ระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรี สำหรับการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ขวัญจิตต์ เหมะวิบูลย์* และสายรุ้ง อวยพรกชกร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เมือง พิษณุโลก 65000

*E-mail: khuanjitb@nu.ac.th

รับบทความ: 7 มกราคม 2560 ยอมรับตีพิมพ์: 30 เมษายน 2560

บทคัดย่อ

ระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรีแบบง่ายพัฒนาขึ้นสำหรับการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิเคราะห์ด้วยหลักการตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ที่ลดลงเนื่องจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมตรี และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโฟลอินเจคชัน ได้แก่ ปริมาณของสารละลาย DPPH ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ อัตราการไหล และความยาวของขดท่อผสม ในการทดลองนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารละลายมาตรฐานในการทดสอบการวิเคราะห์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันและใช้เป็นสารเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจากผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโทรลอกซ์ พบว่า ให้ผลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานเมื่อเปรียบเทียบด้วย paired *t*–test ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95%

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิธีดีพีพีเอช ระบบโฟลอินเจคชัน สเปกโทรโฟโตเมตรี

Flow Injection Spectrophotometric System for the Evaluation of Antioxidant Capacity

Khuanjit Hemavibool [*] and Sairoong Ouypornkochagorn

Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand
[*]E-mail: khuanjitb@nu.ac.th

Received: 7 January 2017 Accepted: 30 April 2017

Abstract

A simple flow injection spectrophotometric system was developed for the evaluation of antioxidant capacity. The analysis was based on the spectrophotometric measurement of the DPPH concentration decrease resulting from the reaction with an antioxidant compound. The optimization of flow injection system was investigated including amount of DPPH and antioxidant solution, flow rate and reaction coil length. Ascorbic acid was used as a standard compound to validate the flow injection system and served as a reference antioxidant to measure the relative antioxidation. From the analysis of antioxidant capacity of trolox, the results gave good agreement to the standard DPPH method by comparing with paired *t*–test at 95% confidence interval.

Keywords: Antioxidant capacity, DPPH assay, Flow injection system, Spectrophotometry

บทนำ

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล สร้างขึ้นจากกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถได้รับจากสิ่งแวดล้อม เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และการเสื่อมของอวัยวะต่างๆ (Satish and Dilipkumar, 2015) ในสภาวะปกติร่างกายจะสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถกำจัดหรือลดความรุนแรงของอนุมูลอิสระเหล่านี้ รวมถึงการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากการรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ เช่น วิตามิน สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ บีตา-แคโรทีน ไลโคปีน แอนโทไซยานิน แคโรทีนอยด์ ในปัจจุบันคนส่วนใหญ่ให้ความสำคัญในการดูแลสุขภาพมากขึ้น ทำให้มีความต้องการสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชธรรมชาติและสมุนไพรต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น และมีการนำมาผ่านกระบวนการแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่า (Jirum and Srihanam, 2011; Phansawan, 2013;

Hudson, 1990) ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาฤทธิ์ต้านทานอนุมูลอิสระที่ดีและเหมาะสม ให้ผลการศึกษาที่ถูกต้องและแม่นยำจึงมีความสำคัญ ในปัจจุบันมีวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายวิธีด้วยกัน เช่น การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีวัดความสมารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay) การฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (2,2-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assay) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay) (Babu et al., 2013; Berker et al., 2007; Thaiponga et al., 2006)

วิธี DPPH เป็นวิธีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก รวดเร็ว ใช้เครื่องมือที่ราคาไม่แพงมากและสามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลายชนิด โดยมีหลักการคือเป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (DPPH) การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยติดตามการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม และนำมาหาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Kedare and Singh, 2011; Sharma and Bhat, 2009) อย่างไรก็ตาม การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากในการทดลองต้องให้สารสกัดและสาร DPPH ทำปฏิกิริยาในที่มืด ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ และต้องใช้สาร DPPH และสารสกัดที่ทดสอบในปริมาณระดับมิลลิลิตร ซึ่งอาจเป็นปัญหาสำหรับพืชที่สกัดสารได้ปริมาณน้อย แม้ว่าในปัจจุบันจะสามารถใช้สารปริมาณที่ลดลงเป็นระดับไมโครลิตรโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครเพลท แต่ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากเครื่องมือมีราคาแพง (Lu et al., 2014) และยังได้มีการพัฒนาการทดสอบร่วมกับเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหล (flow injection analysis) เพื่อเพิ่มความเร็วในการวิเคราะห์ แต่ต้องใช้สาร DPPH ที่มีราคาแพงเป็นสารตัวพา (Nookrai et al., 2012) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลร่วมกับการตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ เพื่อให้สามารถทำการวิเคราะห์ได้รวดเร็ว มีความแม่นยำและความถูกต้อง ประหยัดปริมาณสารเคมีและสารสกัดตัวอย่าง ทำให้เป็นการลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลาย: สารเคมีทุกชนิดเป็นเกรดวิเคราะห์ และเตรียมเป็นสารละลายโดยใช้เอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) เป็นตัวทำละลาย สารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl) เตรียมใหม่ทุก 3 วันและเก็บไว้ในขวดสีชา แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรดแอสคอบิก (L(+)Ascorbic acid) และโทรลอกซ์ (Trolox) เตรียมสารละลายใหม่ทุกวัน

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (Batch DPPH assay): ปิเปตสารละลาย 0.25 mM DPPH และสารละลายมาตรฐาน (กรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.01 – 0.20 mM และโทรลอกซ์เข้มข้น 0.01 – 0.30 mM) ที่อัตราส่วน 5 ต่อ 2 ในขวดวัดปริมาตรสีชาขนาด 5.00 mL ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ชนิดลำแสงคู่ (Jusco รุ่น V-650) ที่

ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% DPPH inhibition) ตามสมการดังนี้

$$\%\text{DPPH inhibition} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เริ่มต้น

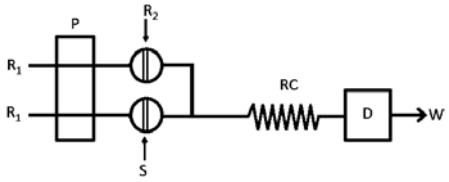
A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของละลายสารมาตรฐานกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ และคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของมาตรฐานโทรลอกซ์ เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกในรูป AAE (ascorbic acid equivalent) (Nookrai et al., 2012) ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{AAE} = \frac{IC_{50} \text{ ของ ascorbic acid (mg/mL)}}{IC_{50} \text{ ของ trolox (mg/mL)}}$$

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการไหล: ระบบการวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแสดงดังภาพที่ 1 เป็นระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรี (flow injection spectrophotometric method) แบบง่าย

สารละลายมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์และสารละลาย DPPH จะถูกฉีดเข้าสู่กระแสตัวพาเอทานอล พร้อมกันโดยใช้วาล์วเดี่ยว 2 ตัว ซึ่งมีระบบปั๊มเพอร์ริสตาลติก 2 ช่อง (Shenchen รุ่น BT100N) ขับเคลื่อนสารละลายที่เกี่ยวข้องในท่อ



ภาพที่ 1 ระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรี P = ปั๊มเพอร์ริสตาลติก (peristaltic pump), R_1 = เอทานอล, R_2 = สารละลาย DPPH, S = สารละลายมาตรฐานหรือสารต้านอนุมูลอิสระ, RC = ขดท่อผสม (reaction coil), D = เครื่อง UV-Vis spectrophotometer, W = สารละลายเหลือทิ้ง

ขนาดเล็กด้วยความเร็วคงที่ เมื่อสารละลายไหลไปถึงบริเวณจุดเชื่อมต่อ สารละลายมาตรฐานจะพบกับสารละลาย DPPH แล้วเกิดปฏิกิริยาภายในท่อขดผสม และไหลผ่านเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ชนิดลำแสงเดี่ยว ซึ่งวัดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นจากการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และบันทึกข้อมูลออกมาในรูปพีคและคำนวณพื้นที่ใต้พีคโดยตัวแปลงสัญญาณร่วมกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (clarity software) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH inhibition) ดังนี้

$$\%\text{DPPH inhibition} = \frac{PA_0 - PA}{PA_0} \times 100$$

เมื่อ PA_0 = ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลาย DPPH เริ่มต้น

PA = ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลาย DPPH หลังทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน

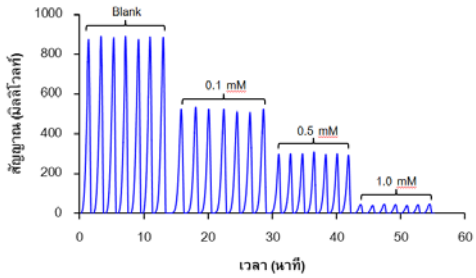
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรีสำหรับหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ปริมาณสารมาตรฐาน

และสารละลาย DPPH ผลของอัตราการไหลของเอทานอล และความยาวของท่อขดผสม โดยศึกษาผลของสภาวะทีละชนิดและกำหนดสภาวะอื่นๆ ไว้คงที่ (univariate) เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสม ทดลองหาค่า IC_{50} และคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกในรูป AAE (ascorbic acid equivalent) เปรียบเทียบกับวิธี batch DPPH assay

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรี

ระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้นเป็นระบบการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ ได้ออกแบบการทำงานให้สอดคล้องกับวิธี batch DPPH assay โดยใช้ปั๊มขับเคลื่อนเอทานอลในท่อขนาดเล็กด้วยอัตราเร็วคงที่ ตอนเริ่มต้นฉีดเอทานอลปริมาตรคงที่พร้อมกับสารละลาย DPPH เพื่อวัดสัญญาณพีคของสารละลาย DPPH เริ่มต้น (blank) และเมื่อวิเคราะห์ฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาตรคงที่พร้อมกับสารละลาย DPPH ซึ่งเกิดปฏิกิริยากันภายในขดท่อผสม และสารละลาย DPPH ที่เหลือจะเกิดสัญญาณเป็นพีคขึ้น ดังนั้นสัญญาณที่เกิดขึ้นแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยา ตัวอย่างเอฟไอเอแกรม (FIA profile) ของสารละลาย DPPH ที่ได้หลังจากทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงในภาพที่ 2 และศึกษาหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมของระบบเพื่อให้มีสมรรถนะสูงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระดังต่อไปนี้

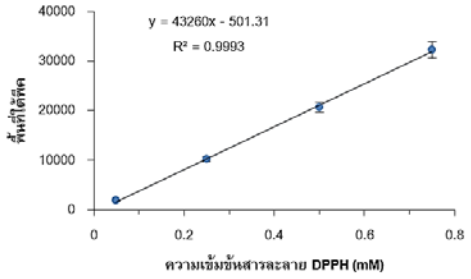


ภาพที่ 2 FIA profile แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของ DPPH และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก

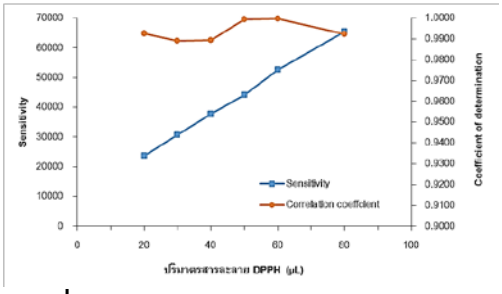
การหาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลาย DPPH

การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลาย DPPH โดยสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ DPPH ในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.75 mM ที่ปริมาณ 20 – 80 µL เพื่อหาสภาวะที่ให้ความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) สูง คือ ความชันของกราฟมีค่ามาก และมีค่าสัมประสิทธ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) เข้าใกล้ 1 โดยใช้ความยาวของขดท่อผสม (reaction coil) เท่ากับ 20 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 mm อัตราการไหล 1.0 $mL \cdot min^{-1}$ ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ DPPH ที่ปริมาณ 50 µL แสดงในภาพที่ 3 และผลของปริมาณของสารละลาย DPPH ต่อค่าความไวในการวิเคราะห์และค่าสัมประสิทธ์ของการตัดสินใจ แสดงในภาพที่ 4 พบว่า เมื่อปริมาณของ DPPH มากขึ้น สัญญาณที่ตรวจวัดได้จะเพิ่มขึ้น ทำให้ความไวในการวิเคราะห์หรือความชันของกราฟเพิ่มขึ้น ซึ่งในการทดลองเลือกใช้สารละลาย DPPH ปริมาณ 50 µL เนื่องจาก

เป็นปริมาณไม่มาก แต่ค่าความไวในการวิเคราะห์สูงพอสมควรและให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจที่ใกล้เคียง 1



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างสารละลาย DPPH ปริมาณ 50 µL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และพื้นที่ใต้พีค (n = 7)



ภาพที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารละลาย DPPH และค่าความไวในการวิเคราะห์จากความชันของกราฟมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

การหาปริมาณที่เหมาะสมของสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดลองนี้ใช้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกเป็นตัวแทนของสารต้านอนุมูลอิสระในการหาสภาวะของระบบที่เหมาะสม การศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายมาตรฐานในการทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกเข้มข้น 0.01 – 1.00 mM ปริมาตร 20 – 80 µL โดยใช้สารละลาย 0.50 mM DPPH ปริมาณ 50 µL อัตราการไหล 1.0 $mL.min^{-1}$ และความยาวของขดท่อผสม 20 cm เมื่อคำนวณหาค่าร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH inhibition) ได้ผลดังในตาราง 1 จากผลการทดลองพบว่า หากใช้ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกน้อยเกินไป (20 µL) ไม่สามารถวัด %DPPH inhibition ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความเข้มข้นต่ำได้ และถ้าใช้ปริมาตรมากเกินไป (ตั้งแต่ 50 µL ขึ้นไป) ทำให้ค่า %DPPH inhibition มีค่าคงที่ที่ประมาณ 95% เนื่องจากสารละลาย DPPH ถูกทำปฏิกิริยาจนหมดและมีปริมาณไม่เพียงพอในการทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐาน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกใช้ปริมาณสารละลายมาตรฐาน 40 µL เนื่องจากเป็นปริมาณมากที่สุดที่สามารถหาค่า %DPPH inhibition ได้ทั้งหมดในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา

ตาราง 1 ค่า %Inhibition ของ 0.01 – 1.00 mM ascorbic acid ที่ปริมาตร 20 – 80 µL

ปริมาณของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก (µL)	%DPPH inhibition of mM of ascorbic acid		
	0.01	0.50	1.00
20	0.00	25.03	87.40
30	5.95	36.10	90.81
40	14.68	52.21	94.44
50	16.05	63.49	95.31
60	24.31	73.12	95.65
80	39.50	80.88	95.52

การหาอัตราการไหลที่เหมาะสม

ผลของอัตราการไหลของสาร (flow rate) ในระบบระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยใช้สารละลาย 0.50 mM DPPH ปริมาณ 50 µL

สารละลายกรดแอสคอบิก 0.10 mM ปริมาตร 40 μL ความยาวของขดท่อผสม 20 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 mm แสดงในตาราง 2 พบว่า เมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นจาก 1.0 ถึง 4.0 mL.min^{-1} ค่าร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสูงสุดที่อัตราการไหล 3.0 mL.min^{-1} และลดลงที่อัตราการไหล 5.0 mL.min^{-1} แต่หากใช้อัตราการไหลต่ำจะทำให้เวลาในการทำปฏิกิริยาของสารเพิ่มขึ้น รวมถึงเวลาที่สารไหลผ่านเครื่องตรวจวัดไม่เร็วเกินไป ดังนั้นจึงได้เลือกอัตราการไหลของสารที่ 1.0 mL.min^{-1} เพื่อให้มั่นใจว่าหากวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่มีความเข้มข้นสูงจะมีเวลามากเพียงพอในการทำปฏิกิริยา

ตาราง 2 ผลของอัตราการไหลต่อค่า %DPPH inhibition

อัตราการไหล (mL.min^{-1})	%DPPH inhibition	%RSD (n=7)
1.0	25.18	2.86
2.0	25.09	2.87
3.0	27.21	2.47
4.0	26.45	3.04
5.0	21.64	2.57

การหาความยาวของท่อขดผสมที่เหมาะสม

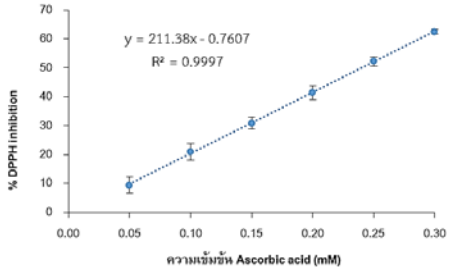
จากการหาความยาวของท่อขดผสม (reaction coil) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 mm ที่มีความยาว 10 – 100 cm โดยใช้สารละลาย 0.50 mM DPPH ปริมาตร 50 μL สารละลายกรดแอสคอบิก 0.10 mM ปริมาตร 4.0 μL และอัตราการไหล 1.0 mL.min^{-1} เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้ (ตาราง 3) พบว่า เมื่อเพิ่มความยาวของขดท่อผสม ค่า %DPPH inhibition ที่ได้ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า ในสภาวะที่ศึกษาปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว สามารถเลือกใช้ความยาวของขดท่อผสมได้ทุกขนาด ดังนั้นจึงเลือกใช้ความยาว 100 cm เพื่อให้มั่นใจว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่อาจมีความเข้มข้นสูงกว่านี้จะมีเวลาเพียงพอในการเกิดปฏิกิริยา

ตาราง 3 ผลของความยาวของท่อขดผสมต่อค่า % DPPH inhibition

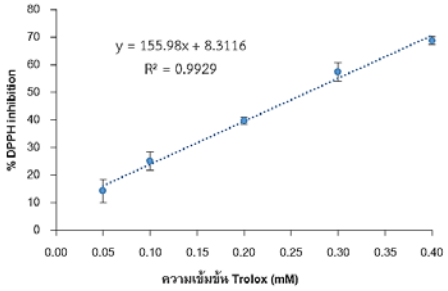
ความยาวของท่อขดผสม (cm)	%DPPH inhibition	%RSD (n=7)
10	22.96	3.82
20	22.30	2.46
30	23.27	1.69
50	22.00	2.02
100	24.76	1.42

ดังนั้นจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้น พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ ใช้สารละลาย 0.50 mM DPPH ปริมาณ 50 μL สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก ปริมาตร 40 μL อัตราการไหล 1.0 mL.min^{-1} ขดท่อผสมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 mm ความยาว 100 cm และใช้ UV-Vis spectrophotometer ชนิดลำแสงเดี่ยวเป็นตัวตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 517 nm และนำมาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทรลอกซ์และกรดแอสคอบิคเพื่อหาค่า IC_{50} ดังภาพที่ 5 และคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทรลอกซ์เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกในรูป AAE เพื่อเปรียบเทียบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธี batch DPPH assay ดังในตาราง 4 เมื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่า AAE ที่ได้จาก

ทั้ง 2 วิธี โดยทดสอบค่าทางสถิติ paired *t*–test ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% พบว่า ค่า *p*-value = 0.8075 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่า ระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดลองที่ถูกต้องใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน batch DPPH assay



(ก)



(ข)

ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า %DPPH inhibition กับความเข้มข้นของ (ก) กรดแอสคอบิก และ (ข) โทรลอกซ์

สรุปผลการทดลอง

ระบบโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้น นำมาใช้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทรลอกซ์เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกในรูป AAE (ascorbic acid equivalent) โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน batch DPPH assay พบว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ระบบสามารถวิเคราะห์ด้วยความถี่ 12 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ซึ่งใช้ปริมาณสารละลาย DPPH 50 µL และสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 40 µL ต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง จึงเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง สามารถวิเคราะห์ได้สะดวกและรวดเร็ว ประหยัดสารเคมีที่ใช้และลดของเสียที่เกิดขึ้นหลังปฏิกิริยาเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน batch DPPH assay

ตาราง 4 ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทรลอกซ์เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก (AAE) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโฟลอินเจคชันสเปกโทรโฟโตเมตรีและวิธี batch DPPH Assay

เทคนิค	ค่า AAE			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
batch DPPH assay	0.661	0.614	0.616	0.630 ± 0.026
วิธีโฟลอินเจค-ชันสเปกโทรโฟ-โตเมตรี	0.647	0.598	0.636	0.627 ± 0.025

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการทำวิจัย และเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีงบประมาณ 2558

เอกสารอ้างอิง

Babu, D., Gurumurthy, P., Borra, S. K., and Cherian, K. M. (2013). Antioxidant and

free radical scavenging activity of triphala determined by using different *in vitro* models. **Journal of Medicinal Plants Research** 7(39): 2898–2905.

Berker, K. I., Guclu, K., Tor, I., and Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, bathophenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP) and ferricyanide reagents. **Talanta** 72: 1157–1165.

Hudson, B. J. (1990). **Food Antioxidants**. Essex: Springer Science & Business Media.

Jirum, J., and Srihanam, P. (2011). Oxidants and antioxidants: Sources and mechanism. **Academic Journal of Kalasin Rajabhat University** 1(1): 59–70. (in Thai)

Kedare, S. B., and Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology** 48(4): 412–422.

Lu, Y., Khoo, T. J., and Wiart C. (2014) Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods. **Pharmacology and Pharmacy** 5: 395–400.

Nookrai, M., Watla-iad, K., Deachathai, S., and Suteerapataranon, S. (2012) Rapid antioxidant capacity screening in herbal extracts using a simple flow injection-spectrophotometric system. **Food Chemistry** 132: 544–548.

Phansawan, B. (2013). Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. **Journal of Science & Technology, Thammasat University** 21(3): 275–286. (in Thai)

Satish, B. N., and Dilipkumar, P. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances** 5: 27086–28006.

Sharma, O. P., and Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry** 113: 1202–1205.

Thaiponga, K., Boonprakoba, U., Crosbyb, K., Cisneros-Zevallosc, L., and Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis** 19: 669–675.