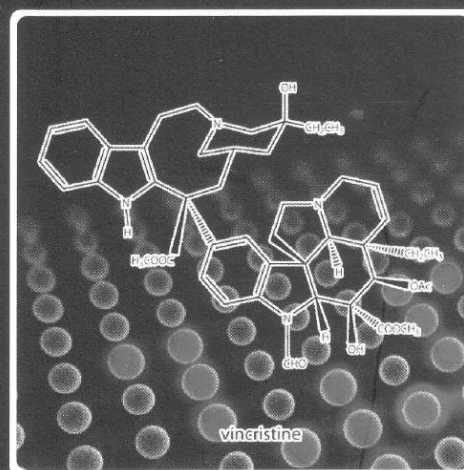
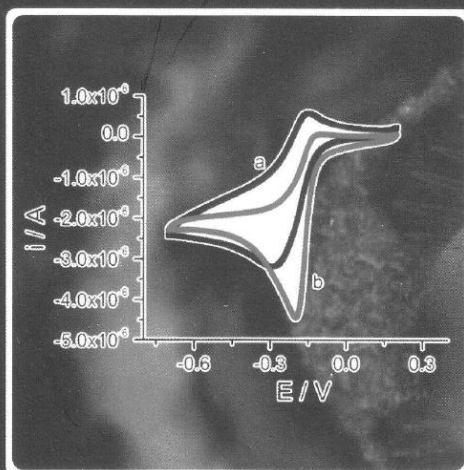
7. โครงการวิจัยนี้ เอื้อให้มีการสร้างเครือข่ายการวิจัยร่วมกับมหาวิทยาลัยอื่น ๆ ซึ่งเป็นผลจากการนำงานวิจัยไปเสนอในงานประชุมวิชาการ

ScJ
ubu

วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ฉบับพิเศษ ปีที่ 1 (มกราคม-ธันวาคม 2554)

Science Journal Ubon Ratchathani University



<http://scjubu.sci.ubu.ac.th>

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ISSN : 2229-1199



วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ฉบับพิเศษ

ปีที่ 1 (มกราคม – ธันวาคม 2554)

สารบัญ

บทความวิจัย	หน้า
▪ การเปรียบเทียบวิธีการพยากรณ์ข้อมูลล่วงหน้าหนึ่งคาบเวลาสำหรับตัวแบบอัตตสหสัมพันธ์อันดับที่หนึ่งเมื่อข้อมูลมีค่าผิดปกติและค่าสูญหาย วรฤทธิ์ พานิชกิจโกศลกุล ▪ เทคนิคตรวจวัดความสามารถด้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ เสาวนีย์ เหล่าสิงห์, ศิริธร อ่างแก้ว, มะลิวรรณ อมตรงไชย ▪ การใช้น้ำหมักชีวภาพจากมะเฟืองหัวเชื้อและส้มโอเป็นสารจับตัวยางและผลต่อสมบัติของยางคอมพาวด์และยางวัลคาไนซ์ สายสมร ลำลอง, จารวี นามวิชัย ▪ ความเป็นพิษร่วมของแอนทราซีนและพีแนนทรีนในดินที่ปนเปื้อนฟลูออรีนและฟลูออรีนดินต่อการเจริญในระยะต้นกล้าของพืชเศรษฐกิจงวงศัญญา ชนินรา สมตระกูล, จำปี ไชยเมืองคุณ, วรากรณ์ อุษลาย ▪ โบโอเซนเซอร์แบบไบเอนไซม์สำหรับตรวจวัดกลูโคสโดยชั่วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยไฮบริดนาโนของเมทิลีนบลู-คาร์บอนนาโนทิวบ์ รุ่งทิพา พลังสันติกุล	1-9 10-20 21-30 31-42 43-51
บทความวิชาการ	
▪ เคมีจุพราโมเลคิวลาร์: ตัวตรวจวัดไอออนบวกและไอออนลบ ชาติไทย แก้วทอง ▪ อวกาศกลุ่มสี่ ศราวุธ แสนการุณ ▪ กระบวนการเปลี่ยนเมทานอลเป็น โอเลฟิน: ทิศนะทางทฤษฎีต่อกลไกและการเร่งปฏิกิริยา ชาญ อินทร์แด่ม ▪ การตกผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตในไมโครอิมัลชันแบบรีเวิร์ส สุรัช รัชพันธ์ ▪ การพัฒนาโลหะอริเดียมกึ่งอินทรีย์เพื่อใช้เป็นโคโคตเร่งแสงชนิดอินทรีย์ รักเกียรติ จิตคคิ ▪ พืชชนิดพันธุ์ของ ภิกษณ์ จันทรสุริยะ, นงคราญ สระโสม ▪ การสังเคราะห์และปฏิกิริยาเคมีของอินโดล ทินกร แก้วอินทร์	52-59 60-66 67-81 82-92 93-100 101-107 108-119



SCIENCE JOURNAL
Ubon Ratchathani University
<http://scjubu.sci.ubu.ac.th>

วารสารวิทยาศาสตร์ ม. อุบลฯ ฉบับพิเศษ

ปีที่ 1 (มกราคม-ธันวาคม 2554) 10-20

บทความวิจัย
Research Article

เทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคแอม
เพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วไฟฟ้ากลาสีคาร์บอน
ที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์

A New Method for Evaluation of Total Antioxidant Capacity by
Flow Injection with Amperometric Detection on GC/CNT
Electrode

เสาวนีย์ เหล่าสิงห์¹, สิริธร อ่างแก้ว¹, มะลิวรรณ อมตวงไชย^{1,2*}

¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

² ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Souwanee Laosing¹, Sirithorn Angkeaw¹, Maliwan Amatongchai^{1,2*}

¹ Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science
Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani, 34190

² Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs)

Received: 26/04/2011; Accepted: 30/05/2011

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Antioxidant Capacity; TAC) แบบใหม่ ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วไฟฟ้ากลาสีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (FIA-GC/CNT) ในสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย ในการศึกษาด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีพบว่า caffeic acid สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ใช้ชั่วไฟฟ้ากลาสีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) ด้วยศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่าชั่วไฟฟ้ากลาสีคาร์บอน (GC) และยังให้สภาพไวที่

*Corresponding author. E-mail address: amaliwan@gmail.com or scmaliam@ubu.ac.th

ศึกษาข้อไฟฟ้า GC ประมาณ 10 เท่า ทั้งนี้เนื่องมาจากผลในการเร่งปฏิกิริยาของคาร์บอนนาโนทิวบ์ จากการศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 7 ชนิด (trolox, gallic acid, catechin, caffeic acid, ascorbic acid, quercetin และ rutin) ด้วยเทคนิคไฮโดรไดนามิกโวลแทมเมตรีพบว่า ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทุกชนิดที่สนใจคือ 0.40 โวลต์ จากการทดลองพบว่าระบบ FIA-GC/CNT ที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง มีขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ในระดับหนึ่งในล้าน การวิเคราะห์มีความเที่ยงสูงที่ร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 4.3 (จำนวนครั้งในการฉีดสาร = 20 ครั้ง) และสามารถวิเคราะห์ได้ 36 ตัวอย่างต่อชั่วโมง จากการทดสอบความน่าเชื่อถือของระบบที่ได้พัฒนาขึ้นโดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ TAC ในพืชพื้นบ้าน 4 ชนิด คือ สะเดาดิน ชะพลู ขอมะระ และ ผักโขม พบว่าปริมาณ TAC ที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกับปริมาณ TAC ที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคมาตรฐาน DPPH ระบบที่พัฒนาขึ้นมีความสะดวก รวดเร็ว ให้ผลการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ และเหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถด้านอนุมูลอิสระโดยรวมในพืชพื้นบ้านไทย

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ, โพลินเจคชันอะนาไลซิส, คาร์บอนนาโนทิวบ์, แอมเพอร์โรเมทรี

Abstract

A flow injection system based on amperometric detection of antioxidant compounds at glassy carbon modified with carbon nanotube (GC/CNT) electrode was developed as a new method for evaluation of total antioxidant capacity (TAC) in Thai indigenous plants. The electrooxidation of caffeic acid at GC/CNT electrodes and GC electrodes was investigated by use of cyclic voltammetry. Oxidation peak potential of caffeic acid obtained from GC/CNT is less positive than that obtained from GC electrode. The GC/CNT also provides approximately ten times better sensitivity than GC. The enhancement in peak current and the lowering of overpotential are clear evidences of catalytic effect of CNT toward the caffeic redox reaction. Hydrodynamic voltammetry was performed to find an optimum oxidation potential for 7 antioxidant standards (caffeic acid, trolox, gallic acid, catechin, ascorbic acid, quercetin and rutin). The optimum oxidation potential at 0.40 V versus Ag/AgCl reference electrode was obtained for all tested antioxidant standards. The developed system (FIA-GC/CNT) exhibits a wide linear dynamic range and a detection limit in ppm level. The system provides an impressively good precision (%RSD = 4.3) for injections ($n = 20$). Throughput of sample is 36 samples h^{-1} . The reliability of this method was tested by comparing TAC values obtained from this method with standard DPPH method. The results showed good agreement between these two methods. The developed method was rapid, possible for automation and convenient for TAC assay in Thai indigenous plants.

Keywords: Antioxidants, Flow injection analysis, Amperometric detection, Carbon nanotube.

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

12 เทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วไฟฟ้า

1. บทนำ

อนุมูลอิสระ (Oxidants) คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน [1] ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เป็นสารพวกเอนไซม์หรือสารอื่นที่สามารถชะลอหรือทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ไม่ให้เกิดต่อไป

ร่างกายของคนเรามีการสร้างอนุมูลอิสระจำพวก reactive oxygen species (ROS) [2] เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไฮดรอกซิลแรดิคัล ($HO^\bullet$) เปอร์ออกซิลแรดิคัล ($ROO^\bullet$) และซูเปอร์ออกไซด์แรดิคัล ($O_2^\bullet$) ขึ้นมาผ่านกระบวนการหายใจ ในคนปกติร่างกายจะมีระบบสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidative defense system) ที่เป็นเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น superoxide dismutase, catalase และ phospholipase และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ขึ้นมาเพื่อรักษาระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับสมดุล แต่ถ้าในสภาวะที่ระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระไม่อยู่ในระดับสมดุล คือมีปริมาณของสารอนุมูลอิสระมีมากเกินไปปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ สภาวะเช่นนี้เรียกว่าเกิด "สภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล" (oxidative stress) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ มากมาย เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular), อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease), พาร์กินสัน (Parkinson's disease) หรือแม้แต่การแก่ก่อนวัย (aging) [2,3] มีรายงานว่า การรับประทานสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินชนิดต่างๆ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฯลฯ ทั้งจากอาหาร

และผลิตภัณฑ์เสริม เช่น ยามีวิตามินรวม หรือสารสกัดจากพืชธรรมชาติ สามารถช่วยป้องกันร่างกายจากสภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลได้ [4]

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์, วิตามินเอ, วิตามินซี, หรือสารประกอบฟีนอลิก [5] เนื่องจากปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักสมุนไพรต่างๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายๆ ชนิดผสมกันอยู่ รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าคือสารใด ดังนั้นในความเป็นจริงการที่จะวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่างโดยแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างจึงเป็นการยาก และอาจไม่จำเป็น งานวิจัยส่วนมากจึงสนใจประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) มากกว่าที่จะต้องวิเคราะห์จนระบุชี้ชัดว่าเป็นสารใด การวัด TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า [6]

การวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง หรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจวัด โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือ สารที่นิยมใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระมักจะใช้สารประกอบ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [7] ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียรหรือใช้สารประกอบ

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

กลุ่มเอโซ เช่น 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) [8] ทำให้เกิดอนุมูล ABTS^{•+} ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารอนุมูลอิสระที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ทำการวิเคราะห์ได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์

เทคนิควิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมี (Electroanalytical) เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระอย่างแพร่หลาย [9-12] เพราะให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว มีสภาพไว (sensitivity) สูง ราคาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างต่ำ และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of Detection; LOD)ต่ำ งานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาพืชพื้นบ้านที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งจะทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยระบบโพลีอิเล็กชันอะนาไลซิส (flow injection analysis; FIA) ที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) เพื่อนำมาใช้ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในผักพื้นบ้านที่นิยมบริโภคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางด้านโภชนาการที่สามารถใช้เป็นประโยชน์ในการคัดเลือกรับประทานบริโภคอาหาร และใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดหาพืชที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติ

2. อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 อุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่นำมาใช้ในการตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมีในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย

เครื่องโพเทนชิโอสเตท Autolab รุ่น PG 12 (บริษัท Metrohm, Switzerland) ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า คือ ขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) ชนิดกลาสซีคาร์บอน (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm), ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) และขั้วไฟฟ้าช่วย (Auxiliary electrode) ชนิดพลาทินัม (Pt) (บริษัท CH Instruments, USA.)

2.2 สารเคมี

คาร์บอนนาโนทิวบ์ (CNT) (multi-wall carbon nanotubes, บริสุทธิ์ 95%) (NanoLab, USA.) สารอนุมูลอิสระ DPPH (AR grade บริษัท Sigma) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ได้แก่ ascorbic acid, caffeic acid และ catechin (AR grade จากบริษัท J.T.Baker), quercetin, gallic acid trolox (AR grade บริษัท ACROS) และ rutin (HPLC grade บริษัท Fluka) ตัวทำละลาย เอทานอล และเมทานอล (99.9% บริษัท Carlo Erba)

2.3 วิธีการวิจัย

2.3.1 การเตรียมขั้วไฟฟ้า

ก่อนนำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปดัดแปรเป็นขั้วไฟฟ้าชนิดต่าง ๆ จะนำขั้วไฟฟ้ามาทำความสะอาด โดยขัดผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาด โดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3 และ 0.05 μm ตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate ในน้ำเป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

-ขั้วไฟฟ้า GC/CNT

สารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ เตรียมโดยพัฒนาจากวิธีของ J. Wang [13] โดยชั่งคาร์บอนนาโนทิวบ์ 3.0 mg ใส่ใน

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

14 เทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วไฟฟ้า

- ก. ขวดขนาด 5 mL ปิเปตสารละลายโคเมธิล (FIA - GC/CNT) แสดงดังรูปที่ 1 ประกอบด้วยฟอร์มาลีนปริมาตร 1.00 mL ใส่ลงในขวด นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

หยดสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 mg.mL^{-1} บนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน $20 \mu\text{L}$ ที่ไว้ในแห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้าขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT)

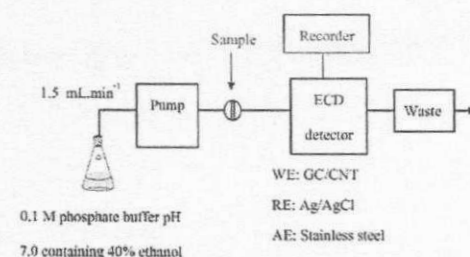
2.3.2 การเตรียมตัวอย่าง

ผักพื้นบ้านที่ใช้ในงานวิจัยทั้ง 4 ชนิดได้แก่ ยอดมะระ สะเดา คื่นช่าย และผักโขม นำผักทั้ง 4 ชนิดมาล้างทำความสะอาดให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักที่คงที่ นำไปบดหรือปั่นให้ได้ตัวอย่างแห้งที่เป็นเนื้อเดียวกัน

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสารตัวอย่างพัฒนาจากวิธีของ S. Silva [14] โดยชั่งตัวอย่างแห้งหนัก $2.5 \pm 0.0001 \text{ g}$ สกัดเพื่อกำจัดเม็ดสี (pigment) และไข (wax) ด้วยเฮกเซนปริมาตร 25.00 mL (สกัด 3 ครั้ง) นำตัวอย่างที่เหลือจากการสกัดมาสกัดด้วย 80% เมทานอล ปริมาตร 25.00 mL และ 2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ปริมาตร 5.00 mL (สกัด 3 ครั้ง) นำชั้นของเหลวที่สกัดได้มารวมกัน จากนั้นกรองผ่านแผ่นกรองขนาด $0.45 \mu\text{m}$ เก็บตัวอย่างในภาชนะสีชาที่มีฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิประมาณ 7°C

2.3.2 การตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (FIA - GC/CNT)

ระบบโพลินเจกชันที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงระบบโพลินเจกชันอนาลิซิสที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วไฟฟ้า GC/CNT

2.3.3 การตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยวิธี DPPH

ปิเปตสารละลาย DPPH ความเข้มข้น $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ปริมาตร 2.90 mL ใส่ใน cuvette เดิมเมทานอล ปริมาตร 0.10 mL ใน cuvette เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ($A_{\text{CH}_3\text{OH}}$) สร้างกราฟมาตรฐานโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ (10, 20, 80, 120, และ 150 ppm) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน trolox แทนเมทานอล (A_{std}) คำนวณหาค่า % DPPH Scavenging Activity โดยใช้สมการที่ 1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยพล็อตระหว่างความเข้มข้นของ trolox กับค่า % DPPH Scavenging Activity

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

$$\%DPPH \text{ Scavenging Activity} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{std}}}{A_{\text{CH}_3\text{OH}}} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรตัวอย่างแทนเมทานอลคำนวณหาค่า %DPPH Scavenging Activity และปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ mg of trolox g^{-1} of sample [15]

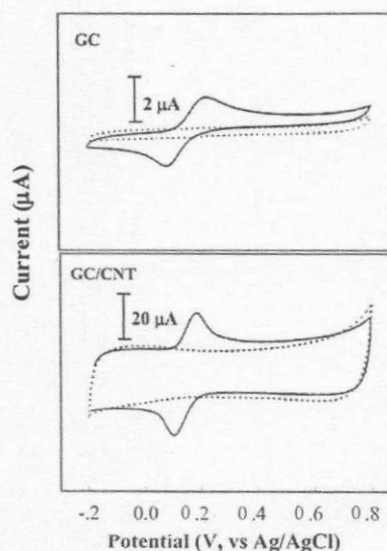
3. ผลการวิจัย

3.1 ไซคลิกโวลแทมเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC และ GC/CNT

การศึกษาไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid จะศึกษาการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) และขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2

จากรูปพบว่าเมื่อใช้ GC เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานปฏิกิริยาออกซิเดชันของ caffeic acid เกิดที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.23 V มีค่ากระแสที่ออกแอโนดิก (I_{pa}) เท่ากับ 1.57 μA แต่เมื่อใช้ขั้ว GC/CNT เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.19 V และ I_{pa} มีค่าเท่ากับ 15.20 μA เมื่อพิจารณาที่ค่าศักย์ออกซิเดชันและค่ากระแสที่ออกแอโนดิก พบว่าขั้วไฟฟ้า GC/CNT จะให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่าของขั้วไฟฟ้า GC และให้ค่ากระแสที่ออกแอโนดิกที่สูงกว่าขั้วไฟฟ้า GC แสดงว่าเมื่อนำคาร์บอนนาโนทิวบ์ซึ่งมีสมบัติเฉพาะตัวคือมีพื้นที่ผิวสูงและนำไฟฟ้าได้ดี มาดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน คาร์บอนนาโนทิวบ์จะแสดงสมบัติของ electro-catalytic activity ทำให้

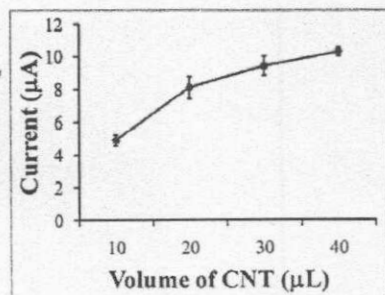
ขั้วไฟฟ้าที่ได้จากการดัดแปรสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ค่าศักย์ที่ต่ำลง สอดคล้องกับผลการทดลองของ A. B. Moghaddam [16] ซึ่งศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของ caffeic acid ที่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ชนิด graphite ธรรมดาเทียบกับ ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนนาโนทิวบ์ (single wall) ผสมกับผงกราฟไฟต์ (CNT:graphite) และพบว่าคาร์บอนนาโนทิวบ์ทำให้ขั้วไฟฟ้าที่ได้จากการดัดแปรสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ค่าศักย์ที่ต่ำลง และให้ค่ากระแสที่สูงขึ้นเช่นกัน



รูปที่ 2 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ caffeic acid ความเข้มข้น 40 ppm ที่ขั้วไฟฟ้า GC และที่ GC/CNT (เส้นทึบ) และ background current (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40%) (เส้นประ) อัตราเร็วในการสแกน 0.01 Vs^{-1}

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

16 เทคนิคตรวจวัดความสามารถด้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วฟ้า



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ caffeic acid กับปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในการคัดแปรชั่วฟ้า

สำหรับงานวิจัยนี้การใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ชนิด multi-wall มาคัดแปรชั่วฟ้าทำให้ได้ค่ากระแสไฟฟ้าที่ขุดแอดโนดิกที่สูงกว่าชั่วฟ้า GC ประมาณ 10 เท่า

3.2 ผลของปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในการคัดแปรชั่วฟ้า

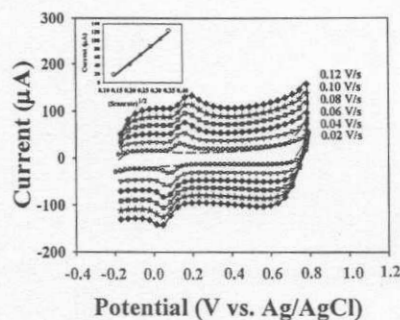
ในการศึกษาหาปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสมในการคัดแปรชั่วฟ้า จะเตรียมชั่วฟ้า GC/CNT โดยใช้สารละลายของคาร์บอนนาโนทิวบ์ (3 mg.mL^{-1}) ปริมาตรต่างๆ ผลของปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ต่อการตรวจวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ caffeic acid แสดงดังรูปที่ 3 ค่ากระแสออกซิเดชันในรูปเป็นค่าเฉลี่ยจากชั่วฟ้าที่เตรียมขึ้น 3 ชั่วฟ้า ส่วนแถบความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวัด

จากผลการทดลอง เมื่อปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์เพิ่มขึ้นจาก 10 - 30 μL ค่ากระแสที่ได้เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเป็นผลมาจากสมบัติของ

คาร์บอนนาโนทิวบ์ซึ่งเป็นสารที่มีพื้นที่ผิวสูงและมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี เมื่อมีปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์มากขึ้นจึงทำให้สามารถวัดค่ากระแสที่ได้เพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์สูงถึง 40 μL ค่ากระแสที่ได้เริ่มคงที่ ซึ่งเป็นผลจากการนำไฟฟ้าได้ดีของคาร์บอนนาโนทิวบ์ ทำให้ค่ากระแสพื้น (background; B) มีขนาดใหญ่ขึ้น สัญญาณ (Signal; S) จากค่ากระแสออกซิเดชันของ caffeic acid เมื่อลบด้วยค่ากระแสพื้น (S/B) จึงมีค่าเพิ่มขึ้นไม่มากนัก ดังนั้นจึงเลือกปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ 30 μL เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการคัดแปรชั่วฟ้า

3.3 ผลของอัตราเร็วในการสแกน (Scan rate dependence study)

ในศึกษาการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าของชั่วฟ้าทำงาน จะศึกษาผลของอัตราเร็วในการ



รูปที่ 4 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ caffeic acid ความเข้มข้น 40 ppm ที่อัตราเร็วในการสแกนค่าต่างๆ (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 และ 0.12 V.s^{-1}) ภาพแทรกเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสที่ขุดแอดโนดิกกับค่าสแควร์รุธของอัตราเร็วในการสแกน

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สแกนต่อไซคลิกโวลแทมโทแกรมของ caffeic acid ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4

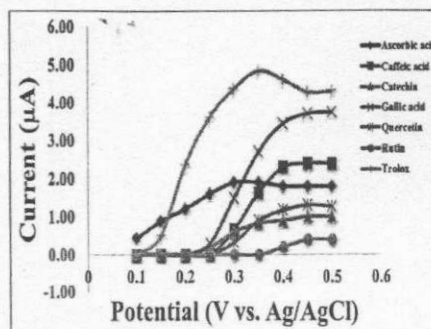
จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อใช้อัตราเร็วในการสแกนที่สูงขึ้น ค่ากระแสที่ได้มีค่าสูงขึ้น โดยเมื่อนำค่ากระแสที่ยอดแอโนดิกมาพลอตกับค่าสแควร์รูทของอัตราเร็วในการสแกน (ดังภาพแทรก)

พบว่าได้กราฟที่มีความสัมพันธ์แบบเป็นเส้นตรง ($r^2 = 0.997$) แสดงว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นถูกควบคุมจากกระบวนการแพร่ (diffusion control process) และไม่เกิดการดูดซับที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน GC/CNT แสดงว่าขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีคุณสมบัติที่ดี สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระได้

3.4 ผลการศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี

สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่สนใจมี 7 ชนิด คือ caffeic acid, ascorbic acid, catechin, gallic acid, quercetin, trolox และ rutin เนื่องจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ที่พบในพืชสมุนไพร [9, 17, 18] ในการศึกษาเพื่อหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจะใช้เทคนิคไฮโดรไดนามิกโวลแทมเมทรี โดยฉีดสารต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้น 30 ppm ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มีเอทานอล 40% ในระบบ FIA-GC/CNT ที่พัฒนาขึ้น (รูปที่ 1) และป้อนศักย์ไฟฟ้าในช่วงศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 0.01 – 0.50 V โดยการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าครั้งละ 0.05 V ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5

พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถเกิดออกซิเดชันที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT ได้ง่ายโดยใช้ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.2 V คือ trolox และ ascorbic



รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับค่าความสูงของพีคค่ากระแสแอโนดิกที่ได้จากการวัด เมื่อฉีดสารมาตรฐานสารต้านอนุมูลอิสระลงในระบบ FIA-GC/CNT (รูปที่ 1)

acid ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระ quercetin, catechin, caffeic acid และ gallic acid ต้องใช้ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.3 V จึงจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ rutin ต้องใช้ศักย์ที่สูงที่สุดคือ 0.4 V ถึงจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 7 ชนิดที่สนใจ คือ 0.4 V เนื่องจากศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่า 0.40 โวลต์ สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดเช่น rutin ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงไม่สามารถวัดค่ากระแสได้

3.5 คุณสมบัติ (Analytical features) ของระบบวิเคราะห์ FIA-GC/CNT ที่พัฒนาขึ้น

ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยระบบ FIA-GC/CNT ที่พัฒนาขึ้น แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าในระบบที่ได้พัฒนาขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระ ascorbic acid, caffeic acid, catechin, gallic acid, quercetin และ rutin ให้ช่วงการตอบสนองแบบเส้นตรงในช่วง 2.5 – 60 ppm ส่วน trolox อยู่ในช่วง 5 – 150 ppm

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

18 เทคนิคการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วฟ้า

สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานมีค่า r^2 มีค่าซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 (0.9838 – 0.9998) ถือว่ายอมรับได้ และมีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ของสารต้านอนุมูลอิสระในระดับ ppm (0.11–1.08 ppm) ค่ากระแสที่ได้จากการวัดมีความเที่ยง (precision) คือมากคือให้ค่า %RSD เท่ากับ 4.3 (สัญญาณของ trolox ความเข้มข้น 5 ppm, $n = 20$) และสามารถวิเคราะห์ได้ 36 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

3.6 การวิเคราะห์ TAC ด้วยระบบวิเคราะห์ FIA-GC/CNT ในตัวอย่างพืชพื้นบ้าน

ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมหรือ TAC ในสารสกัดจากพืชพื้นบ้านจะรายงานในหน่วย trolox equivalent (mg trolox.g⁻¹ sample) รูปที่ 6 แสดงปริมาณ TAC ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FIA-GC/CNT และ วิธีมาตรฐาน DPPH

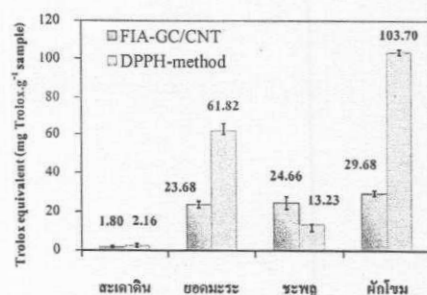
จากผลการทดลองในรูปที่ 6 พบว่าเมื่อพิจารณา ลำดับของปริมาณ TAC ที่พบในสารสกัดพืชพื้นบ้าน 4 ชนิด ที่ได้จากเทคนิควิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (FIA-GC/CNT) จากมากไปน้อยคือ ผักโขม ชะพลู ยอดมะระ และสะเดาเคียน และผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธี

มาตรฐาน DPPH พบว่าปริมาณ TAC ในผักพื้นบ้านเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ คือ ผักโขม ยอดมะระ ชะพลู และสะเดาเคียน ตามลำดับ

โดยทั่วไปปริมาณ TAC ที่พบในเทคนิคมาตรฐาน DPPH จะมีปริมาณสูงกว่าปริมาณที่พบด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น ยกเว้นในยอดชะพลู ซึ่งปริมาณ TAC ที่พบจากเทคนิค DPPH ทั้งนี้อาจเนื่องจากในยอดชะพลูมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ทางไฟฟ้าเคมี (electroactive species) สูงเมื่อเทียบกับผักพื้นบ้านชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ

เมื่อนำค่า TAC จากทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกันพบว่า ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณของ TAC (mg of trolox.g⁻¹ of sample) ในสารสกัดผักพื้นบ้านไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วย t -test [19] ($t_{\text{observed}} = 1.30$, $t_{\text{critical}} = 3.18$) ดังนั้นเทคนิคการวิเคราะห์ TAC ด้วยระบบ FIA-GC/CNT ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการประเมินหาความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในตัวอย่างพืชพื้นบ้านได้ดี และมีข้อดีคือวิเคราะห์สะดวกเพราะเป็นแบบอัตโนมัติ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นกว่าเทคนิคมาตรฐาน DPPH

นอกจากนี้การวิจัยในครั้งนี้ยังพบว่า ผักโขม ชะพลู และยอดมะระมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ P. Maisuthisakul [18] ซึ่งรายงานว่ายอดมะระ (*Momordica charantia* Linn.) มีปริมาณสารประกอบต้านอนุมูลอิสระชนิดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สูง และผักพื้นบ้านไทยหลายชนิดที่มีรสฝาดหรือขม มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี โดยมักพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงเช่นกัน



รูปที่ 6 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการทดลองทั้งสองวิธี เทคนิคที่พัฒนาขึ้น (FIA-GC/CNT) กับเทคนิคมาตรฐาน (DPPH method)

ลิขสิทธิโดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพระบบ FIA- GC/CNT ในการวิเคราะห์สารละลายสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทั้ง 7 ชนิด

Antioxidants	Linearity range (ppm)	Calibration equation	Correlation coefficient (r^2)	Limit of detection (ppm)
ascorbic acid	2.5 - 60	$y = 0.1317x + 0.1162$	0.9991	1.08
caffeic acid	2.5 - 60	$y = 0.1782x + 0.5254$	0.9898	0.11
catechin	2.5 - 60	$y = 0.1650x + 0.0807$	0.9998	0.41
gallic acid	2.5 - 60	$y = 0.1463x + 0.4018$	0.9979	0.15
quercetin	2.5 - 60	$y = 0.1911x - 0.2448$	0.9838	0.46
rutin	2.5 - 60	$y = 0.1518x + 0.1702$	0.9970	0.39
trolox	5 - 150	$y = 0.1554x + 0.1162$	0.9998	0.20

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Antioxidant Capacity; TAC) ผลการทดลองจากไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารต้านอนุมูลอิสระ caffeic acid พบว่าขั้วไฟฟ้า GC/CNT มีสภาพไวที่สูงกว่าในขั้วไฟฟ้า GC ธรรมดา 10 เท่า ได้นำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใช้เป็นตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบฟลูอิดเจคชันอะนาลิซิส (FIA-GC/CNT) ผลการทดลองพบว่าเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นให้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงในช่วงที่กว้างในสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบ โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ในระดับ ppm จากการวิเคราะห์

ประสิทธิภาพของระบบที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ TAC ในพืชพื้นบ้านจำนวน 4 ชนิด (ผักโขม ชะพลู ยอดมะระ และสะเดาดิน) พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับเทคนิคมาตรฐานวิธี DPPH เทคนิค FIA-GC/CNT ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่รวดเร็ว การวิเคราะห์เป็นแบบอัตโนมัติ สะดวกและเหมาะสมกับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในพืชพื้นบ้าน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2552 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัย

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

- [1] ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์, ประกาศิ์ ภูวเสถียร และ ริญ เจริญศิริ. (2538). *โภชนาการและส่งเสริมสุขภาพ*, กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- [2] Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (1998). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press: Oxford, UK.
- [3] โอภา วัชรกุลป์, ปรีชา บุญสูง, จันทนา บุญรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ (*Radical Scavenging Agents*) กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์.
- [4] Packer, L., Hiramatsu, M., & Yoshikawa, T. (1999). *Antioxidant food supplements in human health*. Academic Press: London, UK.
- [5] Zulueta, A., Esteve, M.J., Frasset, I., & Frigola, A. (2007). Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chem.*, 103(4), 1365-74.
- [6] Wang, H., Cao, G., & Prior, R.L. (1996). Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 44(3), 701-5.
- [7] Brandwilliams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25-30.
- [8] Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84, 407-12.
- [9] Milardovic, S., Ivekovic, D., & Grabaric, B.S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical, *Bioelectrochemistry*. 68, 175-80.
- [10] Buratti, S., Pellegrini, N., Brenna, V., & Mannino, S. (2001). Rapid Electrochemical Method for the Evaluation of the Antioxidant Power of Some Lipophilic Food Extracts, *Agric. Food Chem.*, 49, 5136-41.
- [11] Buratti, S., Benedetti, S., & Cosio, M.S. (2007). Evaluation of antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis, *Talanta*, 71, 1387-92.
- [12] Liliya, K., Marina, A., Khena, Z. & Alla, V. (2006). Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts, *Anal. Chem. Acta.*, 573, 419-26.
- [13] Wang, J. & Musameh, M. (2004). Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified-electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 511, 33-6.
- [14] Silva, S., Gomes, L. Leitao, F., Coelho, A.V., & Boas, L.V. (2006). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves, *Food Sci. Technol. Int.* 12, 385-96.
- [15] Huang, D., Ou B., & Prior R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. of Agric. Food Chem.* 53(6), 1841-56.
- [16] Moghaddam, B., & et al. (2007). Electrochemical behavior of caffeic acid at single-walled carbon nanotube: graphite-based electrode, *Biophysical Chemistry*, 128, 30-7.
- [17] Cosio, M. et al. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the *Labiata* family, *Food Chemistry*, 97, 725-31.
- [18] Maisuthisakul, P., Suttajit, M., & Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants, *Food Chemistry*, 100, 1409-18.
- [19] Miller, J.H., & Miller, J.C. (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th edition, Pearson Education Ltd., Essex, UK.

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode

M. Amatatongchai^{a,b,*}, S. Laosing^a, O. Chailapakul^c, D. Nacapricha^{b,d}

^a Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

^b Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs), Thailand

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^d Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2012

Received in revised form

12 April 2012

Accepted 19 April 2012

Available online 26 April 2012

Keywords:

Carbon nanotube

DPPH[•]

Total antioxidant capacity

Amperometric detection

Flow injection analysis

ABSTRACT

An amperometric flow injection (FI) method suitable for evaluation of 'total antioxidant capacity' (TAC) is presented. In this method, a carrier stream of a solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) continuously flows through an electrochemical cell, furnished with a carbon nanotube modified-glassy carbon electrode (CNT/GC) as the working electrode. At the applied voltage of 0.05 V (vs. Ag/AgCl), DPPH[•] is reduced resulting in a constant electric current. For measurement of the TAC, a sample zone containing antioxidant(s) is injected into the carrier stream therein reduction reaction of DPPH[•] occurring within the sample zone. The decreased amount of the radical in the sample zone leads to a drop of the amperometric signal at the CNT/GC electrode. We have also compared the performance of the CNT/GC electrode to the unmodified GC electrode using cyclic voltammetry. The sensitivity of the CNT/GC electrode was more than twenty five times greater than the bare GC electrode. The study of the sweep rate dependence showed that the cathodic and anodic current of 0.1 mM DPPH[•] solution varied linearly ($r^2=0.998$) with the square root of the scan rate, from 0.02 to 0.12 Vs⁻¹. These results demonstrated that the CNT/GC electrode is appropriate for the quantitation of antioxidants via amperometric detection of the residual concentration of non-reacted DPPH[•]. We obtained linear calibrations for all the antioxidants tested including gallic acid, catechin, quercetin, caffeic acid and Trolox. The system offers rapid sample throughput (45 samples h⁻¹) and good precision of 3.2% R.S.D., for 20 μ L-injection of 2.5 μ M Trolox ($n=30$). This method was applied to evaluate the TAC of extracts of some Thai indigenous vegetables.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The protective effect against 'oxidative stress' [1,2] by dietary intake of antioxidant compounds, either as food additives or as pharmaceutical supplements, has been widely recognized [2,3]. Antioxidant compounds from natural sources like phenolic acids, polyphenols and flavonoids can scavenge free radicals and reactive oxygen species (ROS) such as H₂O₂ and O₂^{•-} that are present in biological fluids, and thereby inhibit the 'oxidative stress' [2]. Primary sources of naturally occurring antioxidants are whole grains, fruits and vegetables. Antioxidants from fruits and vegetables, such as vitamin C, vitamin E, carotenes, and phenolic acids

have also been shown to scavenge ROS, that can damage lipid and protein [3]. Thus, it is believed that consumption of food containing antioxidants can reduce the oxidative stress condition in our body as well as delay aging [4,5].

There has been an increasing number of assessments of 'total antioxidant capacity' (TAC) in medicinal plants and biological fluids. A variety of assays have been developed, including colorimetric [6–9], fluorimetric [10,11], and chemiluminescence [12–15] methods. Colorimetric method is based on reaction between a chromogenic radical and the antioxidant. These, chromogenic compounds include 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) [16,17] and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) [18,19], which react directly and rapidly with most antioxidant compounds.

DPPH[•] free radical reacts with an antioxidant (AH) or a radical species (R[•]) according to reactions (1) and (2).



* Corresponding author at: Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand. Tel.: +66 45 353 400x4576; fax: +66 45 288 379.

E-mail addresses: scmaliam@ubu.ac.th, amaliwan@gmail.com (M. Amatatongchai).

0039-9140/\$ - see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.029>

Antioxidant can donate a hydrogen atom to DPPH[•] and thus decrease the concentration of the stable free radical (DPPH[•]), resulting in the color change from violet to pale yellow. Non-reacted DPPH[•] can be monitored by spectrometric or electrochemical method [20].

In the spectrometric method, the absorbance of DPPH[•] is measured at 518 nm. This method was first reported in 1958 by Blois [18] and further modified by Brand-Williams et al. [21]. It is the commonly accepted assay for evaluating the antioxidant content in various types of samples including, wine [22], fruit [23], medicinal plant extracts [24], synthesized compounds [25,26] and purified natural compounds [27,28]. Recently an automatic procedure for DPPH[•] assay was developed based on multi-syringe flow injection analysis (MSFIA) [29] for screening and evaluation of antioxidant scavenging capacity. Although these methods are simple, colorimetric detection of DPPH[•] is prone to interference from color and turbidity of the samples. The methods usually require a pretreatment of samples. Separation of color or matrix interferences by HPLC with post-column detection using DPPH[•] is one strategy for colored samples with complex matrices [30,31].

For analysis of antioxidant in colored or complex samples, electrochemical methods are more advantageous than spectrometric. Cyclic voltammetry with glassy carbon (GC) electrode has been used for evaluation of antioxidant capacity of blood plasma, tissue homogenates and some plant extracts [32]. Voltammetric behavior of some antioxidants was investigated by using differential pulse voltammetry on GC electrode [33]. Amperometric analysis of antioxidant on GC electrode in flow injection (FI) format was also reported for determination of total phenolic compounds in foods [34] and of antioxidant capacity in honey, propolis and royal jelly [35]. An automated ABTS^{•+} assay by sequential injection analysis (SIA) was developed by Chan-Eam et al. [36] using amperometric detection on GC electrode for analysis of TAC in instant ginger infusion beverages.

Carbon nanotubes (CNT) form an increasingly important group of nanomaterials with unique geometrical, mechanical, electronic and chemical properties [37,38]. Such properties of CNT make them extremely attractive for use in electrochemical detection. Recent studies [39,40] demonstrated that CNT can impart high electrocatalytic activity and decreased surface fouling to electrochemical devices. In view of these remarkable properties of the CNT, a number of applications, employing this relatively new material for electrochemical quantitation, have been reported. CNT graphite-based electrode was employed and its performance was investigated using caffeic acid as a model compound [41]. A modified GC electrode with CNT and Nafion was used to demonstrate its selectivity towards quercetin, which has anti-inflammatory and antioxidant properties [42]. However, in evaluation of the total antioxidant capacity (or TAC) in food and plant extracts, the measurement of the capacity arising from the presence of all compounds that can inhibit the oxidative reactions is desired. Thus, selectivity towards a single compound is therefore not necessary. Although CNT-modified carbon electrodes have been used for electrochemical detections of some compounds with antioxidant activity [41,42], none of these studies are suitable for rapid screening of TAC. In drug discovery, where there is large number of samples for TAC screening per day, a flow technique is more suitable.

This work describes the development of an electrochemical method based on the use of stable radical DPPH[•] as an alternative to the spectrometric DPPH[•] methods, which are not suitable for colored plant extracts. In this system, we monitored amperometric signal from reduction reaction of DPPH[•] at a CNT modified glassy carbon electrode, as the radical is continuously flowed through the electrochemical flow-cell. Injection of a plug of a

solution containing antioxidant will decrease the amount of the DPPH[•] from the reaction between antioxidant and the radical. The drop of the DPPH[•] signal from baseline level is related to the amount of the reacted DPPH[•] in the plug. It has been demonstrated that at the optimized voltage, the system could detect five major antioxidant compounds such as caffeic acid, quercetin, gallic acid, catechin and Trolox. In this work, we focused on the analysis of some ethanol-soluble and water-soluble antioxidants typically present in selected food and plants. The proposed method was applied to determine TAC in extracts of various Thai indigenous vegetables.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagent

All chemicals used were of analytical reagent grade. Deionized-distilled water was employed for standard and reagent preparations.

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), quercetin, gallic acid and caffeic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Catechin and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were purchased from Acros Organic (Geel, Belgium). A stock solution (5 mM) of DPPH was prepared by dissolving the appropriate amount in absolute ethanol (Carlo Erba; Milan, Italy). The DPPH solution was ultra-sonicated (Crest 575HT, NJ, USA) for about 2 h and kept in the dark to minimize decomposition by light. Ten millimolar standard solutions of water-soluble antioxidants (Trolox and gallic acid) were prepared using deionized-distilled water. Other antioxidants were prepared in absolute ethanol. Phosphate buffer (0.03 M, pH 7.0) containing 0.03 M KCl and absolute ethanol (60:40, v/v) was used as the buffer electrolyte in all electrochemical measurements.

2.2. Preparation of plant extract

Thai indigenous plants were purchased from the local supermarkets in Ubon Ratchathani Province, Thailand. Six vegetables (tummy wood, red-bead tree, rice paddy herb, metchun, smartweed and teaw) were selected as samples for TAC assay. Botanical names of these vegetables are *Careya sphaerica* Roxb. (tummy wood), *Adenanthera pavonina* Linn. (red-bead tree), *Limnophila aromatica* Merr. (rice paddy herb), *Syzygium gratum* (Wright) S.N. (metchun), *Polygonum odoratum* Lour. (smartweed), and *Cratogeomys formosum* Dyer (teaw).

The extraction scheme previously described by Silva et al., for fruits and leaves [43] was adopted. Fresh vegetable leaves were dried in an oven at 40 °C for 48 h to constant weight, followed by powdering in mortar. Three consecutive extractions with hexane (3 mL × 25 mL) were performed on 2.5 g portions of plant powder to remove both pigments and lipids. Centrifugation (ALC Centrifuge 4218, Milano, Italy) at 3000 rpm was carried out for 5 min and the organic solvent discarded. A 10 mL aliquot of 2% (w/v) of aqueous sodium metabisulphite was then added to the solid residue (to stabilize the antioxidant), followed by 25 mL methanol:water (80:20, v/v). The supernatant was separated out and the solid further extracted two times with the methanol:water solution. The 3 methanolic fractions were pooled together before filtering through a 0.25 µm cellulose membrane prior to the determination of TAC.

2.3. Preparation of the CNT-modified GC electrode

The multi-wall carbon nanotubes (ca. 95% purity) were purchased from NanoLab Inc. (MA, USA). The CNT were further

purified by stirring in a 2 M nitric acid solution for 20 h at room temperature, followed by repeated washing with deionized-distilled water before drying in an oven at 120 °C. Purified CNT was immobilized onto a polished GC electrode (CH Instrument, USA) using dimethylformamide (DMF) as the dispersing agent. A 2 mg portion of CNT was added to 1 mL of DMF, followed by sonication for 3 h. A suitable volume of CNT mixture in DMF was casted on the surface of GC electrode. The electrode was allowed to dry at room temperature for 1 h in a fume hood. Finally, the electrode was rinsed with deionized-distilled water before use. In this work, cyclic voltammetric study was carried out to find the optimal volume of CNT mixture required for the casting process.

2.4. Cyclic voltammetry

An Autolab potentiostat PGSTAT 12 (Eco-chemie, Netherlands), equipped with the GPES 4.9 software, was used for all the cyclic voltammetric studies. The active surface area of the GC electrode was approximately 0.07 cm². A three-electrode system, consisting of the working electrode (GC or CNT/GC electrode), a reference electrode (Ag/AgCl/KCl (sat.)) and a counter electrode (platinum wire) was employed. Measurements were carried out in the phosphate-ethanol buffer solution as supporting-electrolyte.

2.5. Amperometric detection of DPPH• on CNT/GC electrode by flow injection

Fig. 1 shows schematic diagram of the FI system for amperometric detection of DPPH• at CNT/GC electrode. A Shimadzu pump (model LC-10AD, Japan) was used for the liquid flow. A Rheodyne injector (model 7725, USA), fitted with 20 µL sample loop was used for injecting antioxidant standards and samples. Electrochemical measurements were carried out with a Shimadzu electrochemical flow-through detector (model L-ECD-6A, Japan). Chromatographic software Class VP 6.0 was used for data collection and processing. The area of working electrode was 0.36 cm². Amperometric detection was monitored for a flow of 0.25 mM DPPH• in the phosphate-ethanol buffer solution. This DPPH• solution was used as the carrier stream in the FI experiments. Trolox was utilized as the reference antioxidant. A change in amperometric signal was plotted against the concentration of Trolox to give the calibration curve.

2.6. The colorimetric method

A colorimetric method, based on measurement of the percentage of scavenging activity of DPPH• as a function of the concentration of Trolox, was employed for validation. This method was adopted from the method of Boateng et al. [44]. Plant extract (0.1 mL) was added to 2.9 mL of methanolic solution of DPPH• (6 × 10⁻⁵ M). The solution was shaken, stored in the dark for 1 h and the absorbance was measured at 517 nm. All the plant extracts had no absorbance at 517 nm. For control, 0.1 mL methanol was used. The percentage DPPH• scavenging activity of

the sample was calculated using Eq. (3), where A_{control} is the absorbance of the control (DPPH• solution without test sample) and $A_{\text{std/sample}}$ is the absorbance after addition of standard or test sample.

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} \text{ radical scavenging activity} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{std/sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad (3)$$

Radical scavenging activity of extracts was expressed in terms of milligrams of Trolox equivalent per gram of dry plant (mg of Trolox g⁻¹ of sample) using the calibration curve of Trolox.

2.7. Method validation

Samples of Thai vegetable extracts were evaluated for TAC equivalent to the Trolox radical scavenging activity using the developed amperometric flow system in Fig. 1. Sample solutions were diluted (5 or 10 times) before injection. The amperometric results are compared with the results obtained from the colorimetric method [44].

3. Results and discussion

3.1. Cyclic voltammetry of DPPH• on GC and CNT/GC electrodes

Fig. 2(a) shows the cyclic voltammograms (CVs) for DPPH• solution, together with corresponding background from GC and CNT/GC electrodes. The CNT/GC exhibited well defined reversible peaks at 0.327 and 0.305 V, whereas the GC electrode exhibited the oxidation and reduction peaks at 0.362 and at 0.310 V, respectively. The potential differences between the oxidation and reduction peaks were 22 mV (CNT/GC) and 52 mV (GC). The reduction peak current, after background subtracted, was 0.41 µA for GC electrode and was 10.40 µA for CNT/GC electrode. The peak current obtained from the CNT/GC was approximately 25 times greater than that obtained from GC electrode. Therefore, it is expected, that CNT/GC electrode should provide a better sensitivity than bare GC electrode.

The electrochemical mechanism of DPPH• on CNT/GC electrode has not been investigated. However, there have been some reports of cyclic voltammograms of DPPH• on GC electrodes [45,46] and on a paraffin-impregnated graphite electrode (PIGE) [47]. In these works, the authors observed the oxidation of DPPH•, similarly to what is observed in Fig. 2(a). These authors suggested that the anodic and cathodic peaks belong to B/B' redox couple as shown in Scheme 1. Therefore, it is likely that the oxidation behavior of DPPH• at CNT/GC and GC are the same as that reported in the system of Milardovic et al. [45,46] and Zhuang et al. [47].

Fig. 2(b) shows the cyclic voltammograms of a DPPH• solution on CNT/GC at various scan rates. As shown in the inset of Fig. 2(b), cathodic and anodic peak currents (µA) vary linearly with the square root of scan rate (V^{1/2}s^{-1/2}) within the scan range of 0.02–0.12 V s⁻¹. Linear regression analysis gave r^2 value of 0.998. These

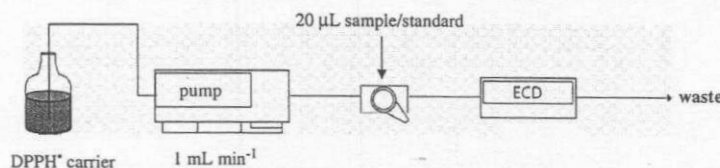


Fig. 1. FI manifold for evaluation of TAC with amperometric detection using carbon-nanotubes modified glassy-carbon (CNT/GC) as a working electrode (WE). Optimal conditions: potential, 0.05 V (vs. Ag/AgCl); carrier, 0.25 mM DPPH in phosphate buffer solution (0.03 M, pH=7.0) containing 0.03 M KCl and 40% (v/v) ethanol; flow rate, 1 mL min⁻¹.

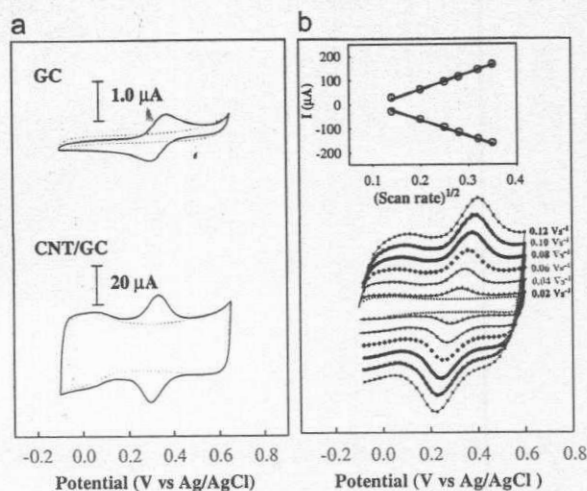
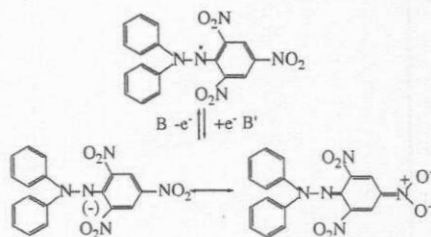


Fig. 2. Cyclic voltammetric results of 0.1 mM of DPPH in 0.03 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.03 KCl in 40% (v/v) ethanol showing (a) CVs obtained from GC and CNT/GC electrodes using scan rate of 0.01 Vs⁻¹ (solid line); background voltammograms are shown as dotted lines (b) CVs obtained at various scan rates on CNT/GC electrode with the inset showing the linear relationship between the reduction currents and the square root of the scan rate, slope of 683.52 $\mu\text{A} (\text{sV}^{-1})^{1/2}$ and $r^2=0.998$.



Scheme 1. Mechanism of oxidation/reduction of DPPH*.

results indicated that the current is limited by semifinite linear diffusion of DPPH* to the CNT/GC electrode.

The effect of buffer pH on reduction peak current and peak potential was investigated for pH 5–8 using the 0.03 M phosphate buffer containing 0.03 M KCl and 40% (v/v) ethanol as supporting electrolyte (Fig. 3a). It was observed that the values of peak potential shifted slightly towards less positive values when the pH increased. Fig. 3(b) shows the linear dependency ($r^2=0.997$) observed in the pH range of 5–8 with a slope of -56.3 mV/pH . This value of the slope indicates the exchange of one electron in the electrochemical reduction of B/B' redox couple at CNT/GC. Fig. 3(c) shows that the maximum peak current was observed at pH 7.0. Thus, pH 7.0 was selected as the optimum pH for amperometric detection of DPPH*.

3.2. Optimization of the CNT loading

Optimization of the amount of CNT was first investigated using cyclic voltammetry to find the most sensitive condition to detect DPPH*. The experiment was carried out by casting the mixture of CNT in DMF (2 mg mL^{-1}) with 10, 20, 30 and 40 μL , onto the bare GC electrode. Every electrode compositions yielded linear calibration plots over the tested concentration range from 0.025 to 0.100 mM DPPH* (data not shown). The sensitivity (slope) increased with increasing CNT loading, from 10 to 30 μL .

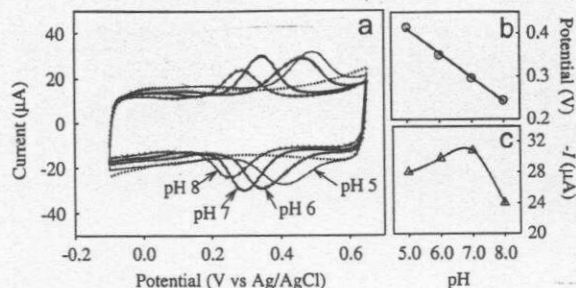


Fig. 3. Results from cyclic voltammetry at various pHs for 0.1 mM of DPPH* in 0.03 M phosphate buffer containing 0.03 KCl and 40% (v/v) ethanol showing (a) CVs on CNT/GC electrode, (b) peak potential and (c) peak current for various pH.

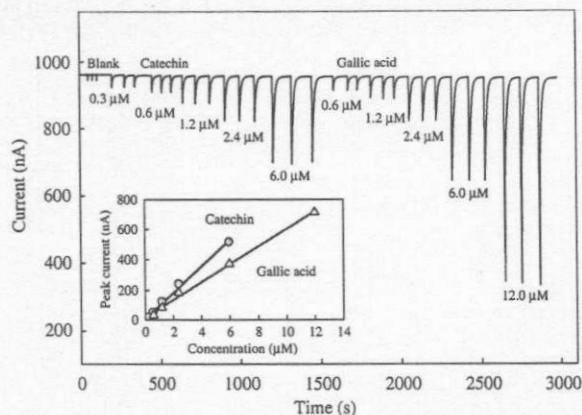


Fig. 4. Examples of signal profiles of the FI system obtained for injections of catechin and gallic acid standards. Operating potential for CNT/GC: 0.05 V (vs. Ag/AgCl); other conditions as in Fig. 1. The inset shows the linear relationship between the signal of antioxidant and the concentration.

However, the noise level dramatically increased at 40- μL loading leading to the drop in sensitivity as compared to the 30- μL loading. We therefore chose 30 μL as the optimal loading. In the preparation of the CNT/GC electrode for use in flow injection system, the volume of CNT mixture 155 μL added had the same optimal volume/area ratio as employed in the cyclic voltammetric experiment.

3.3. Analytical performance

Using the optimum potential for the CNT/GC electrode (0.05 V vs. Ag/AgCl), the flow system in Fig. 1 was employed to study the analytical performance for gallic acid, catechin, quercetin, caffeic acid and Trolox. We observed well-defined negative peaks from all the antioxidants. Representative signal profiles from multiple injections of catechin and gallic acid are shown in Fig. 4. The inset is the linear calibration graphs of these two antioxidants.

Table 1 summarizes the analytical performance of our flow system including the linear calibration equations of all five antioxidants (gallic acid, catechin, quercetin, caffeic acid Trolox). The limits of detection (3σ) are at the low μM levels. The system provides good precision (% R.S.D.=3.2) for 20 μL injections ($n=30$) of 2.5 μM Trolox. Sample throughput of this system is 45 samples h^{-1} .

Table 1
Analytical performance of the proposed CNT/GC-FI method investigated on five antioxidant standards.

Antioxidant	Linear range (μM)	Calibration parameter			Precision (RSD) ^a	Limit of detection ^b (μM)
		Intercept (nA)	Slope (nA μM^{-1})	r^2		
Gallic acid	0.6–12	15.9	58.6	0.996	1.3	0.04
Catechin	0.3–6	9.10	85.9	0.993	1.5	0.02
Quercetin	0.3–6	7.50	111	0.995	1.5	0.03
Caffeic acid	0.6–12	19.8	760	0.996	2.0	0.08
Trolox	0.3–8	14.9	80.1	0.996	1.2	0.04

^a Calculated from the signal of 0.8 μM of each antioxidant standard ($n=3$).

^b Calculated from 3σ ($n=10$) of the signals from the lowest concentration of each working range.

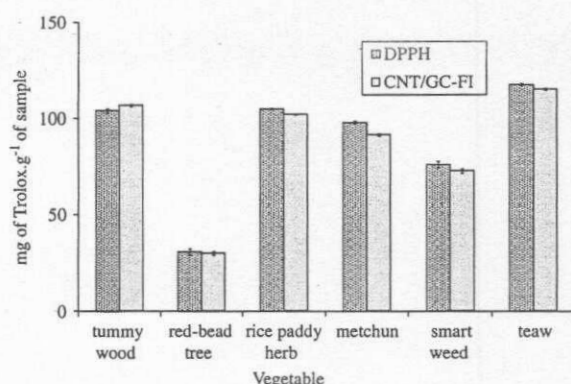


Fig. 5. TAC values for extracts of Thai indigenous vegetables obtained from our method compared with the values obtained from a reference method (DPPH* colorimetric method, [44]).

3.4. Application to Thai indigenous vegetable extracts

The proposed CNT/GC-FI method was applied to assess the 'total antioxidant capacity' (TAC) of six Thai vegetables/herbs (tummy wood, red-bead tree, rice paddy herb, metchun, smart-weed and teaw). Determination was carried out in triplicate for a sample. The data obtained by the proposed method were compared with the values obtained from DPPH* colorimetric methods and are shown in Fig. 5. Antioxidant contents were expressed as mg Trolox equivalent per gram of dry plant (mg of Trolox g^{-1} of sample). Using the paired t -test [48], the results obtained from CNT/GC-FI are not significantly different from the results of the spectrometric DPPH method [$t_{\text{observed}}=1.6990$, where $t_{\text{critical}}=2.5706$, $P=0.05$]. Among these Thai vegetables, tummy wood and teaw exhibited the highest TAC values.

4. Conclusions

This work presents a method development that utilizing amperometric detection of DPPH* to measure the 'total antioxidant capacity' or TAC of vegetable extracts. In the flow system, the level of DPPH* monitored continuously at the amperometric cell is reduced on injection of a plug of antioxidants. There is a reaction between DPPH* and the antioxidant which lowers the amount of the DPPH* in the plug leading to a decrease in the DPPH* signal. This decrease has a linear correlation with the concentration of the antioxidant in the injected plug. It was found

that 0.05 V (vs. Ag/AgCl) was the optimal voltage for monitoring DPPH*. Trolox was used as the reference antioxidant for calibration. The TAC value in the sample is reported as mg equivalent to Trolox g^{-1} sample.

The developed method is very simple since the FI system can be constructed easily using common laboratory equipment. In this work, a HPLC system, i.e., pump, injection valve and the electrochemical detector was set up for the single-line FI system (Fig. 1). In order to improve the sensitivity, carbon nanotubes was casted onto the glassy carbon working electrode of the HPLC electrochemical detector.

The final FI method is rapid (sample throughput of 45 samples h^{-1}) and is suitable for analysis of plant extracts, which often are colored. The pigments can interfere with any conventional colorimetric method for determination of TAC. Thus an electrochemical DPPH* method is applicable to all types of plant extracts.

Novelty statement

This work presents a new flow injection (FI) method for measuring the so-called 'total antioxidant capacity' or TAC of vegetable extracts. The method utilizes amperometric detection of DPPH*. We employed CNT to improve the sensitivity of detection on glassy carbon electrode. Trolox was used as the reference antioxidant for calibration. Unlike colorimetric methods, pigments do not interfere our method in the TAC measurement. This electrochemical DPPH* method is applicable to all types of plant extracts.

Acknowledgments

Financial supports from the Thailand Research Fund (MRG 5080176), the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education and the National Research Council of Thailand (NRCT) are gratefully acknowledged. The authors are also grateful to Asst. Prof. Kaew Udomsirichakorn of the Department of Biological Science, Ubon Ratchathani University for kindly identification of plant samples. M.A. would like to express her gratitude to Assoc. Prof. Prapin Wilairat for useful discussion and the editing.

References

- [1] B. Halliwell, M. Veronique, L.H. Long, FEBS Lett. 486 (2000) 10–13.
- [2] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, UK, 1998.
- [3] A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella, C. Scaccini, Free Radic. Biol. Med. 29 (2000) 1106–1114.
- [4] I. Gülçin, J. Med. Food 14 (2011) 975–985.
- [5] I. Gülçin, Arch. Toxicol. 86 (2012) 345–391.
- [6] N.J. Miller, C.A. RiceEvans, Food Chem. 60 (1997) 331–337.
- [7] R. van den Berg, G. Haenen, H. van den Berg, A. Bast, Food Chem. 66 (1999) 511–517.
- [8] M. Garcia-Alonso, S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, J.C. Rivas-Gonzalo, Food Chem. 84 (2004) 13–18.
- [9] D. Ivekovic, S. Milardovic, M. Roboz, B.S. Grabaric, Analyst 130 (2005) 708–714.
- [10] H. Wang, G.H. Cao, R.L. Prior, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 701–705.
- [11] G.H. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 3426–3431.
- [12] S. Girotti, E. Ferri, F. Fini, L. Bolelli, A.G. Sabatini, R. Budini, D. Sichertova, Talanta 64 (2004) 665–670.
- [13] A. Arnous, C. Petrakis, D.P. Makris, P. Kefalas, J. Pharmacol. Toxicol. Methods 48 (2002) 171–177.
- [14] E.L. Bastos, P. Romoff, C.R. Eckert, W.J. Baader, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 7481–7488.
- [15] X. Wang, M. Amatongchai, D. Nacapricha, O. Hofmann, J.C. de Mello, D.D.C. Bradley, A.J. de Mello, Sensors Actuators B: Chem. 140 (2009) 643–648.
- [16] R. Re, N. Pelligrini, A. Progettente, A. Pannala, M. Yang, Free Radic. Biol. Med. 26 (1999) 1231–1237.
- [17] A. Serpen, V. Gökmen, N. Pellegrini, V. Fogliano, J. Cereal Sci. 48 (2008) 816.

- [18] M.S. Blois, *Nature* 181 (1958) 1119–2000.
- [19] P.C.W. Beard, A. Moran, L. Ryan, *Food Res. Int.* 44 (2011) 217–224.
- [20] I. Gülçin, E. Bursal, M.H. Şehitoğlu, M. Bilsel, A.C. Gören, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2227–2238.
- [21] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *LWT-Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25–30.
- [22] D. Villano, M.S. Fernandez-Pachon, M.L. Moya, A.M. Troncoso, M.C. Gracia-Parrilla, *Talanta* 71 (2007) 230–236.
- [23] Y.Y. Lim, T.T. Lim, J.J. Tee, *Food Chem.* 103 (2007) 1003–1008.
- [24] C.W. Choi, S.C. Kim, S.S. Hwang, B.K. Choi, H.Y. Ahn, M.Y. Lee, S.H. Park, S.K. Kim, *Plant Sci.* 163 (2002) 1161–1168.
- [25] H.T. Balaydin, I. Gülçin, A. Menzek, S. Göksu, E. Sahin, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25 (2010) 685–695.
- [26] O. Talaz, I. Gülçin, S. Göksu, N. Saracoglu, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6583–6589.
- [27] I. Gülçin, R. Elias, A. Gepdiremen, A. Chea, F. Topal, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25 (2010) 44–53.
- [28] I. Gülçin, R. Elias, A. Gepdiremen, K. Taoubi, E. Köksal, *Wood Sci. Technol.* 46 (2012) 195–212.
- [29] M.J. Lima, I.V. Toth, A.O.S.S. Rangel, *Talanta* 68 (2005) 207–213.
- [30] I.I. Koleva, H.A.G. Niederlander, T.A. van Beek, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2323–2328.
- [31] D. Bandoniene, M. Murkovic, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2482–2487.
- [32] S. Chevion, M.A. Roberts, M. Chevion, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (6) (2000) 860–870.
- [33] A.J. Blasco, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 71–81.
- [34] A.J. Blasco, M.C. Rogerio, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 237–244.
- [35] S. Buratti, S. Benedetti, M.S. Cosio, *Talanta* 71 (2007) 1387–1392.
- [36] S. Chan-Eam, S. Teerasong, K. Damwan, D. Nacapricha, R. Chaisuksant, *Talanta* 84 (2011) 1350–1354.
- [37] C.N. Rao, B.C. Satishkumar, A. Govindaraj, M. Nath, *Chem. Phys. Chem.* 2 (2001) 78–105.
- [38] A. Merkoçi, M. Pumera, X. Llopis, B. Perez, M. del Valle, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 826–838.
- [39] J. Wang, M. Musameh, Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 2408–2409.
- [40] Y. Zhao, W.D. Zheng, H. Chen, Q.M. Luo, *Talanta* 58 (2002) 529–534.
- [41] A.B. Moghaddam, M.R. Ganjali, R. Dinarvand, P. Norouzi, A.A. Saboury, A.A. Moosavi-Movahedi, *Biophys. Chem.* 128 (2007) 30–37.
- [42] G.-Ri Xu, S. Kim, *Electroanalysis* 18 (2006) 1786–1792.
- [43] S. Silva, L. Gomes, F. Leitao, A.V. Coelho, L.V. Boas, *Food Sci. Technol. Int.* 12 (5) (2006) 385–396.
- [44] J. Boateng, M. Verghese, L.T. Walker, S. Ogutu, *LWT-Food Sci. Technol.* 41 (2008) 1541–1547.
- [45] S. Milardovic, D. Ivekovic, B.S. Grabaric, *Biochemistry* 68 (2005) 175–180.
- [46] S. Milardovic, D. Ivekovic, V. Rumenjak, B.S. Grabaric, *Electroanalysis* 17 (2005) 1847–1853.
- [47] Q.K. Zhuang, F. Scholz, F. Pragst, *Electrochem. Commun.* 1 (1999) 406–410.
- [48] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed., Pearson Education Limited, Essex, 2005.

ABSTRACTS

38thCONGRESS ON SCIENCE
AND TECHNOLOGY
OF THAILANDThe 38th CONGRESS ON SCIENCE
AND TECHNOLOGY OF THAILAND (STT 38)การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38)SCIENCE for the FUTURE
of MANKIND

วิทยาศาสตร์เพื่ออนาคตของมวลมนุษยชาติ

October 17-19, 2012
Empress Convention Centre
Chiang Mai, Thailand17-19 ตุลาคม 2555
ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพรส
จังหวัดเชียงใหม่

Organized by:

The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King in association with
the Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailandwww.scisoc.or.th/stt38

the lichen after transplanted (at 95% confidence limit), where as the amounts of lecanoric acid and atranorin were not significantly different after transplantation.

C1_C0071: Development of biosensor based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite for laccase-catalyzed oxygen reduction

Yuwakorn Sensri^{1,*}, Sanoe Chairam¹, Duangjai Nacapricha², Maliwan Amatadongchai¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani, 34190, Thailand

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok, 10400, Thailand

*e-mail: yuwakorn.sensri@gmail.com

Abstract: The carbon nanotubes-chitosan (CNT-CS) composite provides a suitable biosensing matrix due to its high stability, good biocompatibility, and good conductivity. Development of a sensitive and selective biosensor was proposed by entrapping laccase enzyme into the composite film for detection of oxygen reduction. The nano-composite of CNT-CS could be conveniently cast on the glassy carbon (GC) electrode surfaces. With the aid of CS and bovine serum albumin (BSA), laccase was then immobilized on the nanostructure film to form an oxygen sensor and could apply as biocathodes in biofuel cell. Electrochemical reduction of oxygen was studied at the developed biosensor using cyclic voltammetry (CV). The biosensor, GC/CNT-CS/laccase/BSA, was used as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode. Cyclic voltammograms of oxygen were measured in a 0.1 M citrate buffer pH 5.0. The reduction wave was observed at -0.35 V (oxygen flow rate equals to 40 mL/min in 10 mL of citrate buffer). Stability and the possible application of the biosensor in bio-fuel will be discussed.

C1

C1_C0072: Factorial design optimization of eugenol extraction from holy basil by subcritical water
Kanittha Dararuang, Orapin Chienthavorn

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*e-mail: fsciopc@ku.ac.th, nuna_comingsoon@hotmail.com

Abstract: Subcritical water extraction (SWE) of an active compound (eugenol) from the holy basil (*Ocimum Sanctum* L.) was achieved. The extraction was studied at a temperature between 160-220°C and a static time between 30-120 min by using 4²-full factorial design from Minitab software. Effects of temperature and static time were investigated. Fresh leaves were best extracted at 180°C for 60 min and the dried leaves were achieved at a higher temperature of 200°C at a longer time (120 min). Separation of eugenol was carried out by using a gas chromatograph with flame ionization detector (GC-FID). Eugenol content in the aqueous extract in the fresh leaves (4.11%) was higher than those in the dried leaves (1.70%).

C1_C0074: Modification of QuEChERS method for aflatoxins residues analysis in rice

Kunaporn Sanguankaew, Natchanun Leepipatpiboon

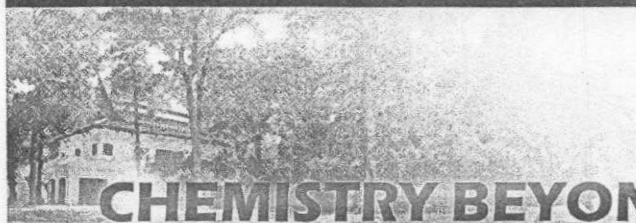
Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

*e-mail: natchanun.l@chula.ac.th

Abstract: A new non-immunoassay based extraction method for aflatoxins B1, B2, G1, and G2 was developed for aflatoxins screening in rice. The associated technique combined modified QuEChERS method with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry by generating pseudo molecular ions via electrospray ionization in ES+ mode and monitoring by MRM (Multiple Reaction Monitoring) analysis. Aflatoxins were isolated on Acquity UPLC BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm) with 0.5% formic acid in 5 mM ammonium formate/acetonitrile by gradient elution in 11 minutes. Modified QuEChERS method employed acetonitrile for solvent extraction. Cleanup was done by dispersive combination of PSA, C18, and neutral alumina. Method performance was evaluated as percent recovery from 0.01-0.1 mg/L, acceptable linearity with all R² values better than 0.99 were observed. Percent recovery ranged from 85 to 103 with within-day and between-day precisions at three concentration levels (low, mid, high) showed %RSD values better than 7.4 (n=10). Method's limits of detection range from 0.5-1.0 µg/kg. The proficiency testing was performed with Z-score 0.6. This method is rapid and robust, and fit to replace expensive import immunoaffinity columns and reagents commonly employed in routine analyses of aflatoxins.

C1_C0075: Simultaneous quantitative determination of total methyl ester, linoleic methyl ester and water in palm oil biodiesel by near infrared spectroscopic analysis

THE 6th PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL CONFERENCE 2012



PACCON 2012- CHEMISTRY BEYOND BOUNDARIES

11 - 13 JANUARY 2012, THE EMPRESS CONVENTION CENTER
CHIANG MAI, THAILAND

e-ABSTRACT



DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE, CHIANG MAI UNIVERSITY
& THE CHEMICAL SOCIETY OF THAILAND UNDER THE PATRONAGE OF
HER ROYAL HIGHNESS PRINCESS CHULABHORN MAHIDOL

DEVELOPMENT OF A FLOW INJECTION SYSTEM WITH AMPEROMETRIC DETECTION ON LACCASE-BASED BIOSENSOR FOR ANTIOXIDANT ASSAY

Maliwan Amatongchai^{1,2,*}, Yuwakorn Sensri², Duangjai Nacapricha^{1,3}

¹ Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs)

² Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani, 34190, Thailand

³ Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok, 10400, Thailand

*Corresponding Author : amaliwan@gmail.com, scmaliam@ubu.ac.th

ABSTRACT

High throughput screening (HTS) of antioxidant assay using a simple flow injection system with amperometric detection on laccase based-biosensor was proposed. The amperometric biosensor was developed based on cross-linking laccase (Lac) by glutaraldehyde with NH₂-functionalized carbon nanotubes (CNT-NH₂)/gold nanoparticle (CNT-NH₂/AuNPs) composite film coated on a glassy carbon (GC) electrode. The biosensor (GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac) was used as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode, using amperometry at -50 mV. The use of amperometric detection on the developed biosensor in flow-injection system for rapid and automated assay of total antioxidant capacity (TAC) was examined. The system provides an impressively good precision (%R.S.D. = 3.09) for 20 μ L injections of 10 ppm caffeic acid (n = 20). The linear calibration curves were observed for tested antioxidants (caffeic acid, catechin, gallic acid, chlorogenic acid and trolox). The detection limits at a low μ M level were obtained. This method can be used for evaluation of TAC content in plant extracts such as Thai indigenous herbs with rapid sample throughput (29 samples/h).

Keywords Laccase biosensor; Flow injection analysis; Antioxidant