Research Article

Received: April 5, 2018; Accepted: April 20, 2018

การประยุกต์อุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีสำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริก

Application of LED-based Colorimetric Detector for Evaluation of Total Antioxidant Capacity Using Ferric Reducing Antioxidant Power Assay

นันทยา ม่านทอง และสุมนมาลย์ จันทร์เอี่ยม*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

Nantaya Manthong and Sumonmarn Chaneam*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University,

Phra Pathom Chedi, Muang, Nakhon Pathom 73000

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดสีของสารละลายโดยใช้หลอดไดโอดเปล่งแสงหรือหลอดแอลอีดี (light emitting diode, LED) ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงและเป็นตัววัดแสงโดยอาศัยหลักการของพีอีดีดี (paired emitter detector diode, PEDD) จากนั้นนำอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นไปใช้ร่วมกับระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส (flow injection analysis, FIA) เพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริก (ferric reducing antioxidant power) หรือวิธีเอฟอาร์เอพี (FRAP) โดยติดตามสีฟ้าที่เข้มขึ้นเมื่อตัวอย่างสามารถรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออนได้มากขึ้น จากนั้นศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ สีของหลอดแอลอีดี อัตราการไหลของสารละลาย และปริมาตรสารตัวอย่าง จากการทดลองกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) พบว่าระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดสีที่สร้างขึ้นมีความเป็นเส้นตรงที่ดีในช่วงความเข้มข้น 10-50 ไมโครโมลาร์ อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ได้เร็วถึง 90 ตัวอย่างต่อชั่วโมง สุดท้ายนำระบบที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมชงที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดแล้วรายงานเป็นค่า ascorbic acid equivalent (AAE) เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

คำสำคัญ : อุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดี; วิธีรีดิวซเฟอรริก; วิธีเอฟอาร์เอพี; ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวม; ระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** schaneam@gmail.com

doi: 10.14456/tstj.2019.33

Abstract

This work presents an in-house colorimetric detector based on paired emitter detector diode (PEDD). The colorimetric detector composed of a pair of light emitting diodes (LED). The first LED was used as a light emitter and the second LED was used as a light detector. Then, the constructed colorimetric detector was coupled with a flow injection analysis (FIA) system in order to evaluate the total antioxidant capacity (TAC) by means of ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. When the antioxidant acts as reducing agent to facilitate the reduction of ferric ions, the color change of dark blue solution was monitored. Parameters affected the flow performance, which are color of LED, flow rate and injection volume, were also optimized. The FIA-PEDD system illustrated good performance with linearity range of 10-50 μM. Moreover, high throughput of 90 samples/h was achieved. The proposed method was applied in the analysis of the TAC values of commercial instant herbal beverages. According to the standard ascorbic acid, the TAC value was reported as ascorbic acid equivalent (AAE). It was found that AAE values obtained from our method were comparable with those obtained from the batch methods with a common spectrophotometric detector.

Keywords: paired emitter detector diode (PEDD); flow injection analysis (FIA); ferric reducing antioxidant power (FRAP); total antioxidant capacity (TAC)

1. บทนำ

การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างรีเอเจนท์และสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แล้วติดตามสีที่เปลี่ยนไปนั้นมีหลายวิธี เช่น วิธี ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) assay [1,2] และวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay [3,4] ทั้ง 2 วิธี นี้เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่มีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยใช้ $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเป็นตัวแทนอนุมูลอิสระ และสีของสารละลายนี้จะเปลี่ยนไปเมื่อปริมาณอนุมูลอิสระลดน้อยลง ข้อจำกัดของวิธี ABTS คือ ต้องมีขั้นตอนการเตรียมรีเอเจนท์ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งใช้เวลาถึง 12-16 ชั่วโมง จึงไม่สะดวกเมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างและต้องการทราบผลในเวลาอันรวดเร็ว ส่วนวิธี DPPH นั้น แม้จะเตรียมรีเอเจนท์ได้ง่ายกว่า แต่การทดลองของวิธี DPPH นี้ต้องทำในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ จึงอาจเป็นข้อจำกัดเมื่อต้องการวิเคราะห์สารตัวอย่างในตัวกลางที่เป็นน้ำ นอกจากนี้พบว่าการติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปของทั้งสองวิธีดังกล่าวต้องใช้เวลานานถึง 30 นาที จึงมีอีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้ คือ วิธีรีดิวซเฟอรริก (ferric reducing antioxidant power) หรือวิธีเอฟอาร์เอพี (FRAP) [5,6] ซึ่งจะมีหลักการแตกต่างจากวิธี ABTS และวิธี DPPH สำหรับวิธีรีดิวซเฟอรริกเป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารตัวอย่าง โดยสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบ

เชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่งมีสีฟ้าที่เข้มมากขึ้น สามารถติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ นี้ได้ในเวลาเพียง 5 นาที วิธีรีดิวซเฟอรริกนี้เป็นวิธีที่สะดวก ใช้เวลาน้อย เตรียมรีเอเจนท์ง่าย และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกเมื่อเทียบกับวิธี ABTS และ DPPH [7]

การติดตามสีของสารละลายที่เปลี่ยนไปของการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่กล่าวมาข้างต้นนั้น สามารถทำได้โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เปลี่ยนไปนี้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ซึ่งเป็นอุปกรณ์การตรวจวัดทางแสงชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ที่ทันสมัยในหลาย ๆ ด้าน อย่างไรก็ตามเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ส่วนมากที่ใช้ในปัจจุบันยังคงมีราคาสูงและมีขนาดใหญ่ ไม่สะดวกต่อการพกพาหรือเคลื่อนย้าย ดังนั้นการพัฒนาอุปกรณ์การตรวจวัดทางแสงที่มีราคาถูก และสะดวกต่อการพกพาจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยอุปกรณ์การตรวจวัดทางแสงอย่างง่ายที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ทดแทนเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นี้มีชื่อว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแสงแบบแอลอีดีโดยอาศัยหลักการ paired emitter detector diode (PEDD) หรือพีอีดีดี เนื่องจากประกอบด้วยหลอดไดโอดเปล่งแสงหรือแอลอีดี (light emitting diode, LED) จำนวน 2 หลอด หลอดที่หนึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเปล่งแสง (light emitter) และอีกหนึ่งหลอดทำหน้าที่เป็นตัวรับแสง (light detector) หลอดไฟแอลอีดีสามารถเปล่งแสงได้ในช่วงสเปคตรัมที่แคบ มีความจำเพาะสูง ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุกึ่งตัวนำที่ใช้ จึงไม่จำเป็นต้องใช้ร่วมกับอุปกรณ์คัดเลือกความยาวคลื่นที่มีราคาแพง สัญญาณที่ได้จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มของแสงที่ส่องมาที่หลอดแอลอีดีที่เป็นตัวตรวจวัดแสง และแปรตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่นำอุปกรณ์ดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่มต่าง ๆ เช่น สารชีวโมเลกุล [8-13] สารประกอบอโลหะ และไอออนของโลหะ [14-18] รวมถึงใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้วิธี ABTS พบว่าราคาของอุปกรณ์ลดลงจริงและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เร็ว 48 ตัวอย่างต่อชั่วโมง [19]

งานวิจัยนี้จึงสนใจประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมชงประเภทต่าง ๆ ได้แก่ ใบชา ชาตะไคร้ ชามะลิ เป็นต้น โดยใช้วิธีรีดิวซเฟอรริก แล้วติดตามสีที่เปลี่ยนไปของสารละลายด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีที่สร้างขึ้นร่วมกับระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส (flow injection analysis, FIA) โดยพัฒนาระบบวิเคราะห์ให้มีความรวดเร็วมากกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ รวมถึงค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกลงทั้งราคาสารเคมีและราคาอุปกรณ์ตรวจวัดที่ใช้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical grade) สารละลายทุกชนิดเตรียมในน้ำกลั่นจากระบบ reversed osmosis ตลอดการศึกษา สารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์ (FRAP reagent) ประกอบด้วยสารละลายสามส่วน ได้แก่ สารละลาย acetate buffer (pH 3.6) ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ สารละลาย 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย hydrochloric acid ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย ferric chloride ($FeCl_3$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายทั้งสามนี้มาผสมกันในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 ตามลำดับ [6] สารละลาย

มาตรฐานกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ เตรียมใหม่ทุกวันโดยชั่ง L-ascorbic acid (UNILAB, Philipines) 0.4400 กรัม ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 25.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-50 ไมโครโมลาร์ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

2.2 สารตัวอย่าง

เครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมชงเตรียมโดยชงในน้ำร้อนด้วยอัตราส่วนที่แนะนำตามฉลาก โดยชั่งตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งละเอียด 2.00-6.00 กรัม เทน้ำร้อนใส่ลงไปจนท่วม คนให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman® No. 1) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรเป็น 50.00 มิลลิลิตร

2.3 อุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดี

งานนี้ผู้วิจัยประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีขึ้นมาใช้เอง อาศัยหลักการพีอีดีดีโดยใช้หลอดแอลอีดีจำนวน 2 หลอด เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ วิธีการสร้างเป็นไปตามงานวิจัยก่อนหน้านี้ [19] หลอดแอลอีดีทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งกำเนิดแสง (LED-emitter) และตรวจวัดแสง (LED-detector) ด้านหลอดแอลอีดีที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเชื่อมต่อกับแหล่งจ่ายไฟกระแสตรง 5 โวล์ต (PS-150200, BEST, China) ผ่านตัวต้านทานขนาด 100±1 โอห์ม เพื่อให้เปล่งแสงด้วยความเข้มแสงที่คงที่ และหลอดแอลอีดีที่เป็นตัวตรวจวัดแสงจะต่อกับเครื่องดิจิตอลมัลติมิเตอร์ (digital multimeter, Fluke, USA) เพื่อวัดสัญญาณออกมาเป็นค่าความต่างศักย์ (voltage) งานวิจัยนี้ทดสอบอุปกรณ์ที่ประดิษฐ์ขึ้นโดยใช้การทดลองแบบกะ (batch) และการทดลองแบบต่อเนื่องด้วยระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส ในการทดลองแบบกะใช้คิวเวทแก้วที่มีระยะทางที่แสงผ่านได้ (path length) ยาว 10 มิลลิเมตร (glass cuvette, T-Bota Scietech, China) บรรจุสารละลายที่ต้องการตรวจวัด ส่วนระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสใช้โฟลเซลล์สำหรับสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ มีปริมาตร 80 μL และระยะทางที่แสงผ่านได้ 10 มิลลิเมตร (Hellma®, Germany) สัญญาณความต่างศักย์วัดได้ด้วยเครื่องดิจิตอลมัลติมิเตอร์แล้วแสดงผลผ่านหน้าจอคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม LabVIEW 8.2™ โดยความต่างศักย์นี้สามารถคำนวณเป็นค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยใช้สมการ (1) เพื่อเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) กับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (HP-8453, Perkin Elmer, USA)

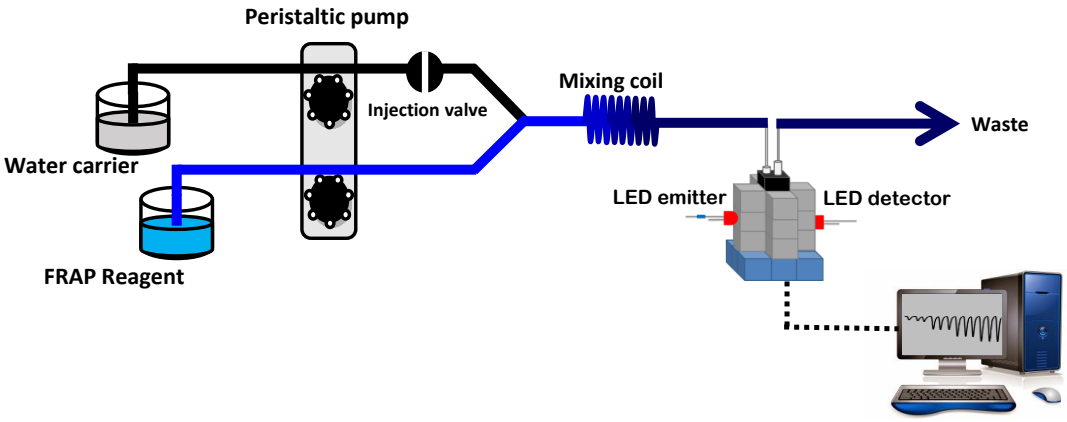
$$Absorbance = -\log \frac{V}{V_0}$$

สมการที่ (1) เมื่อ V คือ ค่าความต่างศักย์ของสารละลายที่ต้องการตรวจวัด (colored solution) และ V_0 คือ ค่าความต่างศักย์ของน้ำกลั่น (100 % transparent solution)

2.4 การจัดระบบการไหลอัตโนมัติแบบโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีเพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริก

ระบบโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นระบบการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ มีการออกแบบและจัดอุปกรณ์ให้สอดคล้องกับวิธีอ้างอิงแบบกะ โดยใช้ปั๊มลูกรีด (peristaltic pump, Model 7521-50, Masterflex, USA) ขับเคลื่อนสารละลายที่เกี่ยวข้องให้ไหลไปในท่อขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร (pump tube, Upchurch Scientific®, USA) ด้วยอัตราเร็วคงที่ตลอดการทดลอง วิเคราะห์ตัวอย่างโดยฉีดสารปริมาตรคงที่แทรกเข้าไปในสารละลายตัวพาผ่านวาล์ว (injection valve, V-540, Upchurch Scientific®, USA) ปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคหรือตัวอย่างกับสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์จะเกิดขึ้นที่ท่อช่วยผสม (mixing coil, id 0.75 mm x 50.00 cm) จากนั้นวัดสัญญาณเมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนไปด้วยอุปกรณ์

ตรวจวัดสีแบบแอลอีดี นำสัญญาณที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างต่อไป ระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนภาพจำลองระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสสำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริก

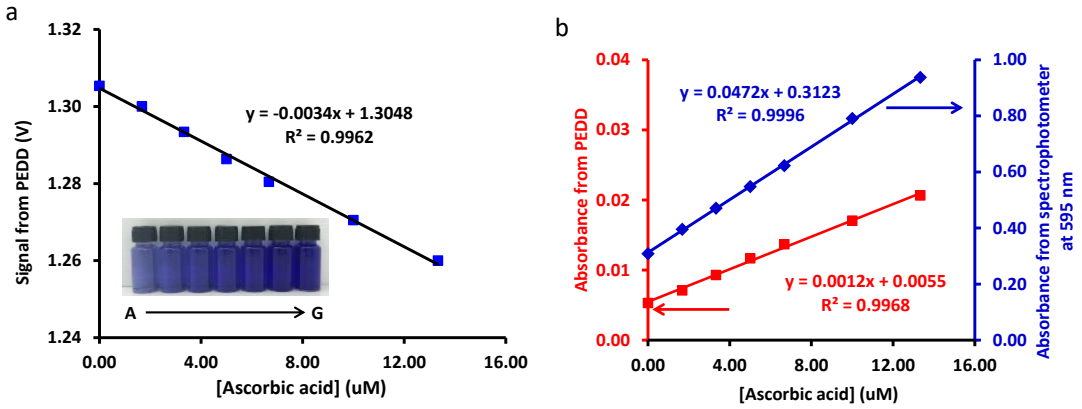
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดี

ประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีตามที่กล่าวในหัวข้อ 2.3 โดยเลือกใช้หลอดแอลอีดีสีแดงเป็นแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัดแสง สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริก แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทดลองด้วยการนำสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ปริมาตรต่าง ๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเหวี่ยง (Vortex, Scientific Industries, Inc., USA) และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำสารละลายไปวัดสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นโวลต์ (V) ที่ได้จากหลอดแอลอีดีที่เป็นตัวตรวจวัดแสงของอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีที่ประดิษฐ์ขึ้น และนำชุดสารละลายเดียวกันนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์โดยพิจารณาจากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2a จะเห็นว่าสัญญาณของสารละลายแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ ที่วัดได้จากอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีมีค่าน้อยลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มากขึ้น ทำให้สีของสารละลายเข้มขึ้นดังแสดงในรูปแทรก 2a จึงมีแสงจากหลอดแอลอีดีที่เป็นแหล่งกำเนิดแสง ส่องผ่านไปยังหลอดแอลอีดีที่เป็นตัวตรวจวัดแสงได้น้อยลง สัญญาณจึงลดลง แล้วอาศัยสมการ (1) ในการเปลี่ยนสัญญาณความต่างศักย์ที่วัดได้จากอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีเป็นค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แสดงผลดังรูปที่ 2b พบว่าความไวในการวิเคราะห์ของ

อุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีน้อยกว่าเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ อย่างไรก็ตาม กราฟมาตรฐานแสดงความเป็นเส้นตรงที่ดีมาก ($R^2 = 0.9968$) แสดงถึงความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณ และความไวในการวิเคราะห์นี้เพียงพอสำหรับการตรวจวัดการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกแล้ว



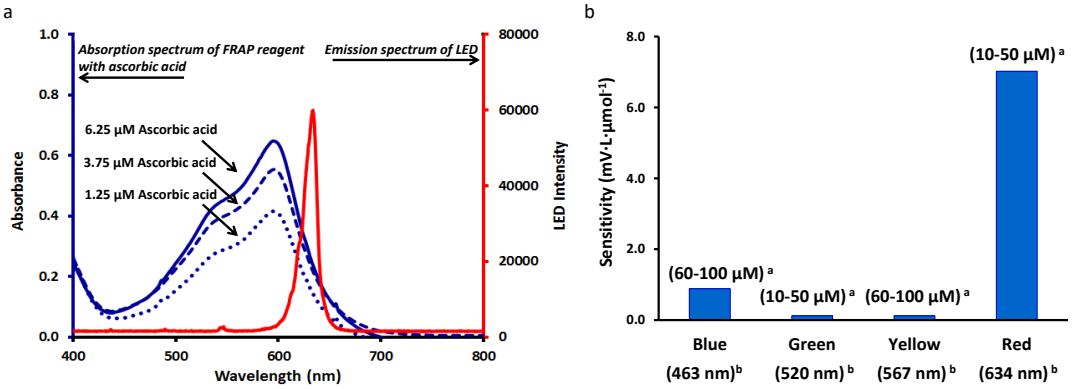
รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคกับสัญญาณที่วัดได้จากอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดี (a) ของสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ [(A) 0.0, (B) 1.67, (C) 3.33, (D) 5.00, (E) 6.67, (F) 10.00 and (G) 13.33 ไมโครโมลาร์] แสดงในรูปแทรก และกราฟมาตรฐานแสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีกับค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (b)

3.2 ผลของสีหลอดแอลอีดี สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดี

ทดลองแบบกะโดยใช้หลอดแอลอีดีสีแดง 2 หลอดที่เหมือนกันทุกประการ (Honglitronic, China) สำหรับสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีเพื่อใช้วัดสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์ซึ่งมีสีน้ำเงิน สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอฟอาร์เอพีเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้น 1.25, 3.75 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ แสดงดังรูปที่ 3a โดยมีช่วงการดูดกลืนแสงระหว่าง 430-700 นาโนเมตร (λ_{max} = 595 นาโนเมตร) เมื่อพิจารณาร่วมกับสเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีแดง (λ_{max} = 634 นาโนเมตร) จะเห็นว่ามีการซ้อนทับกัน ดังนั้นหลอดแอลอีดีสีแดงจึงเหมาะสมสำหรับสร้างอุปกรณ์วัดสีนี้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้หลอดแอลอีดีสีแดงสำหรับตรวจวัดสารละลายโบรโมไทมอลบลู [20]

หลังจากนั้นได้ทดลองการทำงานร่วมกันของอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีกับระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสโดยจัดระบบการไหลดังรูปที่ 1 ใช้อัตราการไหล (flow rate) ของสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์และน้ำตัวพาเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรตัวอย่าง (sample volume) เท่ากับ 300 ไมโครลิตร โดยใช้หลอดแอลอีดีสีแดง ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ (10-50 ไมโครโมลาร์) แล้ววัดสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นมิลลิโวลต์ (mV) ที่ได้จากหลอดแอลอีดีที่เป็นตัว

ตรวจวัดแสง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิค (แกน X) กับความสูงของสัญญาณ (แกน Y) จากนั้นทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนสีของหลอดแอลอีดีทั้งหลอดที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัดเป็นสีอื่น ๆ ทั้งคู่ แล้วเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3b พบว่าเมื่อใช้หลอดแอลอีดีสีแดงให้ความไวในการวิเคราะห์ดีที่สุดในช่วงความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 10-50 ไมโครโมลาร์ สอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 3a เป็นอย่างดี



รูปที่ 3 สเปกตรัมการคายแสงของหลอดแอลอีดีสีแดงและสเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์ที่มีสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (a) กราฟแสดงความไวในการวิเคราะห์ของระบบโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีเมื่อใช้หลอดที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัดเป็นสีต่าง ๆ (b) ([a]Linear range; [b]maximum emission wavelength of LED measured by Ocean optic USB2000)

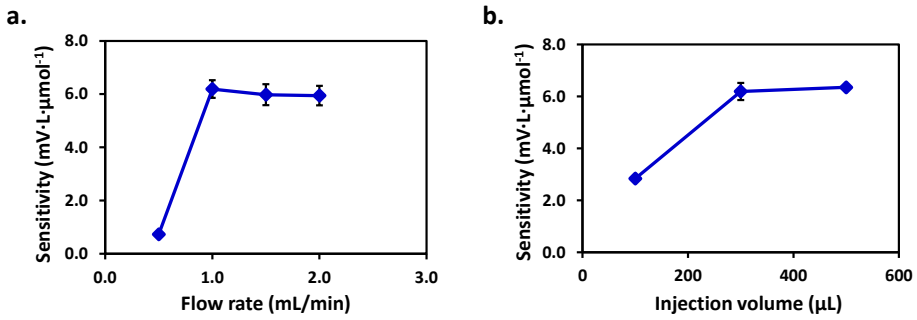
3.3 ผลของอัตราการไหล

การทดลองนี้ทำเพื่อศึกษาผลของอัตราการไหลของสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์และน้ำตัวพาที่มีต่อระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส โดยศึกษาอัตราการไหลของสารในช่วง 0.5-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที จัดระบบการไหลดังรูปที่ 1 ใช้ปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 300 ไมโครลิตร ผลการทดลองในรูปที่ 4a แสดงให้เห็นว่าเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นจาก 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่งผลให้ความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเนื่องจากที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ท่อนโซนที่ตรวจวัดมีการกระจายตัว (dispersion) และเกิดการยืดยาวของท่อนโซน (elongation) น้อย เมื่อเทียบกับที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลเป็น 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ความไวในการวิเคราะห์มีค่าไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ความแม่นยำในการวิเคราะห์ลดลงเล็กน้อยพิจารณาจากแถบความคลาดเคลื่อนที่กว้างขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

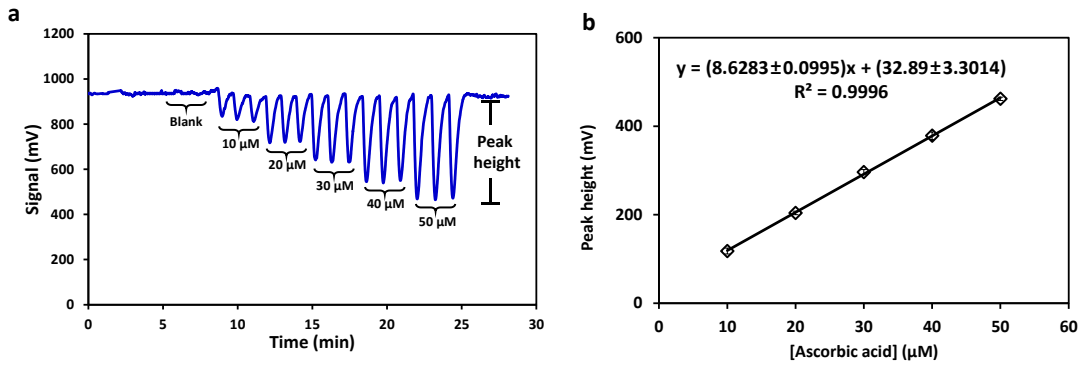
3.4 ผลของปริมาตรตัวอย่าง

ผลของปริมาตรตัวอย่างที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส ศึกษาปริมาตรตัวอย่างในช่วง 100-500 ไมโครลิตร

โดยจัดระบบการไหลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3 และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4b พบว่าความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาตรตัวอย่างมากขึ้น โดยที่ปริมาตรตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร มีความไวในการวิเคราะห์มากกว่าเมื่อใช้ปริมาตรตัวอย่าง 300 ไมโครลิตรเล็กน้อย เมื่อพิจารณาร่วมกับเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์แล้ว งานวิจัยนี้เลือกใช้ปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 300 ไมโครลิตร เนื่องจากให้ความไวในการวิเคราะห์ที่เพียงพอและใช้เวลาวิเคราะห์ไม่นานจนเกินไป (ความเร็วในการวิเคราะห์ 40 วินาที/ตัวอย่าง)



รูปที่ 4 กราฟแสดงผลของอัตราการไหล (a) และผลของปริมาตรตัวอย่าง (b)



รูปที่ 5 สัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ กับสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์ด้วยระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดี เมื่อใช้หลอดแอลอีดีสีแดง อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรสารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร (a) และกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคกับความสูงของสัญญาณ (b)

3.3 คุณลักษณะการวิเคราะห์

ศึกษาคุณลักษณะการวิเคราะห์ของวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ โดยใช้ความยาวของท่อช่วยผสม 50 เซนติเมตร และลดความยาวของท่อที่เชื่อมต่อกันทุกท่อให้สั้นที่สุด เพื่อให้ระบบโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วที่สุด ซึ่งพบว่าสามารถวิเคราะห์ได้เร็วถึง 90 ตัวอย่างต่อชั่วโมง สัญญาณที่

บันทึกได้และกราฟมาตรฐานแสดงดังในรูปที่ 5 ได้กราฟมาตรฐานสำหรับใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน y = (8.6283±0.0995)x + (32.89±3.3014) และมีค่าความเป็นเส้นตรง (R^2) เท่ากับ 0.9996 ในช่วงความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิค 10-50 ไมโครโมลาร์ โดยมีขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (LOD) เท่ากับ 6.12 ไมโครโมลาร์ และความเที่ยงในการวิเคราะห์ (precision, %RSD) เท่ากับ 2.15 เมื่อทำการทดลองโดยฉีดกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ จำนวน 10 ครั้ง จากคุณลักษณะการวิเคราะห์นี้แสดงให้เห็นว่าระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสที่ใช้ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสีสำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3.4. การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมของตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมชง

งานวิจัยนี้ได้นำอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีมาใช้ร่วมกับระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสเพื่อใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมชง แล้วเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม สำหรับวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริคแบบดั้งเดิม โดยทดลองแบบกะด้วยการนำสารละลายเอฟอาร์เอพีรีเอเจนท์ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ หรือสารละลายตัวอย่างปริมาตรต่าง ๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเหวี่ยงและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิค คำนวณความเข้มข้นแล้วรายงานเป็นค่า AAE [21] สำหรับวิธีโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสสามารถหาค่า TAC ได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิค (รูป 5b) แล้วรายงานเป็นค่า AAE เช่นกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมชง 10 ตัวอย่างของทั้งวิธีโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสและวิธีดั้งเดิมแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าทั้ง 2 วิธี มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ *t*-test (paired two sample for means) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่า t_{stat} มีค่าเท่ากับ 0.38 ซึ่งน้อยกว่า $t_{critical}$ ที่มีค่าเท่ากับ 2.26 ดังนั้นผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีนี้จึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [22] แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีที่ประดิษฐ์ขึ้นมาใช้ในงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ และอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีนี้สามารถนำมาใช้ทดแทนเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีราคาแพงได้ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

4 สรุป

งานวิจัยนี้ได้สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีแล้วประยุกต์สำหรับประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธีรีดิวซเฟอรริก โดยใช้ร่วมกับระบบการไหลอัตโนมัติแบบโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบโฟลอินเจคชันอะนาไลซิสจะได้กราฟมาตรฐานที่มีสมการเส้นตรง y = (8.6283±0.0995)x + (32.89±3.3014) และมีความเป็นเส้นตรงที่ดี (R^2 = 0.9996) มีช่วงความเป็นเส้นตรง 10-50 ไมโครโมลาร์ มีความแม่นยำสูง (%RSD = 2.15) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ คือ 6.12 ไมโครโมลาร์ พบว่าระบบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วถึง 90 ตัวอย่าง ใน 1 ชั่วโมง สุดท้ายนำระบบที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มาวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวมใน

ตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมชงที่มีขายตามท้องตลาด แล้วเปรียบเทียบผลที่วิเคราะห์ได้กับการทดลองแบบดั้งเดิมด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าผลที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ข้อดีของงานวิจัยนี้ คือ สามารถประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้อย่างรวดเร็วโดยอาศัยกราฟมาตรฐาน และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกลงทั้งราคาสารเคมีและราคาอุปกรณ์ตรวจวัดสี อย่างไรก็ตาม สารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างนั้นมีหลายชนิดและอาจมีกลไกการต้านออกซิเดชันแตกต่างกัน ดังนั้นในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันจึงควรใช้ผลการวิเคราะห์มากกว่าหนึ่งวิธีมาพิจารณาร่วมกัน โดยสามารถนำระบบการไหลและอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดีนี้ไปประยุกต์ใช้ได้

ตารางที่ 1 ค่า ascorbic acid equivalent (AAE) ในตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรพร้อมชง 10 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกจากระบบการไหล (FIA method) ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดสีแบบแอลอีดี เปรียบเทียบกับ AAE จากวิธีดั้งเดิมแบบกะ (classical method)

ตัวอย่าง	AAE (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง)	
	วิเคราะห์ด้วยระบบการไหลโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส	วิเคราะห์ด้วยวิธีดั้งเดิมแบบกะ
ตัวอย่าง 1	0.68±0.42	0.55±0.01
ตัวอย่าง 2	0.39±0.08	0.59±0.07
ตัวอย่าง 3	3.46±0.14	3.13 ±0.17
ตัวอย่าง 4	2.75±0.38	3.66±0.14
ตัวอย่าง 5	3.02±0.53	4.71±0.14
ตัวอย่าง 6	32.45±0.31	36.64±1.76
ตัวอย่าง 7	55.40±0.64	53.79±2.96
ตัวอย่าง 8	66.82±0.50	70.57±4.19
ตัวอย่าง 9	73.42 ±0.12	71.62±6.81
ตัวอย่าง 10	100.80±0.13	99.99±24.25

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยสาหรับอาจารย์หลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกจากกองทุนวิจัยและสร้างสรรค์คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 (SRF-PRG-2560-09) และทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับบัณฑิต พสวท. แรกบรรจุปีงบประมาณ 2556 (017/2557) นอกจากนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีรวมถึงสถานที่ในการทำวิจัย

6. รายการอ้างอิง

[1] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an

improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biol. Med. 26: 1231-1237.

[2] Arts, M.J.T.J., Dallinga, J.S., Voss, H.P., Haenen, G.R.M.M. and Bast, A., 2004, A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay, Food Chem. 88: 567-570.

[3] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT Food Sci. Technol. 28: 25-30.

[4] Sharma, O.P. and Bhat, T.K., 2009, DPPH antioxidant assay revisited, Food Chem. 113: 1202-1205.

[5] Benzie, I.F.F. and Szeto, Y.T., 2005, Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay, J. Agric. Food Chem. 47: 633-636.

[6] Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., and Saso, L., 2005, Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ‘ferric reducing antioxidant power’ assay and cyclic voltammetry, Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1721: 174-184.

[7] บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556, อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 275-286.

[8] Mieczkowska, E., Koncki, R. and Tymecki, L., 2011, Hemoglobin determination with paired emitter detector diode, Anal. Bioanal. Chem. 399: 3293-3297.

[9] Pokrzywnicka, M., Tymecki, Ł. and Koncki, R., 2012, Low-cost optical detectors and flow systems for protein determination, Talanta 96: 121-126.

[10] Strzelak, K., Koncki, R. and Tymecki, Ł., 2012, Serum alkaline phosphatase assay with paired emitter detector diode, Talanta 96: 127-131.

[11] Tymecki, Ł., Korszun, J., Strzelak, K. and Koncki, R., 2013, Multicommutated flow analysis system for determination of creatinine in physiological fluids by jaffe method, Anal. Chim. Acta 787: 118-125.

[12] Tymecki, Ł., Strzelak, K., and Koncki, R., 2013, Biparametric multicommutated flow analysis system for determination of human serum phosphoesterase activity, Anal. Chim. Acta 797: 57-63.

[13] Michalec, M., Tymecki, Ł. and Koncki, R., 2016, Biomedical analytical monitor of artificial kidney operation: Monitoring of creatinine removal, J. Pharm. Biomed. Anal. 128: 28-34.

[14] Saetear, P., Khamtau, K., Ratanawimarn wong, N., Sereenonchai, K. and Nacapri cha, D., 2013, Sequential injection system for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks using paired emitter-detector diode sensor, Talanta 115: 361-366.

[15] Fiedoruk-Pogrebniak, M. and Koncki, R., 2015, Multicommutated flow analysis system based on fluorescence micro

detectors for simultaneous determination of phosphate and calcium ions in human serum, Talanta 144: 184-188.

[16] Lau, K.T., McHugh, E., Baldwin, S. and Diamond, D., 2006, Paired emitter-detector light emitting diodes for the measurement of lead(II) and cadmium(II), Anal. Chim. Acta 569: 221-226.

[17] Rybkowska, N., Koncki, R. and Strzelak, K., 2017, Optoelectronic iron detectors for pharmaceutical flow analysis, J. Pharm. Biomed. Anal. 145: 504-508.

[18] Rybkowska, N., Strzelak, K. and Koncki, R., 2018, A comparison of photometric methods for serum iron determination under flow analysis conditions, Sensors Actuators, B Chem. 254: 307-313.

[19] สุมนมาลย์ จันทร์เอี่ยม, นันทยา ม่านทอง, กมลชนก พูลสวัสดิ์, ศิริภัทร นิติกรนุสรณ์, รัศมี ชัยสุขสันต์ และดวงใจ นาคะปรีชา, 2559, การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยระบบวิเคราะห์การไหลอัตโนมัติร่วมกับส่วนตรวจวัดพีอีดีดีแบบประหยัด, Veridian E-J. 5: 82-92.

[20] Tymecki, Ł., and Koncki, R., 2009, Simplified paired-emitter-detector-diodes -based photometry with improved sensitivity, Anal. Chim. Acta 639: 73-77.

[21] Pisoschi, A.M. and Negulescu, G.P., 2011, Methods for total antioxidant activity determination: A review, Biochem. Anal. Biochem. 1: 1-10.

[22] Miller, J.N. and Miller, J.C., 2005, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5th Ed., Pearson Education Limited, Gosport.