รายงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

---

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 พัฒนาเทคนิคระบบการตรวจวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พืช

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในพืช

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Method Validation on Analysis of Antioxidant in Plant

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง สุภานันทน์ จันทร์ประอบ สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน เรวดี ศิริยาน สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

จุลศักดิ์ บุญรัตน์ สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช ด้วย DPPH radical scavenging capacity assay วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้สารละลาย trolox เป็นสารมาตรฐาน จากการตรวจสอบพบว่า ช่วงการใช้งาน (range) ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0 - 50 mg/L มีค่า correlation coefficient (r) 0.997 มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 5 - 30 mg/L โดยให้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.998 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีนี้ (limited of detection ; LOD) เท่ากับ 1.17 mg/L ปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้องแม่นยำ (limited of quantitative ; LOQ) เท่ากับ 2.00 mg/L เมื่อตรวจสอบความแม่น

(accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์ ด้วยการคำนวณ % recovery และค่าHORRAT (Horwitz's Ratio) จากการ spike ด้วยสารละลาย trolox ที่ความเข้มข้น 2, 30 และ 85 mg/L ใน sample blank พบว่า ค่า % recovery เท่ากับ 95.03, 98.03 และ 87.63 % ตามลำดับ และค่า HORRAT เท่ากับ 1.07, 0.26 และ 0.65 ตามลำดับ ซึ่งจากการวิเคราะห์ค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995 ค่า % recovery อยู่ในช่วง 85-120 % และค่า HORRAT ≤ 2 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้น การวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช ด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity assay จึงสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการได้

The DPPH radical scavenging capacity assay which use to determine the amount of plant antioxidant content by measure total antioxidant capacity (TAC), was validated in this study. The results from the validation, the working range at 0 to 50 mg/L of trolox solution produced the correlation coefficient value (r) 0.997 and the correlation coefficient value of linearity which trolox ranged from 5 to 30 mg/L is 0.998. Limitation of detection (LOD) and Limitation of quantitative (LOQ) were 1.17 mg/L and 2.00 mg/L repetitively. The accuracy and precision were validated by spiked with trolox solution at concentration as 2, 30 and 85 mg/L to sample blank and estimated percentage of recovery and HORRAT ratio. As the results, the percentage of recovery was 95.35, 98.03 and 87.63 repetitively thus the accuracy accepted to AOAC. While HORRAT ratio was 1.07, 0.26, and 0.65 that also accepted to AOAC (HORRAT ≤ 2). From this study, it can concluded that the validated method, DPPH radical scavenging capacity assay, can used as a standard method for plant antioxidant content.

6. คำนำ

อนุมูลอิสระ (oxidants) คือ อะตอม โมเลกุลหรือสารประกอบที่มีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ไกรสิทธิ์และคณะ, 2538) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารพวกเอนไซม์หรือสารอื่นที่สามารถชะลอหรือทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไป ร่างกายของคนเรามีการสร้างอนุมูลอิสระจำพวก reactive oxygen species (ROS) (Halliwell and Gutteridge, 1998) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไฮดรอกซิลแรดิคัล ($HO^{\bullet}$) เปอร์ออกซิลแรดิคัล ($ROO^{\bullet}$) และซูเปอร์ออกไซด์แรดิคัล ($O2^{-\bullet}$) ขึ้นมาผ่านกระบวนการหายใจ ในคนปกติร่างกายจะมีระบบสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative defense system) ที่เป็น เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น superoxide dismutase, catalase และ phospholipase และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ขึ้นมา เพื่อรักษาระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับสมดุล แต่ถ้าในสภาวะที่ระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระไม่อยู่ในระดับสมดุล คือมีปริมาณของสารอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าปริมาณ

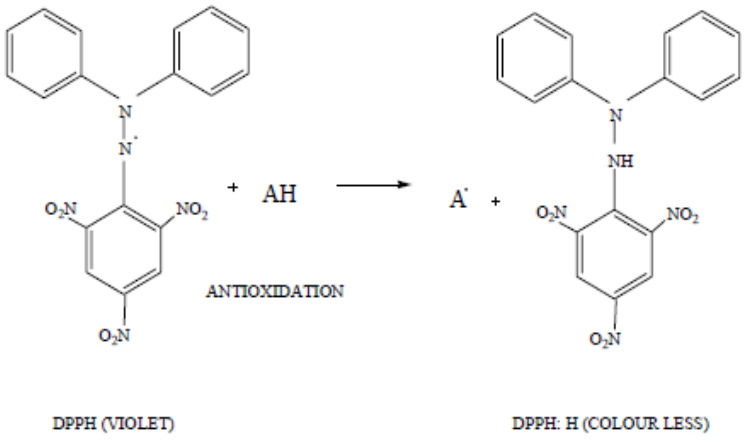
ของสารต้านอนุมูลอิสระ สภาวะเช่นนี้เรียกว่าเกิด สภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular), อัลไซม์เมอร์ (Alzheimer's disease), พาร์คินสัน (Parkinson's disease) หรือแม้แต่การแก่ก่อนวัย (aging) (Halliwell and Gutteridge, 1998; โอภาและคณะ, 2550) มีรายงานว่าการรับประทานสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินชนิดต่างๆ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฯลฯ ทั้งจากอาหารและผลิตภัณฑ์เสริม เช่น ยาเม็ดวิตามินรวม หรือสารสกัดจากพืชธรรมชาติ สามารถช่วยป้องกันร่างกายจากสภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลได้ (Packer *et al*., 1999)

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์, วิตามินเอ, วิตามินซี, หรือสารประกอบฟีโนลิก (Zulueta *et al*., 2007) เนื่องจากปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักสมุนไพรหนึ่งๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายๆ ชนิดผสมกันอยู่ รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าคือสารใด ดังนั้นในความเป็นจริงการที่จะวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่างโดยแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างจึงเป็นการยาก และอาจไม่จำเป็น งานวิจัยส่วนมากจึงสนใจประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) มากกว่าที่จะต้องวิเคราะห์จนระบุชี้ชัดว่าเป็นสารใด การวัด TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า (Wang *et al*., 1996)

การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เป็นการวิเคราะห์ค่า TAC (เสาวนีย์และคณะ, 2554) โดยเป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง เมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจนจะเปลี่ยนเป็น DPPH:H มีลักษณะเป็นสารละลายสีเหลือง วิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Yamazaki *et al*., 1994)

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชันออกมาในค่า (%) scavenging activity of DPPH radicals ตามสมการดังนี้

% scavenging activity of DPPH radicals = $[(A_{517}$ control – A_{517} test sample)/ A_{517} control)] x 100



ภาพที่ 1 การหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ (Blois, 1958)

7. วิธีดำเนินการ

7.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

7.1.1 ขวดวัดปริมาตร สีชา

7.1.2 ขวดสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร

7.1.3 ปิเปต

7.1.4 บีกเกอร์

7.1.5 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง

7.1.6 เครื่อง UV/vis spectrophotometer รุ่น U-2001 ยี่ห้อ HITACHI

7.2 สารเคมี

7.2.1.DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

7.2.2.methanol

7.2.3.trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

7.3 วิธีการ

7.3.1.การตรวจสอบช่วงการใช้งาน (rang) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช

7.3.1.1.นำเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็น sample blank มา 2.000 กรัม เติมสารละลายโทรลอกซ์ (trolox) 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเติมเมธานอล (methnol) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

7.3.1.2.เขย่า โดยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.3.1.3.นำตัวอย่างที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

7.3.1.4.นำสารละลายที่ผ่านการกรอง 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอล

7.3.1.5.นำสารละลายจากข้อ 7.3.1.4.ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่า เก็บในที่มืด 30 นาที

7.3.1.6.วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7.3.1.7.คำนวณค่า (%) scavenging activity of DPPH radicals ของตัวอย่าง จากสูตร

(%) scavenging activity of DPPH radicals = $[(A_{517blank}-A_{517sample})/ A_{517sample}] \times 100$

$A_{517blank}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

$A_{517sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7.3.1.8.วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่าง (แกน x) กับ (%) scavenging activity of DPPH radicals (แกน y)

7.3.2.ตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช

7.3.2.1.นำเซลลูโลส 2.000 กรัม เติมสารละลายโทรลอกซ์ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเติมเมธานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร

7.3.2.2.เขย่า โดยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.3.2.3.นำตัวอย่างที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

7.3.2.4.นำสารละลายที่ผ่านการกรอง 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอล

7.3.2.5.นำสารละลายจากข้อ 7.3.2.4.ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่า เก็บในที่มืด 30 นาที

7.3.2.6.วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7.3.2.5.คำนวณค่า (%) scavenging activity of DPPH radicals ของตัวอย่าง จากสูตร

(%) scavenging activity of DPPH radicals = $[(A_{517blank}-A_{517sample})/ A_{517sample}] \times 100$

$A_{517blank}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

$A_{517sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7.3.2.7.วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่าง (แกน x) กับ (%) scavenging activity of DPPH radicals (แกน y)

7.3.3.การทดสอบค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ (limited of detection ; LOD) และการทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้องแม่นยำ (limited of quantitative ; LOQ)

7.3.3.1. นำเซลลูโลส 2.000 กรัม เติมเมธานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำ

7.3.3.2. เขย่า โดยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.3.3.3. นำตัวอย่างที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

7.3.3.4. นำสารละลายที่ผ่านการกรอง 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอล

7.3.3.5. นำสารละลายจากข้อ 7.3.3.4. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่า เก็บในที่มืด 30 นาที

7.3.3.6. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7.3.3.7. คำนวณค่า (%) scavenging activity of DPPH radicals ของตัวอย่าง จากสูตร

(%) scavenging activity of DPPH radicals = $[(A_{517blank}-A_{517sample})/ A_{517sample}] \times 100$

$A_{517blank}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

$A_{517sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ที่ความ ยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7.3.3.8.วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่าง (แกน x) กับ (%) scavenging activity of DPPH radicals (แกน y)

7.3.3.9.คำนวณหา ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ sample blank

7.3.3.10.คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

LOD = mean + 3 (SD)

LOQ = mean + 10 (SD)

7.3.4.การตรวจสอบความแม่น (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช

7.3.4.1. นำเซลลูโลส 2.000 กรัม เติมสารละลายโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 2, 30 และ 85 ppm และเมธานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการทดลองที่ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

7.3.4.2. เขย่า โดยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.3.4.3. นำตัวอย่างที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

7.3.4.4. นำสารละลายที่ผ่านการกรอง 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอล

7.3.4.5. นำสารละลายจากข้อ 7.3.4.4. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่า เก็บในที่มืด 30 นาที

7.3.4.6. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7.3.4.7. คำนวณค่า (%) scavenging activity of DPPH radicals ของตัวอย่าง จากสูตร

(%) scavenging activity of DPPH radicals = $[(A_{517blank}-A_{517sample})/ A_{517sample}] \times 100$

$A_{517blank}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

$A_{517sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ที่ความ ยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7.3.4.8.วิเคราะห์หา % relative accuracy หรือ % recovery จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ trolox กับ (%) scavenging activity of DPPH radicals

7.3.5.การตรวจสอบความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช

7.3.5.1.นำข้อมูลผลการวิเคราะห์ จากข้อ 7.3.4 มาวิเคราะห์โดยใช้ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากสูตร

HORRAT (Horwitz's Ratio) = (% RSD Experiment)/(Predicted Horwitz RSD)

%RSD = (SD x 100)/ Mean

Predicted Horwitz RSD = $0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$

C = Concentration

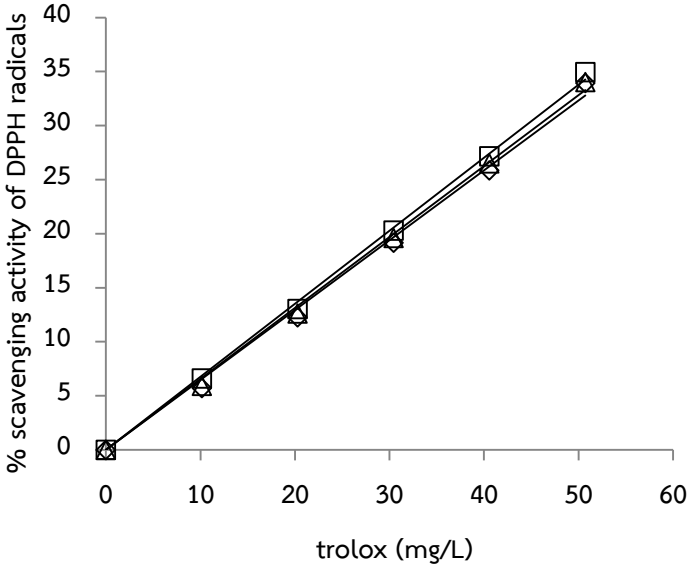
8.ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2556 - กันยายน 2557 ระยะเวลา 1 ปี

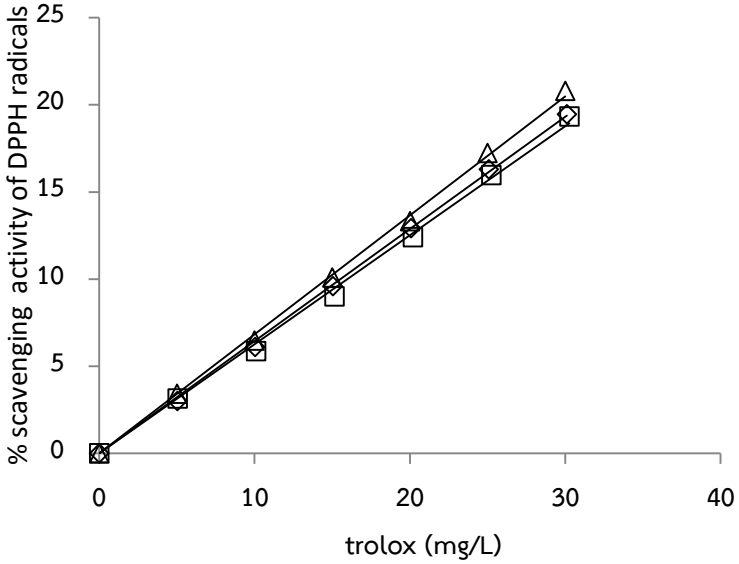
สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

9.ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช ด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity assay พบว่า เมื่อตรวจสอบช่วงการใช้งาน (range) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในช่วง 0 - 50 mg/L มีค่า correlation coefficient (r) 0.997 (ดังภาพที่ 2) ตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในช่วง 5 - 30 mg/L มีค่า correlation coefficient 0.998 (ดังภาพที่ 3) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ($r \geq 0.995$) โดยมีค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ (limited of detection ; LOD) 1.17 mg/L และมีค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (limited of quantitative ; LOQ) 2.00 mg/L การตรวจสอบความแม่น (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการคำนวณ % recovery จากการ spike ด้วยสารละลาย trolox ที่ความเข้มข้น 2, 30 และ 85 mg/L ใน sample blank โดยทดสอบที่ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า ค่า % recovery เท่ากับ 95.35, 98.03 และ 87.63 % ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (ตามมาตรฐาน AOAC กำหนดให้ที่ความเข้มข้น 1 – 100 mg/l ต้องมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 85-120 %) และเมื่อตรวจสอบความเที่ยง (precision) ด้วยการประเมิน repeatability มีค่า HORRAT เท่ากับ 1.07 0.26 และ 0.65 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (ตามมาตรฐาน AOAC กำหนดให้ HORRAT ≤ 2)



ภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า (%) scavenging activity of DPPH radicals กับสารละลาย trolox ในช่วง 10 - 50 mg/L



ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า (%) scavenging activity of DPPH radicals กับสารละลาย trolox ในช่วง 5 - 30 mg/L

8. สรุปผลการดำเนินงานและคำแนะนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช ด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity assay พบว่า ช่วงการใช้งาน (rang) 0 - 50 mg/L และ เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ที่ 5 - 30 mg/L มีค่า $r \geq 0.995$ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC โดยมีค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ (limited of detection ; LOD) 1.17 mg/L และมีค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (limited of quantitative ; LOQ) 2.00 mg/L การตรวจสอบความแม่น (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์เมื่อคำนวณ % recovery จากการ spike ด้วยสารละลาย trolox ที่ความเข้มข้น 2, 30 และ 85 mg/L ใน sample blank โดยทดสอบที่ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า ค่า % recovery เท่ากับ 95.35, 98.03 และ 87.63 % ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC และเมื่อตรวจสอบความเที่ยง (precision) ด้วยการประเมิน repeatability มีค่า HORRAT เท่ากับ 1.07, 0.26 และ 0.65 ตามลำดับ โดยผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ดังนั้น การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช ด้วยวิธี DPPH radical scavenging

capacity assay จึงสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นต่อไป

9. การนำไปใช้ประโยชน์

- นำการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืช ด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity assay มาเป็นวิธีวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ และเผยแพร่ให้แก่ผู้ที่สนใจต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์, ประภาศรี ภูวเสถียร และริญ เจริญศิริ. 2538. **โภชนาการและส่งเสริมสุขภาพ**. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.

เสาวนีย์ เหล่าสิงห์, ศิริธร อ่างแก้ว และ มะลิวรรณ อมตธงไชย. 2554. **เทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์**. วารสารวิทยาศาสตร์ ม. อุบลฯ: 10-20.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุญยรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2550. **สารต้านอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging Agents).** กรุงเทพ: นิวไทยมิตรการพิมพ์.

AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002.

Blois M.S. 1958. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical**. Nature, 181: 1199-1200.

Brandwilliams 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.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 1998. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Clarendon Press: Oxford, UK.

Packer L., Hiramatsu M. and Yoshikawa T. 1999. **Antioxidant food supplements in human health**. Academic Press: London, UK.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R.L. 1996. **Total Antioxidant Capacity of Fruits**. J. Agric. Food Chem., 44(3), 701-5.

Yamazaki K., Hashimoto A., Kokusenya Y., Miyamoto T. and Sato T. 1994. **Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs**. Chem Pharm Bull 42:1663-5.

Zulueta A., Esteve M.J., Frasquet I. and 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.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ ค่า % scavenging activity of DPPH radicals ใน sample blank จำนวน 10 ซ้ำ

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	% DPPH scavenging activity
blank	1.831	
เซลลูโลส 1	1.813	0.98
เซลลูโลส 2	1.815	0.87
เซลลูโลส 3	1.812	1.04
เซลลูโลส 4	1.813	0.98
เซลลูโลส 5	1.814	0.93
เซลลูโลส 6	1.813	0.98
เซลลูโลส 7	1.812	1.04
เซลลูโลส 8	1.814	0.93
เซลลูโลส 9	1.813	0.98
เซลลูโลส 10	1.811	1.09

ค่าเฉลี่ย	1.813	0.98
SD	0.001	0.06
LOD		1.17
LOQ		1.61

ตัวอย่าง การคำนวณ ค่า % scavenging activity of DPPH radicals

% scavenging activity of DPPH radicals = { (1.831 – 1.813) / 1.831} x 100

= 0.98 %

โดย 1.831 เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

1.813 เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลลูโลส

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ค่า % scavenging activity of DPPH radicals เมื่อ spike สารละลาย trolox ที่ความเข้มข้น 2, 30 และ 85 mg/l ใน sample blank จำนวน 10 ซ้ำ

ตัวอย่าง	% scavenging activity of DPPH radicals			
	sample blank	trolox 2 mg/L	trolox 30 mg/L	trolox 85 mg/L
1	0.98	2.19	19.67	49.80
2	0.87	2.35	19.61	48.73
3	1.04	2.24	19.44	47.39
4	0.98	2.19	20.07	48.73
5	0.93	2.30	20.13	47.92
6	0.98	2.19	20.01	47.92
7	1.04	2.30	20.47	48.46
8	0.93	2.19	20.01	48.19

9	0.98	2.02	19.55	48.19
10	1.09	2.13	19.95	53.30
ค่าเฉลี่ย	0.98	2.21	19.89	48.86
SD	0.06	0.09	0.32	1.69

ตัวอย่าง การคำนวณ เมื่อ spike สารละลาย trolox 2 mg/L ใน sample blank

% Recovery = { (2.21 % - 0.98 %) / 1.29 %} x 100

= 95.35 %

โดย 2.21 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals เมื่อ spike สารละลาย trolox 2 mg/L ใน sample blank

0.98 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals ของ sample blank

1.29 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals เมื่อ trolox 2 mg/L

ตัวอย่าง การคำนวณ เมื่อ spike สารละลาย trolox 30 mg/L ใน sample blank

% Recovery = { (19.89 % - 0.98 %) / 19.29 %} x 100

= 98.03 %

โดย 19.89 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals เมื่อ spike สารละลาย trolox 30 mg/L ใน sample blank

0.98 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals ของ sample blank

19.29 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals เมื่อ trolox 30 mg/L

ตัวอย่าง การคำนวณ เมื่อ spike สารละลาย trolox 85 mg/L ใน sample blank

% Recovery = { (48.86 % - 0.98 %) / 54.64 %} x 100

= 87.63 %

โดย 19.89 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals เมื่อ spike สารละลาย trolox 30 mg/L ใน sample blank

0.98 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals ของ sample blank

19.29 % เท่ากับ % scavenging activity of DPPH radicals เมื่อ trolox 30 mg/L