

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์

Development of a Method for Antioxidant Activity Analysis

Using Iron Oxide Nanoparticles

พัชราภรณ์ ทองสุข และ ยุพาพร สมี่น้อย*

Pacharaporn Thongsuk and Yupaporn Sameenoi*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

Received : 15 May 2018

Accepted : 23 October 2018

Published online : 20 November 2018

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ได้พัฒนาอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หลักการการวิเคราะห์อาศัยความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งโดยปกติแล้วทำปฏิกิริยากับเตตระเมทิลเบนซิดีนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี ในสภาวะที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระจะถูกดักจับจึงทำให้สีของเตตระเมทิลเบนซิดีนลดลงซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เริ่มต้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานแกลลิกเพื่อศึกษาค่าทางการวิเคราะห์และปฏิกิริยาของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น พบว่าให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 0.8 mM ซีดจำกัดการตรวจวัด 0.2 mM และมีความสามารถการทำซ้ำที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5 and 0.6 mM ที่มีร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 6.6 - 16.1 % (n = 5) หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีดีพีพีเอสดั้งเดิม โดยวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างน้ำผลไม้ทั้งหมด 7 ชนิด พบว่าให้ค่าสอดคล้องกันแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มใช้เป็นทางเลือกในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจริงได้

คำสำคัญ : อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์, สารต้านอนุมูลอิสระ, สมบัติเหมือนเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

*Corresponding author. E-mail : yupaporn@buu.ac.th

Abstract

This work presents an iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4 NPs) for antioxidant activity analysis for the first time. The analysis of antioxidant activity is based on quenching ability of the antioxidant to the reactive oxygen species produced from the reaction of Fe_3O_4 NPs and H_2O_2 which are normally react with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) resulting in color change. In the presence of antioxidant, the reactive oxygen species are captured resulting in lower degree of color intensity of TMB which is proportional to the antioxidant activity. Firstly, Fe_3O_4 NPs concentration and reaction time were optimized. Using optimal condition, gallic acid, used as an antioxidant standard, was analyzed using the developed method to study the analytical performance and antioxidant behavior. The linearity was in the concentration range of 0.2-0.8 mM with a limit of detection of 0.2 mM. The reproducibility from the analysis of GA at concentrations of 0.2, 0.5 and 0.6 mM was observed with the relative standard deviation (% RSD) in the range of 6.6 - 16.1 % ($n = 5$). Finally, the developed method was validated against the traditional DPPH assay from antioxidant activity analysis of 7 fruit samples. The results showed that the antioxidant activity obtained from the two methods were well correlated indicating that the developed method is promising to be an alternative method for antioxidant activity analysis in real samples.

Keywords : iron oxide nanoparticles, antioxidants, peroxidase-like activity

บทนำ

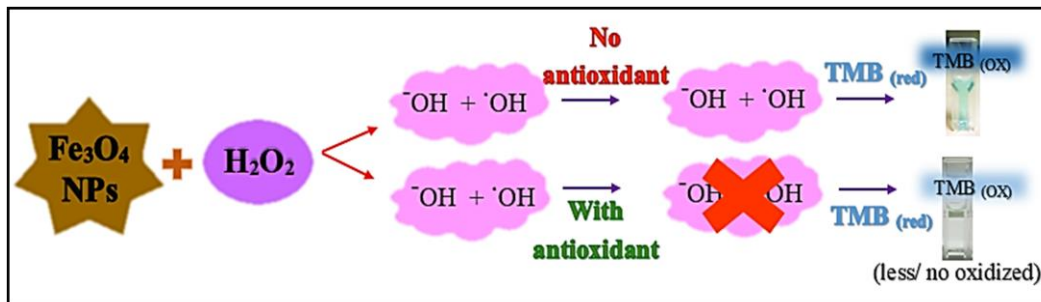
อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ในอะตอมหรือโมเลกุล โดยส่วนมากจะพบได้ในกระบวนการเผาผลาญอาหาร หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ต่างๆ ของเซลล์ (Karolina *et al.*, 2016) นอกจากนี้ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ โอโซน (ozone) รังสียูวี (UV- ray) คาร์บอนที่ และควันจากท่อไอเสียรถยนต์ เป็นต้น (Scott *et al.*, 2004) มักเกิดโปร-ออกซิแดนต์ (pro-oxidant) ขึ้นได้ตลอดเวลา ซึ่งโปรออกซิแดนต์ที่สำคัญคือ สารประกอบออกซิเจนว่องไวสูง (reactive oxygen species, ROS) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระ มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร (Halliwell, 1999) นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดความเสียหายแก่โมเลกุลที่ได้รับผลกระทบ ก่อให้เกิดเป็นสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรือเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ จึงทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคหัวใจวาย โรคมะเร็ง โรคผิวหนัง และโรคหลอดเลือดแข็ง เป็นต้น (Halliwell, 1999) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกกำจัดด้วยสารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ โดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่มีความเสถียร (Mahantesh *et al.*, 2012) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ ได้แก่ การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การจับกับโลหะที่สามารถ

เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) การหยุดปฏิกิริยาการสลายอนุมูลอิสระ (chain-breaking) การเสริมฤทธิ์ (synergism) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Sies, 1992) สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่สามารถพบได้ในผักผลไม้ (Hamid, Aiyelaagbe, Usman, Ameen, & Lawal, 2010)

ตัวอย่างวิธีดั้งเดิมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ได้แก่ การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) (Babu, Gurusamy, Borra, & Cherian, 2013) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอซ (diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) (Que *et al.*, 2006) และวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Byrne, 2006) แม้ว่าวิธีเหล่านี้มีการใช้วัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามยังมีข้อด้อยอยู่บ้าง เช่น วิธี DPPH และ ABTS เป็นการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกการดักจับอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ DPPH[•] และ ABTS⁺ ซึ่งอนุมูลอิสระดังกล่าว ไม่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ จึงไม่สามารถสื่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างแท้จริงของตัวอย่างในการดักจับอนุมูลอิสระที่พบได้ในธรรมชาติ เช่น HO[•] หรือ O₂[•] เป็นต้น

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีใหม่ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ (Fe₃O₄ Nanoparticles, NPs) เพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกการดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ได้แก่ HO[•] หรือ O₂[•] โดย Fe₃O₄ NPs เป็นอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร (Burda, Chen, Narayanan, & El-Sayed, 2005) ในปัจจุบันได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และไบโอเซนเซอร์ (Mauter, & Elimelech, 2008) เนื่องจากมีสมบัติแม่เหล็ก และเมื่อไม่นานมานี้อนุภาคนาโนดังกล่าวยังถูกค้นพบว่ามีสมบัติเหมือนเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase-like activity) คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H₂O₂) กับซับสเตรตได้ (Gao *et al.*, 2007) ซึ่งซับสเตรตที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) o-phenylenediamine (OPD) 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ diazo-aminobenzene (DAB) เป็นต้น โดยกลไกการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ H₂O₂ ด้วย Fe₃O₄ NPs ได้มีการเสนอไว้ดังแสดงในภาพที่ 1 กล่าวคือในอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์จะประกอบไปด้วยมีเฟอร์รัสไอออน (ferrous ion, Fe²⁺) และเฟอริกไอออน (ferric ion, Fe³⁺) ซึ่งไอออนทั้งสองนี้ทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลอิสระ (free radicals) ได้แก่ hydroxyl radical (OH[•]) (Chen *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010) ซึ่งอนุมูลเหล่านี้จะไปทำปฏิกิริยากับซับสเตรต ทำให้ซับสเตรตเกิดการเปลี่ยนแปลงสีได้ เมื่ออนุมูลอิสระมีจำนวนมาก จะทำให้ความเข้มสีของซับสเตรตเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้อาศัยกลไกดังกล่าวในการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการดักจับอนุมูลอิสระ โดยในภาวะที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl radical (OH[•]) จะถูกดักจับด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้มีปริมาณอนุมูลอิสระที่จะไปออกซิไดซ์ซับสเตรตลดลง และความเข้มสีของซับสเตรตจึงลดลงด้วยซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง จะเห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกการดักจับอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติด้วยเครื่องมือที่มีอยู่โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการได้



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาสำหรับกาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Fe_3O_4 NPs

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Gallic acid (GA) 3, 3', 5', 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) จาก Sigma Aldrich, USA Hydrogen peroxide 30% w/v (H_2O_2) จาก Merck, Germany สารละลายอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ (iron oxide nanopowder water dispersion 15-20 nm, 20% w/v in water) จาก US Research Nanomaterials, INC, USA ซึ่งนำมาเจือจางให้ได้สารละลายเข้มข้น 5% w/v ด้วยน้ำปราศจากไอออน เครื่องมือสเปกโทรโฟโตมิเตอร์รุ่น Analytik Jena Specord 210

การเตรียมสารละลายตัวอย่างผลไม้

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ใช้ผลไม้ 7 ชนิด ได้แก่ แอปเปิลชมพู แอปเปิลแดง แตงโม แก้วมังกร (เนื้อขาว) องุ่นแดง ฝรั่งสี และน้อยหน่า นำมาสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Scalfi *et al.* (2000) นำผลไม้เหล่านี้มาล้างทำความสะอาดและนำมาปอกเปลือก (ยกเว้น แอปเปิลชมพู แอปเปิลแดง องุ่นแดง และฝรั่งสี) จากนั้นปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้ให้ละเอียด โดยไม่เติมตัวทำละลายหรือน้ำ นำตัวอย่างที่ปั่นโดยละเอียดมาชั่ง 50 กรัม ทำการเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) 20 นาที นำมากรองเพื่อแยกสารละลายออกเก็บไว้ ส่วนที่เป็นตะกอนนำมาเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 600 ไมโครลิตรต่อไมโครทิวป์ แล้วนำไปเหวี่ยงอีกครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปผสมกับสารละลายส่วนแรก นำส่วนที่เป็นตะกอนมาเติมเมทานอล 600 ไมโครลิตรต่อไมโครทิวป์ และเหวี่ยงซ้ำอีก 20 นาที แยกเอาสารละลายส่วนใสไปรวมกับที่สกัดได้ในตอนต้น นำส่วนสกัดที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐานดีพีพีเอช โดยสามารถเก็บส่วนสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาไม่เกิน 1 เดือน

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์

ปฏิกิริยาระหว่าง Fe_3O_4 NPs และ H_2O_2 สามารถเกิดได้ดีในสภาวะกรดเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลอิสระ (Gao *et al.*, 2007) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะได้ทำการควบคุม pH ของปฏิกิริยาที่ pH 3.7 ทำการวิเคราะห์โดยเตรียมสารละลาย Fe_3O_4 NPs ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จากสารละลายเข้มข้น Fe_3O_4 NPs 5% (w/v) โดยเปิดสารละลายมา 16 μL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 2000 μL จะได้สารละลาย Fe_3O_4 NPs ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จากนั้นผสม Fe_3O_4 NPs 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 20 μL สารละลายเตตระเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 20 mM 20 μL และ

สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3.7 ปริมาตร 1170 μL จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน GA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-800 μM) หรือส่วนสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 50 μL และสารละลาย H_2O_2 10 mM 20 μL จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงภายหลังจากตั้งปฏิกิริยาทิ้งไว้เป็นเวลา 8 และ 10 นาที ตามลำดับ ด้วยเครื่องมือสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 654 nm รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างในหน่วยสมมูลกรดแกลลิก (gallic acid equivalent, mmol GA / g fruit) และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าการตรวจวัดด้วยวิธีดั้งเดิม

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช

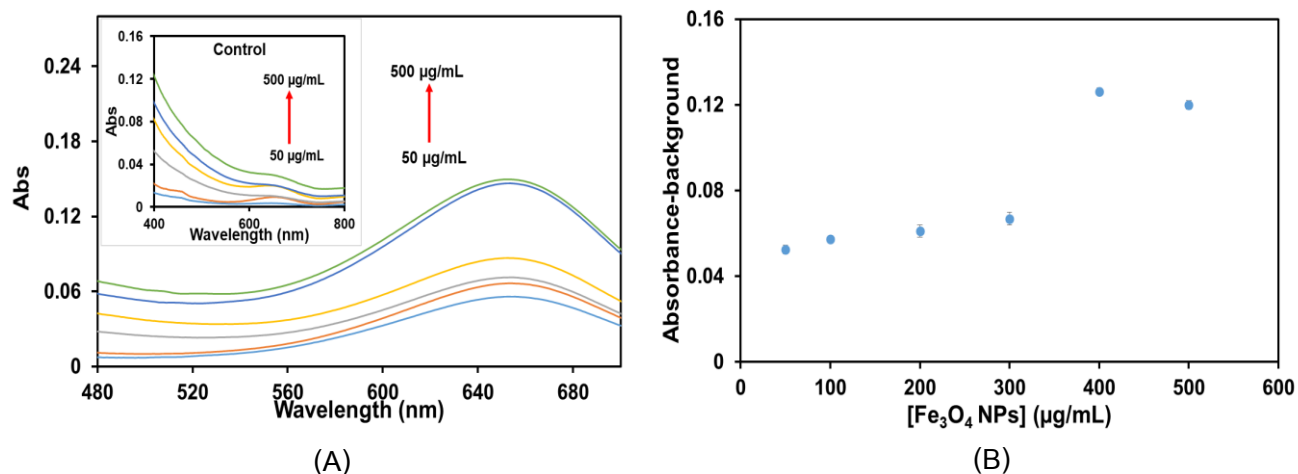
วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอชแบบดั้งเดิมโดยอ้างอิงจากรายงานก่อนหน้า (Brand-Williams *et al.*, 1995) นำสารละลายมาตรฐาน GA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0- 2 mM) หรือส่วนสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 10 μL ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 100 μL และเมทานอล 3000 μL จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงภายหลังจากตั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่องมือสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 515 nm รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างในหน่วยสมมูลกรดแกลลิก (gallic acid equivalent, mmol GA / g fruit) เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้น

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

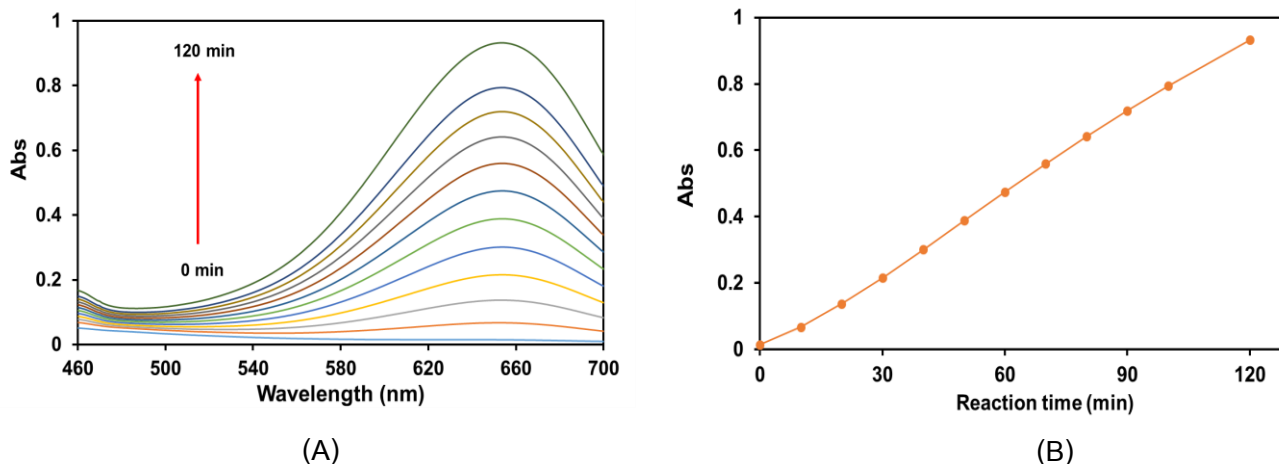
เริ่มต้นได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของ Fe_3O_4 NPs ได้แก่ ความเข้มข้น Fe_3O_4 NPs และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ในการศึกษาเบื้องต้นขั้นตอนนี้จะไม่มีสารเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงในปฏิกิริยาการวิเคราะห์และใช้ TMB เป็นซับสเตรตเปลี่ยนแปลงสี

ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของ Fe_3O_4 NPs ที่มีต่อการเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของ H_2O_2 ในการเกิด HO^\bullet ซึ่งมี TMB เป็นซับสเตรตที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากใสไม่มีสีเป็นสีฟ้า พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ Fe_3O_4 NPs มากขึ้น จะทำให้สัญญาณความเข้มสีของ TMB เพิ่มขึ้น และพบว่าสัญญาณความเข้มสีของสัญญาณพื้นหลัง (background) ที่เป็นสารละลาย Fe_3O_4 NPs ผสมกับรีเอเจนท์อื่นๆในสภาวะที่ไม่มี H_2O_2 มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน (ภาพแทรก) ภายหลังจากการหักลบกับสัญญาณของพื้นหลังจะได้รับความสัมพันธ์ ดังภาพที่ 2B กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นของ Fe_3O_4 NPs 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ให้สัญญาณที่สูงที่สุดในการตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้น จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 2 (A) สเปกตรัมการตรวจวัดในปฏิกิริยาที่มี Fe₃O₄ NPs ความเข้มข้นต่าง ๆ 20 µL ผสมกับ TMB 20 mM 20 µL, สารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.7 1,170 µL และ H₂O₂ 10 mM 20 µL ตั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที และรูปแทรกเป็นสเปกตรัมของ สารละลายควบคุมของ Fe₃O₄ NPs ความเข้มข้นต่าง ๆ 20 µL รีเอเจนทีอื่น ๆ ยกเว้น H₂O₂ ซึ่งเป็นสัญญาณพื้นหลัง (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงลบสัญญาณพื้นหลังที่ความยาวคลื่น 654 นาโนเมตร กับความเข้มข้น Fe₃O₄ NPs ที่ 50 – 500 µg/mL (n = 3)

การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่อสัญญาณในการตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้นพบว่า ในช่วงเวลาที่ศึกษาคือ 0-120 นาที เมื่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น สัญญาณความเข้มสีของ TMB เพิ่มขึ้นเป็นแนวโน้มเส้นตรง (ภาพที่ 3) เนื่องจากเกิดการเร่งปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องของ Fe₃O₄ NPs ในภาวะที่มี H₂O₂ ซึ่งเป็นซับสเตรตอย่างไม่จำกัด ดังนั้นในการใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวในการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะได้ใช้วิธีทางจลนพลศาสตร์ในการวิเคราะห์ (kinetic method of analysis) ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบกำหนดเวลาสองจุด (two-point fixed-time method) (Pardue, 1977)

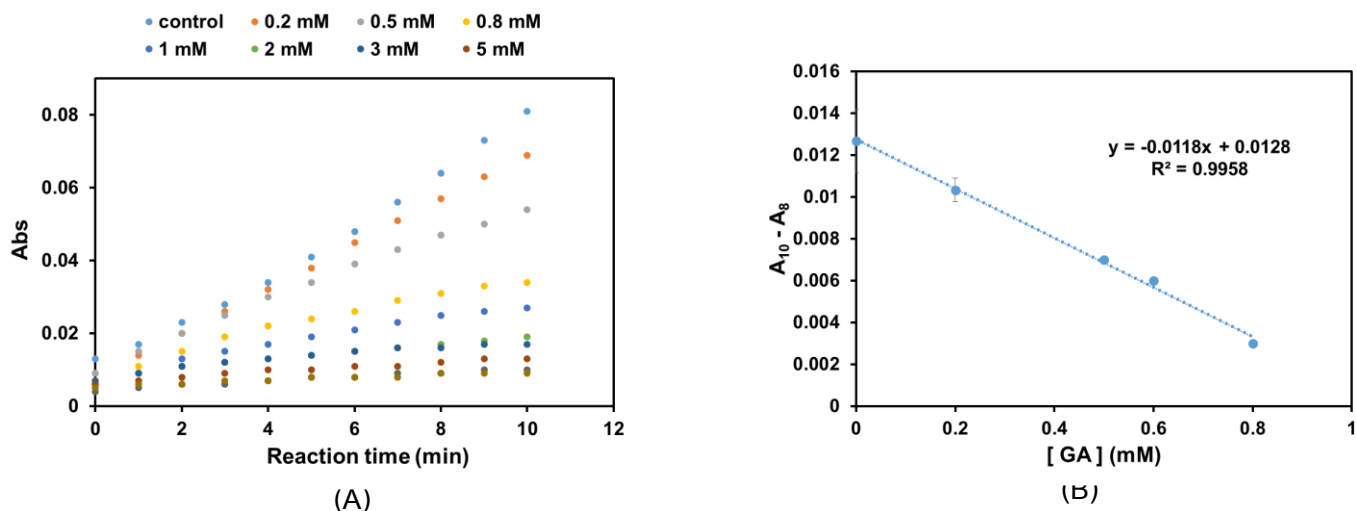


ภาพที่ 3 (A) สเปกตรัมของการเกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ โดยมีสภาวะการทดลอง: Fe_3O_4 NPs 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 20 μL , TMB 20 mM 20 μL , สารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.7 1,170 μL และ H_2O_2 10 mM 20 μL (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 654 นาโนเมตรกับเวลา (นาที) ต่าง ๆ ($n = 3$)

ศึกษาการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยใช้แกลลิก (GA) เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้ข้างต้น ทำการติดตามค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 นาที ของปฏิกิริยาทดสอบที่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4A พบว่า เมื่อไม่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ (ตัวควบคุม, control) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ H_2O_2 จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย Fe_3O_4 NPs ในภาวะที่มีออกซิเจน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น OH^\cdot ซึ่งจะไปออกซิไดส์ซีสเตรต TMB เปลี่ยนจากสีไม่มีสีเป็นสีฟ้า โดยจะเห็นการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้มที่เป็นเส้นตรงในช่วงเวลาที่ศึกษา ในกรณีที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ GA พบว่าความชันของกราฟมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุมและมีความชันลดลงเรื่อยๆ เมื่อความเข้มข้นของ GA มีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4A) ทั้งนี้เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระเข้าจับกับ HO^\cdot ทำให้ปริมาณ OH^\cdot น้อยลง ดังอัตราการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของ TMB จึงลดลงซึ่งจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ GA ซึ่งข้อมูลดังกล่าวทำให้สามารถนำไปหาปริมาณของ GA ได้ โดยการพล็อตความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลาที่อยู่ในช่วงการเปลี่ยนแปลงที่เป็นเส้นตรงของกราฟภาพ 4A ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่นาที่ที่ 8 และ 10 มาทำการวิเคราะห์ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน เนื่องจากเป็นช่วงที่ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงกว้างและความไวในการวิเคราะห์สูง จากกราฟพบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น GA เท่ากับ 0.2-0.8 mM (ภาพที่ 4B) มีขีดจำกัดการตรวจวัด เท่ากับ 0.2 mM มีความสามารถในการทำซ้ำในช่วงความเข้มข้นที่อยู่ในกราฟมาตรฐานจากการวัดซ้ำ 8 ครั้ง ใน GA ที่ความเข้มข้น 0.2 0.5 และ 0.6 mM ซึ่งมีค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์อยู่ที่ 6.6 13.4 และ 16.1 % ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์ GA

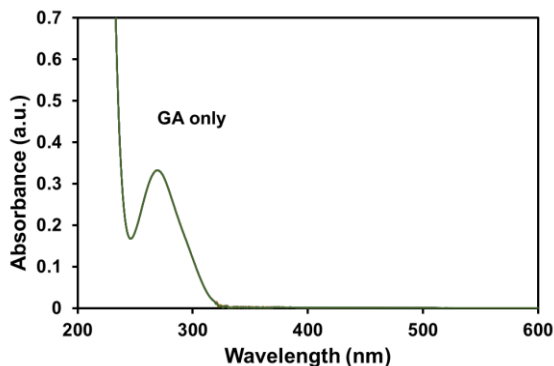
ได้ดี (AOAC International, 1998) ซึ่งจะได้มีการศึกษาการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ ต่อไปเพื่อยืนยันความสามารถของวิธีในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างหลากหลายชนิด



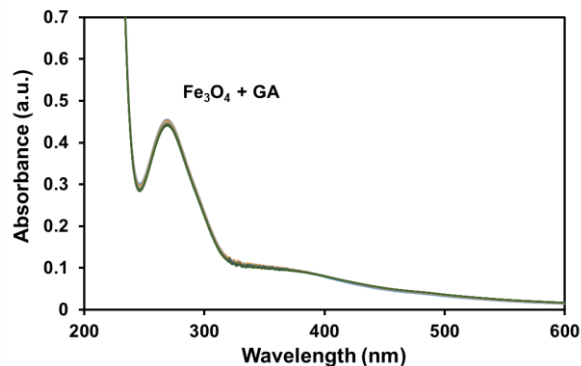
ภาพที่ 4 (A) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเวลาที่ความเข้มข้นต่างๆของ GA (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่นาที่ที่ 8 และ 10 กับความเข้มข้นของ GA (n=3) สภาวะการทดลอง: Fe_3O_4 NPs 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 20 μL , TMB 20 mM 20 μL , สารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.7 1,170 μL และ H_2O_2 10 mM 20 μL และ GA ที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 μL

การศึกษากลไกของปฏิกิริยาของวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาขึ้น

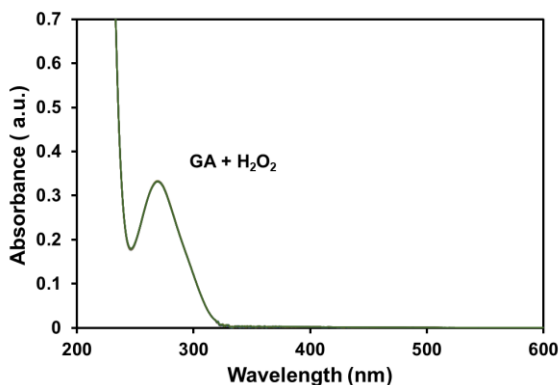
ศึกษากลไกของปฏิกิริยาของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน GA โดยศึกษาจากสเปกตรัมของการตรวจวัดด้วยเครื่องมือสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในการตรวจวัด GA ความเข้มข้น 1 mM จากภาพที่ 5A แสดงให้เห็นว่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ GA เท่ากับ 270 นาโนเมตร และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าคงที่เมื่อทำการวัดซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง ทุกๆ 3 นาที จนถึง 30 นาที เมื่อนำ Fe_3O_4 NPs ทำปฏิกิริยากับ GA จะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปค่าการดูดกลืนแสงของ GA ไม่มีการลดลงอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า GA ไม่ทำปฏิกิริยากับ Fe_3O_4 NPs จึงไม่มีการสลายตัว ดังภาพที่ 5B ต่อมนำ GA ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้ผลการทดลองคล้ายภาพที่ 5B คือไม่เห็นการลดลงของสัญญาณของ GA แสดงว่าไม่มีการทำปฏิกิริยาระหว่าง GA กับ H_2O_2 (ภาพที่ 5C) ในทางตรงกันข้าม ในระบบที่มีทั้ง H_2O_2 และ Fe_3O_4 NPs ในสารละลาย GA จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ GA ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แสดงให้เห็นถึงการสลายตัวของ GA ซึ่งเกิดจาก GA ไปทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ (OH^\cdot) ที่เกิดขึ้นระหว่าง Fe_3O_4 NPs กับ H_2O_2 (ภาพที่ 5D) (Badhani, Sharma, & Kakkar, 2015) ผลการทดลองนี้เป็นที่ยืนยัน กลไกการเข้าจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดจาก Fe_3O_4 NPs กับ H_2O_2 ของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จริง



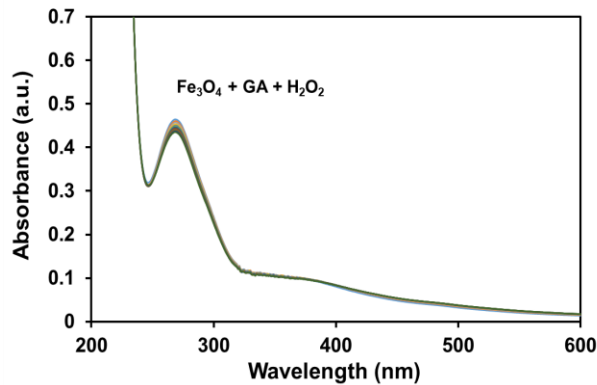
(A)



(B)



(C)



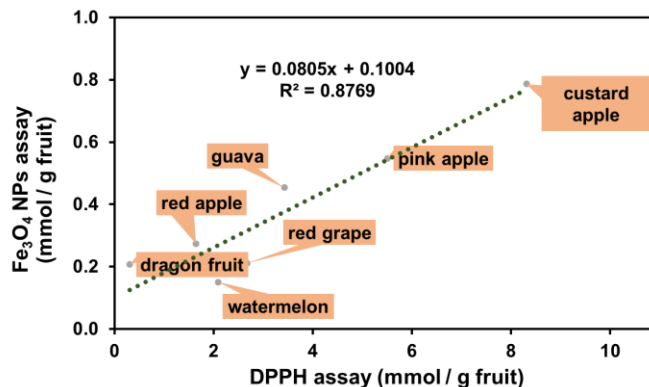
(D)

ภาพที่ 5 สเปกตรัมของการตรวจวัดสารละลายชนิดต่างๆที่มีการสแกนสเปกตรัมทุกๆ 3 นาที เป็นเวลา 30 นาที :

(A) GA ที่ความเข้มข้น 1 mM (B) Fe₃O₄ NPs + GA (C) GA + H₂O₂ และ (D) Fe₃O₄ NPs + GA + H₂O₂

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างน้ำผลไม้สกัด

ศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานในการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจริงของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้เทียบกับวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช โดยใช้ตัวอย่างน้ำผลไม้สกัดทั้งหมด 7 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ได้จากทั้งสองวิธีในค่าสมมูลกรดแกลลิก (gallic acid equivalent (GAE)) มีหน่วย mmol GA / g fruit ซึ่งหมายถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า mmol gallic acid ต่อหนึ่งกรัมของผลไม้ (วิธีการคำนวณแสดงในเอกสารเพิ่มเติม) ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้น และวิธีดีพีพีเอชดั้งเดิม โดยนำค่าจากการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าทางสถิติโดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีดีพีพีเอชดั้งเดิม ให้ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (ภาพที่ 6) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (r_s) เท่ากับ 0.9643 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าวิกฤติ ($P=0.05, n=7$ ค่าวิกฤติ $r_s=0.786$) ซึ่งความสอดคล้องกันดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งในการนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างได้ดีเทียบเท่ากับวิธีดั้งเดิม (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Byrne, 2006; Dudonné, Vitrac, Coutiere, Woillez, & Merillon, 2009; Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun, 2011)



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างผลไม้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น และวิธีดีพีพีเอชดั้งเดิม

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เสนอวิธีตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางเลือกใหม่โดยใช้ Fe₃O₄ NPs เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติพบว่าสามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับวิธีดั้งเดิม ด้วยการทดลองที่ใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ทำการศึกษา วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกได้ในระดับความเข้มข้นไมโครโมลาร์ ที่มีค่าความสามารถในการทำซ้ำอยู่ในช่วง 6.6 - 16.1 % และได้ศึกษาปฏิกิริยาของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อยืนยันว่าสามารถตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระได้จริง การประยุกต์ใช้วิธีดังกล่าวในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างผลไม้ทั้งหมด 7 ชนิด จะเห็นว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเทียบเท่ากับวิธีดั้งเดิม ในขั้นตอนถัดไปจะได้มีการศึกษาการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานชนิดอื่นๆ และนำวิธีดังกล่าวไปตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอื่นๆ ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

AOAC International (1998). *AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures*.

Rockville, MD, USA.

Babu, D., Gurusurthy, P., Borra, S. K., & 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.

- Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Rsc Advances*, 5(35), 27540-27557.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Burda, C., Chen, X., Narayanan, R., & El-Sayed, M. A. (2005). Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews*, 105(4), 1025-1102.
- Chen, Z., Yin, J. J., Zhou, Y. T., Zhang, Y., Song, L., Song, M., Hut, S., & Gu, N. (2012). Dual enzyme-like activities of iron oxide nanoparticles and their implication for diminishing cytotoxicity. *Acs Nano*, 6(5), 4001-4012.
- Committee, A. P. V. M. A. (1998). AOAC Peer Verified Methods Program—Manual on Policies and Procedures. *AOAC International, Gaithersburg, USA*, 1-35.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Gao, L., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J., Zhang, Y., Gu, N., Wang, T., Feng, J., Yang, D., Perrett, S., & Yan, X. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 2(9), 577.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 31(4), 261-272.
- Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., & Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of pure and applied Chemistry*, 4(8), 142-151.
- Mahantesh, S. P., Gangawane, A. K., & Patil, C. S. (2012). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines in human health: Future prospects. *World Research Journal of Medicinal & Aromatic Plants*, 1(1), 6-10.
- Mauter, M. S., & Elimelech, M. (2008). Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 42(16), 5843-5859.
- Pardue, H. L. (1977). A comprehensive classification of kinetic methods of analysis used in clinical chemistry. *Clinical Chemistry*, 23(12), 2189-2201.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2), 89.

- Que, F., Mao, L. C., & Zheng, X. J. (2007). In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(S1), 196-203.
- Scalfi, L., Fogliano, V., Pentangelo, A., Graziani, G., Giordano, I., & Ritieni, A. (2000). Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of Corbarini small tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1363-1366.
- Scott, D. A., Poston, R. N., Wilson, R. F., Coward, P. Y., & Palmer, R. M. (2005). The influence of vitamin C on systemic markers of endothelial and inflammatory cell activation in smokers and non-smokers. *Inflammation Research*, 54(3), 138-144.
- Sies, H., Stahl, W., & Sundquist, A. R. (1992). Antioxidant functions of vitamins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669(1), 7-20.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & 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(6-7), 669-675.
- Wang, N., Zhu, L., Wang, D., Wang, M., Lin, Z., & Tang, H. (2010). Sono-assisted preparation of highly-efficient peroxidase-like Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for catalytic removal of organic pollutants with H₂O₂. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(3), 526-533
- Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2016). The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78, 39-49.