

# การพัฒนาอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบหลายวิธี

## Development of Multi-Assay Paper-Based Devices for Analysis of Antioxidant Activity

ชนกนันท์ พวงบัลลังก์ และ ยูภาพร สมีน้อย\*

Chanoknan Puangbanlang and Yupaporn Sameenoi

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

Received : 19 July 2018

Accepted : 5 November 2018

Published online : 20 November 2018

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายวิธีพร้อมกันซึ่งได้แก่ วิธี cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) และ วิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS) อุปกรณ์ประกอบด้วยบริเวณใส่ตัวอย่างตรงกลางเชื่อมต่อกับบริเวณตรวจวัดทั้งสี่โดยมีสามบริเวณสำหรับตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามวิธีและอีกหนึ่งบริเวณเป็นการตรวจวัดแปลงค่าตัวอย่าง การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำโดยหยดสารละลายตัวอย่างบริเวณใส่ตัวอย่างเพื่อให้ไหลไปทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์ของแต่ละวิธีซึ่งได้มีการบรรจุไว้แล้วบนบริเวณตรวจวัดทำให้มีสีที่เปลี่ยนไปซึ่งสามารถวัดได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจเจ (Image J) จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานด้วยวิธี CUPRAC วิธี DPPH และวิธี ABTS พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 1-6 mM 20-150  $\mu$ M และ 3-13 mM ตามลำดับความสามารถในการทำซ้ำจากการวิเคราะห์ซ้ำที่ความเข้มข้นในช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.70-1.61% 0.91-4.04% และ 1.39-4.91% ตามลำดับ (n=5) และขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 1 mM 1.10  $\mu$ M และ 1.30 mM ตามลำดับ จากผลการทดลองเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลายวิธีพร้อมๆกันประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ อุปกรณ์มีราคาถูก ใช้รีเอเจนท์น้อย มีแนวโน้มสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจริงได้

**คำสำคัญ** : การตรวจวัดหลายวิธี, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารต้านอนุมูลอิสระ, อุปกรณ์แบบกระดาษ

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

## Abstract

This work developed a paper-based device for simultaneous determination of multiple antioxidant activity assays including the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) assay, and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS) assay. The device composed of a central sample zone connected to four detection zones to accommodate three antioxidant assays and a sample blank measurement. Antioxidant activity analysis was achieved by dropping the samples onto the sample zone to flow to the detection zones containing the stored reagents for each antioxidant assay making the change in color that was measured using image J software. The analysis of gallic acid antioxidant standard with CUPRAC, ABTS, and DPPH assay gave the calibration curve in the linear ranges of 1-6 mM, 20-150  $\mu$ M, and 3-13 mM, respectively, the relative standard deviation from the repetitive analysis of gallic acid at the concentrations in the linear range are 0.70-1.61%, 0.91-4.04% and 1.39-4.91% (n=5), respectively, and a limit of detection of 1 mM 1.10  $\mu$ M and 1.30 mM, respectively. These preliminary results indicated that the developed paper-based device provided for the analysis of multiple antioxidant assays at the same time with low analysis time and cost, low reagent consumption and is promising to use for antioxidant activity in real samples.

**Keywords:** multi-assay analysis, antioxidant activity, antioxidant, paper-based devices

## บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ซึ่งมีความไม่เสถียรสูงและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในภาวะที่ร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไปจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆได้แก่ โรคหลอดเลือดในหัวใจตีบตัน โรคความจำเสื่อม โรคมะเร็ง (Lobo *et al.*, 2010) นอกจากนี้ เมื่ออยู่ในอาหารก็จะทำให้อาหารเน่าเสียก่อนถึงมือผู้บริโภค

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารสำคัญที่ช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระผ่านกลไกต่างๆได้แก่ การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation) การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (free radical chain breaking) การเสริมฤทธิ์ (synergism) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) (Lobo *et al.*, 2010) ซึ่งโดยปกติแล้วในร่างกายจะมีระบบต้านอนุมูลอิสระอยู่ อย่างไรก็ตาม สำหรับผู้ที่อยู่ในภาวะเสี่ยงที่ต้องได้รับอนุมูลอิสระมากกว่าปกติ เช่น ผู้ปฏิบัติงานในโรงงานถลุงเหล็ก ผู้ที่ได้รับควันหรือมลพิษทางอากาศอยู่ตลอดเวลา จำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกเข้าไปด้วยเป็นประจำ สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพร นอกจากนี้จะช่วยยับยั้งการเกิดโรคในคนแล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหารเพื่อให้อาหารที่ส่งออกสามารถเก็บได้นานยิ่งขึ้น

วิธีวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสามารถทำได้ด้วยวิธีการตรวจวัดสีหลายวิธี เช่น วิธี Total radical trapping (TRAP) (Ghiselli *et al.*, 1995) วิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS)

(Re *et al.*, 1999) วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie & Strain, 1999) วิธี oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) (Wang *et al.*, 1996) วิธี cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) (Apak *et al.*, 2004) และ วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)(Cuendet *et al.*, 1997) วิธีเหล่านี้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่แตกต่างกัน การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างจำเป็นต้องมีการตรวจวัดหลายวิธีเพื่อให้ได้ข้อมูลครบทุกกลไกในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์และสิ้นเปลืองตัวอย่างและรีเอเจนท์จำนวนมากเนื่องจากต้องตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ซึ่งใช้สารปริมาณมาก

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (paper-based analytical device) คืออุปกรณ์ที่สร้างขึ้นโดยใช้กระดาษเป็นวัสดุหลัก ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic barrier) ซึ่งใช้เป็นบริเวณทดสอบ และส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) สำหรับกำหนดขอบเขตสำหรับการตรวจวัดซึ่งสามารถสร้างด้วยการฝังวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic material) ลงบนเนื้อกระดาษด้วยวิธีต่างๆ เช่น การพิมพ์ด้วยแสง (photolithography) (Martinez *et al.*, 2008) การพิมพ์ด้วยเครื่องพล็อต (plotting) (Bruzewicz *et al.*, 2008) การพิมพ์ด้วยหมึก (inkjet printing) (Abe *et al.*, 2008) การตัด (cutting) (Fenton *et al.*, 2009) และการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printing) (Lu *et al.*, 2009) เป็นต้น การเคลื่อนที่ของสารละลายบนอุปกรณ์แบบกระดาษเกิดขึ้นได้ด้วยแรงคาпилลารี (capillary force) บนเส้นใยเซลลูโลสทำให้ปราศจากการใช้ปั๊มภายนอก อุปกรณ์ที่ได้มีขนาดเล็กและใช้สารน้อย (Martinez *et al.*, 2010) ที่ผ่านมามีการประยุกต์ใช้อุปกรณ์ดังกล่าวในด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ (Vella *et al.*, 2012) ด้านสิ่งแวดล้อม (Sameenoi *et al.*, 2012) และด้านอาหาร (Cardoso *et al.*, 2015) เนื่องจากอุปกรณ์มีราคาถูก วัสดุหาซื้อได้ง่าย ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนท์ปริมาณน้อย สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดพร้อมกันโดยการปรับลดขนาดของอุปกรณ์ให้เหมาะสม

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษให้สามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลากหลายวิธีพร้อมๆกันบนอุปกรณ์เพียงหนึ่งชิ้น เบื้องต้นได้ทำการวิเคราะห์ วิธี DPPH วิธี CUPRAC และวิธี ABTS พร้อมกัน สร้างอุปกรณ์ด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax-printing) โดยออกแบบให้อุปกรณ์มีหนึ่งบริเวณใส่ตัวอย่างเชื่อมต่อกับบริเวณตรวจวัดซึ่งสามารถตรวจวัดจะใช้สำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามวิธีที่แตกต่างกันและอีกหนึ่งบริเวณตรวจวัดสำหรับการตรวจวัดแบบคลอโรเมตริก ตัวอย่าง การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้ด้วยการตรวจวัดสี (colorimetric detection) ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อรีเอเจนท์ของแต่ละวิธีทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระบนบริเวณตรวจวัดของอุปกรณ์ด้วยเครื่องสแกนและประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจ (Image J) ซึ่งความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลงไปจะสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง การพัฒนาอุปกรณ์นี้จะทำให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดที่สามารถวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลายวิธีพร้อม ๆ กันทำให้ได้ข้อมูลกลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระหลายกลไกพร้อมกันในการทำการวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว ซึ่งทำให้ประหยัดเวลา ประหยัดสารตัวอย่างและรีเอเจนท์ มีราคาถูก น้ำหนักเบา สามารถพกพาไปตรวจวัดยังภาคสนามได้

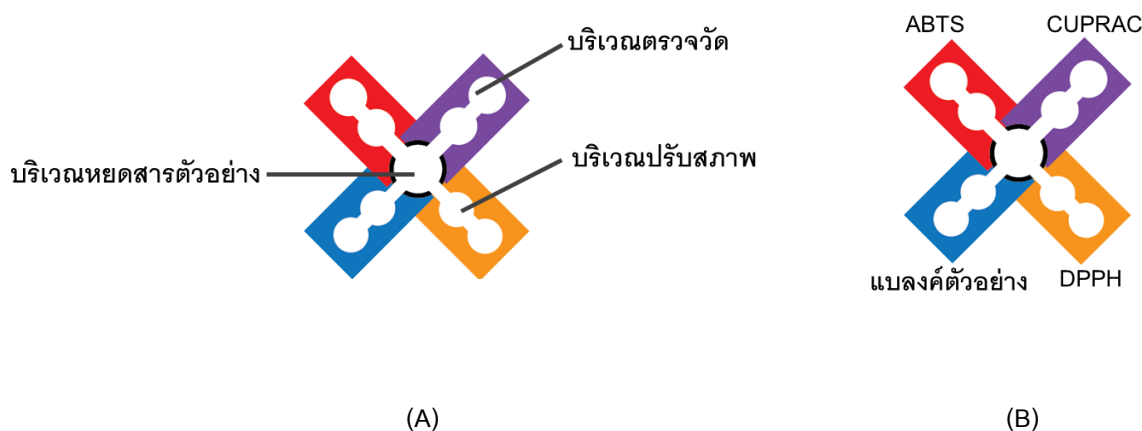
## วิธีดำเนินการวิจัย

### อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้แก่ กระดาษกรอง เบอร์ 4 จาก Whatmen, GE Healthcare company, China เครื่องพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (wax printer) รุ่น Xerox ColorQube 8870-1 จาก Flextronics Technology, Malaysia เครื่องสแกน Canon รุ่น CanoScan LiDE110, จาก Canon Inc., Vietnam เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) รุ่น SPECORD® 210 PLUS, จาก Analytikjena, Germany สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS); (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES); Potassium persulfate; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); Gallic acid (GA); Neocuproine (Nc); Copper (II) chloride และ Ammonium acetate จาก Ajax Finechem, Australia สารเคมีอื่นๆนอกเหนือจากนี้ซื้อจาก Sigma Aldrich, Singapore

### วิธีการออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้โปรแกรมอะโดบี อิลลัสเตรเตอร์ ซีซี (Adobe Illustrator CC) ซึ่งประกอบไปด้วย 3 บริเวณหลัก ได้แก่ บริเวณหยดสารตัวอย่าง (sample zone) (ขนาด 7 mm) เชื่อมต่อกับบริเวณปรับสภาพ (pretreatment zone) (ขนาด 5 mm) 4 บริเวณและต่อไปยังบริเวณตรวจวัด (detection zone) (ขนาด 5 mm) อีก 4 บริเวณ (ดังภาพที่ 1A) ซึ่งการออกแบบดังกล่าวจะทำให้สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้พร้อมกัน 3 วิธี ได้แก่ วิธี CUPRAC วิธี DPPH และวิธี ABTS (ดังภาพที่ 1B) ส่วนที่เหลืออีก 1 แฉกจะเป็นตัวควบคุมหรือสารละลายตัวอย่าง โดยอุปกรณ์ที่ได้จะมีขนาด 3.4×3.4 cm หลังจากออกแบบแล้วสามารถสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษได้โดยเทคนิคการพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง โดยการพิมพ์ภาพอุปกรณ์ลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ด้วยเครื่องพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง นำกระดาษกรองที่มีลวดลายแล้วไปให้ความร้อนโดยใช้เตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150°C เป็นเวลา 2 นาที จะทำให้ขี้ผึ้งซึมผ่านกระดาษกรองลงมาเกิดเป็นส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ ติดด้านหลังอุปกรณ์ตรวจวัดด้วยเทปกาวยใสก่อนนำไปใช้ในการทดลองเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารละลาย

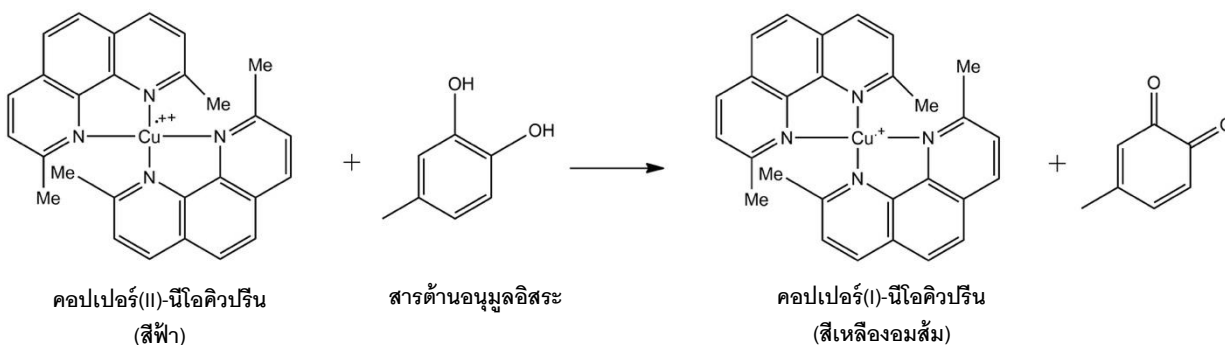


**ภาพที่ 1** อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบหลายวิธี (A) บริเวณต่างๆของอุปกรณ์ (B) บริเวณทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีบนอุปกรณ์

## การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

### วิธี CUPRAC

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC มีหลักการการวิเคราะห์คือสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์(II)-นีโอคิวปรีนที่มีสีฟ้าจะถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน คอปเปอร์(I)-นีโอคิวปรีนที่มีสีเหลือง (ดังภาพที่ 2) ความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองจะแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี CUPRAC เป็นกลไกเกี่ยวกับความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (reducing power) (Bener *et al.*, 2013)

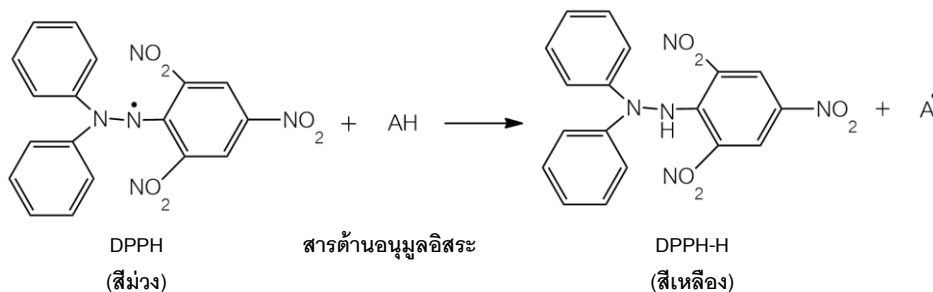


ภาพที่ 2 ปฏิกริยาการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC (Özyürek *et al.*, 2011)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC บนอุปกรณ์แบบกระดาษโดยหยดสารละลาย  $\text{CuCl}_2$  150 mM ปริมาตร 0.5  $\mu\text{L}$  ลงบนบริเวณตรวจวัดรอนจันแห้ง และหยดสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 7 เข้มข้น 10 mM ปริมาตร 0.5  $\mu\text{L}$  ลงบนบริเวณตรวจวัดรอนจันแห้ง ตามด้วยสารละลายนีโอคิวปรีน 600 mM ปริมาตร 0.5  $\mu\text{L}$  ลงบนบริเวณปรับสภาพ รอนจันแห้ง เมื่อแห้งแล้วจึงหยดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิก หรือตัวอย่าง ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  ลงบนบริเวณหยดสารตัวอย่าง และชะด้วยน้ำอีก 20  $\mu\text{L}$  ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที เป่าให้แห้ง จากนั้นสแกนอุปกรณ์เพื่อนำภาพที่ได้ไปวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจเจ (Image J) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความเข้มสีของสีเหลืองต่อพื้นที่บริเวณตรวจวัด (mean intensity) ศึกษาความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  ที่เหมาะสมในช่วง 0-250 mM และศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมในช่วง 5-45 นาทีโดยใช้สภาวะคล้ายกับที่กล่าวในข้างต้นแต่ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยการศึกษาเวลาในการทำปฏิกิริยาจะไม่เป่าให้แห้งในขั้นตอนสุดท้าย เนื่องจากการเป่าให้แห้งอาจส่งผลให้เวลาคลาดเคลื่อน

### วิธี DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีหลักการการวิเคราะห์คือ DPPH<sup>•</sup> ที่มีสีม่วง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะกลายเป็น DPPH-H ที่มีสีเหลือง (ดังภาพที่ 3) ความเข้มสีของสีม่วงจะแปรผกผันกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ กลไกการต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้จากปฏิกิริยานี้เป็นแบบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging) (Garcia *et al.*, 2012)

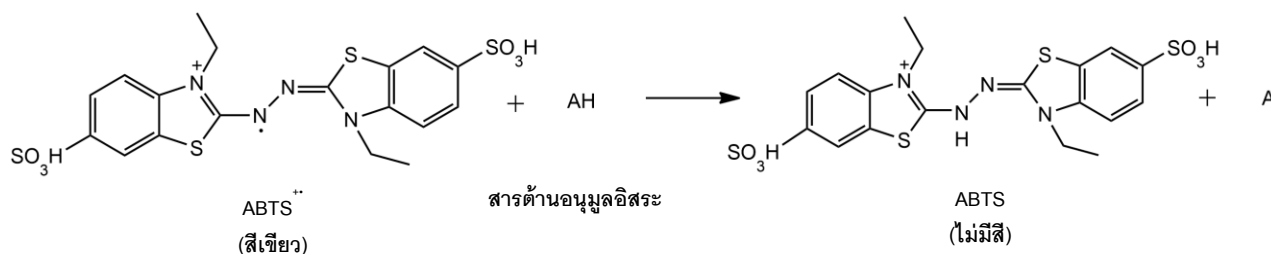


ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาของวิธี DPPH (Pyrzynska & Pękal, 2013)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH ทำได้โดยหยดสารละลาย DPPH 2 mM ปริมาตร 0.5  $\mu$ L ลงบริเวณตรวจวัดรอกจนแห้ง จากนั้นหยดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกหรือตัวอย่าง ปริมาตร 10  $\mu$ L ลงบนบริเวณหยดสารตัวอย่างและชะด้วยน้ำอีก 20  $\mu$ L ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที เป่าให้แห้ง จากนั้นสแกนอุปกรณ์เพื่อนำภาพที่ได้ไปวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจเจ (Image J) เป็นการวิเคราะห์ความเข้มสีของสีม่วงโดยหาจากการวัดค่าเฉลี่ยของความเข้มสีต่อพื้นที่บริเวณตรวจวัด ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของ DPPH ในช่วง 0.1-3.5 mM และศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในช่วง 6-45 นาที โดยใช้สภาวะและขั้นตอนอื่นๆในการทดลองคล้ายกับที่กล่าวมาข้างต้น

### วิธี ABTS

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เริ่มด้วยขั้นตอนการเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS ให้กลายเป็น ABTS<sup>•+</sup> ที่มีสีเขียวด้วย  $K_2S_2O_8$  และเมื่อ ABTS<sup>•+</sup> ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะได้ ABTS ที่ไม่มีสี (ดังภาพที่ 4) ทำการตรวจวัดการลดลงของสีเขียวซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการเกิดปฏิกิริยาข้างต้นเป็นแบบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging) (Awikaet *et al.*, 2003)



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาของวิธี ABTS (Oliveira et al., 2014)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยปฏิกิริยาดังภาพที่ 4 เริ่มต้นหยด (APTES) 5%(v/v) ปริมาตร 0.5  $\mu$ L ลงบนบริเวณตรวจวัดเพื่อเตรียมบริเวณตรวจวัดรอกจนแห้ง หยดสารละลาย ABTS 40 mM ปริมาตร 0.5  $\mu$ L ลงบนบริเวณตรวจวัดรอกจนแห้ง หยดสารละลาย  $K_2SO_8$  70 mM ปริมาตร 0.5  $\mu$ L ลงบนบริเวณปรับสภาพ รอกจนแห้ง หยดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกหรือตัวอย่าง ปริมาตร 10  $\mu$ L ลงบนบริเวณหยดสารตัวอย่าง และชะด้วยน้ำอีก 20  $\mu$ L ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที เป่าให้แห้ง จากนั้นสแกนอุปกรณ์เพื่อนำภาพที่ได้ไปวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจเจ (ImageJ) เป็นการวิเคราะห์ความเข้มสีของสีเขียวโดยการวัดความเข้มสีต่อพื้นที่บริเวณตรวจวัด ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของ ABTS และเวลาในการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้สภาวะการทดลองคล้ายกับที่กล่าวมาข้างต้นแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ ABTS และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ตามลำดับ

**ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล**

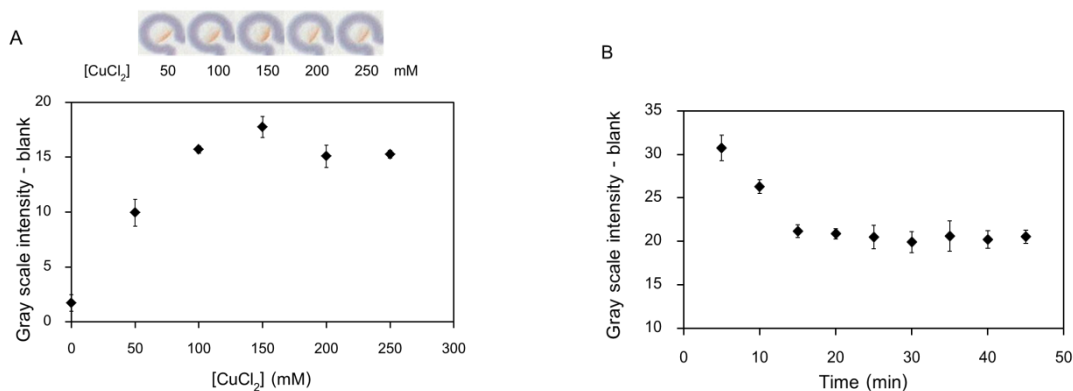
**ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ**

**ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี CUPRAC**

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $CuCl_2$  เป็นปัจจัยสำคัญเนื่องจากวิธี CUPRAC เป็นการวัดการเพิ่มขึ้นของสัญญาณของสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์(II)-นีโอคิวปรีน ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์(II)-นีโอคิวปรีนถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ โดยความเข้มข้นของ  $CuCl_2$  ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์จะต้องเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้สัญญาณการวิเคราะห์ที่สูงที่สุดเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปเพียงเล็กน้อยเพื่อให้ได้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดี ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ  $CuCl_2$  ที่เหมาะสมในช่วง 0-250 mM โดยในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 4 mM ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 5A พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ  $CuCl_2$  เพิ่มขึ้น ความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์(II)-นีโอคิวปรีน ก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วยและมีค่าคงที่ ที่ความเข้มข้นของ  $CuCl_2$  เท่ากับ 150 mM ขึ้นไป ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ  $CuCl_2$  150 mM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการทดลอง เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ให้ค่าความเข้มสีที่สูงที่สุด

ต่อมาได้ทำการศึกษาเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์(II)-นีโอคิวปรีนกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 4 mM บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นเวลา 5-45 นาที ได้ผลการทดลอง

ดังภาพที่ 5B พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเริ่มคงที่ตั้งแต่ 15 นาที ขึ้นไป โดยในช่วงแรกความเข้มสีจะสูงเป็นผลมาจากอนุภาคที่เปียกทำให้พื้นหลังมีสี หลังจากนั้นผ่านไป 15 นาที อนุภาครวมตัวกัน ความเข้มสีจะเริ่มคงที่ ในการทดลองนี้จะเลือกเวลาในการทำปฏิกิริยา 20 นาที มาใช้ในการทดลองเพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสมบูรณ์และอนุภาครวมตัวกันแล้ว



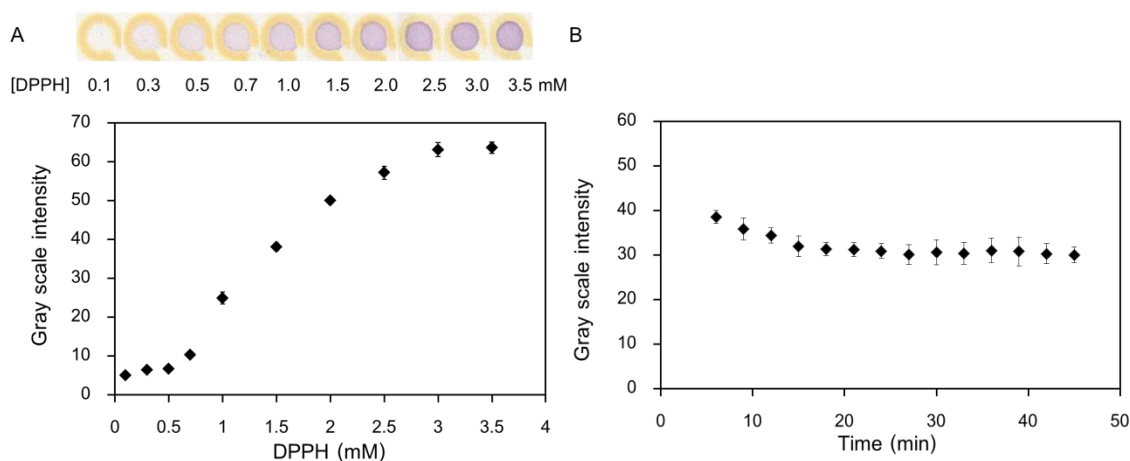
**ภาพที่ 5** (A) รูปแสดงความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์(II)-นีโอควิปริน ที่มีความเข้มข้น  $\text{CuCl}_2$  ต่างกัน และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ  $\text{CuCl}_2$  กับความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์(II)-นีโอควิปริน ที่วัดได้บนอนุภาครวมตัวแบบกระดาศในการตรวจวัดกรดกลูติก 4 mM ( $n=3$ ) (Blank (แกน y) เป็นสัญญาณการตรวจวัดน้ำปราศจากไอออน) (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์(II)-นีโอควิปรินกับ เวลาในการทำปฏิกิริยา ( $n=3$ )

#### ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี DPPH

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DPPH เนื่องจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการวัดการลดลงของสัญญาณของ DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์จะต้องเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้สัญญาณสูง และเห็นการลดลงของสัญญาณอย่างชัดเจนเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระไปเพียงเล็กน้อย ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาค้นคว้าความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ตั้งแต่ 0.1-3.5 mM ซึ่งผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 6A พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ DPPH เพิ่มขึ้น ความเข้มสีที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยความเข้มสีจะเริ่มคงที่ ที่ความเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ 3 mM ขึ้นไป แต่ความเข้มข้นของ DPPH ที่อยู่ในช่วงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความเข้มสีมากที่สุดคือ 2 mM ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้น DPPH ที่ 2 mM เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอนุภาครวมตัวแบบกระดาศ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ให้ความเข้มสีสูง และเห็นการลดลงของสัญญาณอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของ DPPH มีค่าลดลงซึ่งเหมาะสมกับการนำไปวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ เนื่องจากการสังเกตการลดลงของสัญญาณ DPPH ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ



ต่อมาได้ทำการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นเวลา 6-45 นาที ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 6B พบว่าเมื่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นความเข้มสีของ DPPH ค่อยๆลดลงเนื่องจากเกิดการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วงโดยสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าความเข้มสีเริ่มคงที่ตั้งแต่ 15 นาที ขึ้นไป ในการทดลองนี้จึงเลือกเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 20 นาที มาใช้ในการทดลองเพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสมบูรณ์และสอดคล้องกับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของวิธี CUPRAC ด้วย

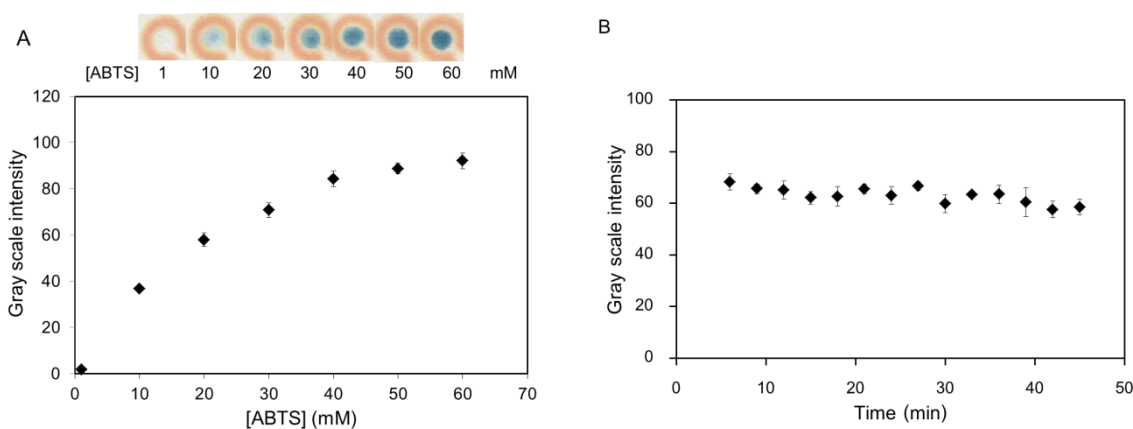


**ภาพที่ 6** (A) รูปแสดงความเข้มสีของ DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ DPPH (n=3) (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของ DPPH กับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับ กรดแกลลิก (n=3)

### ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี ABTS

ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของ ABTS เป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS เป็นการวัดการลดลงของสัญญาณของ  $\text{ABTS}^+$  เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์จะต้องเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้สัญญาณสูงและให้การลดลงของสัญญาณอย่างชัดเจนเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระไปเพียงเล็กน้อย ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของ ABTS ตั้งแต่ 1-60 mM ซึ่งจะได้ผลการทดลองดังภาพที่ 7A พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ ABTS เพิ่มขึ้น ความเข้มสีที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วยโดยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณความเข้มสีจะเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ ABTS เท่ากับ 50 mM ขึ้นไป แต่ความเข้มข้นของ ABTS ที่อยู่ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความเข้มสีมากที่สุดคือ 40 mM ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้น ABTS ที่ 40 mM เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ให้ความเข้มสีที่ชัดเจนและอยู่ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความเข้มสีที่สูงทำให้เมื่อนำไปวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจะสังเกตเห็นการลดลงของสัญญาณอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ

จากนั้นทำการศึกษาเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง ABTS กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 3 mM บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นเวลา 6-45 นาที ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 7B พบว่าปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ 5 นาทีแรก หลังจากนั้นสัญญาณจะค่อยๆ ลดลงจนถึงนาทีที่ 15 ซึ่งเป็นผลมาจากการที่สีพื้นหลังของอุปกรณ์เริ่มแห้ง ในการทดลองนี้จะเลือกเวลาในการทำปฏิกิริยา 20 นาที มาใช้ในการทดลองเนื่องจากปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์และอุปกรณ์แห้งดีแล้ว นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับวิธี DPPH และ CUPRAC เนื่องจากทั้งสามวิธีบรรจุอยู่ในอุปกรณ์ชิ้นเดียวกัน

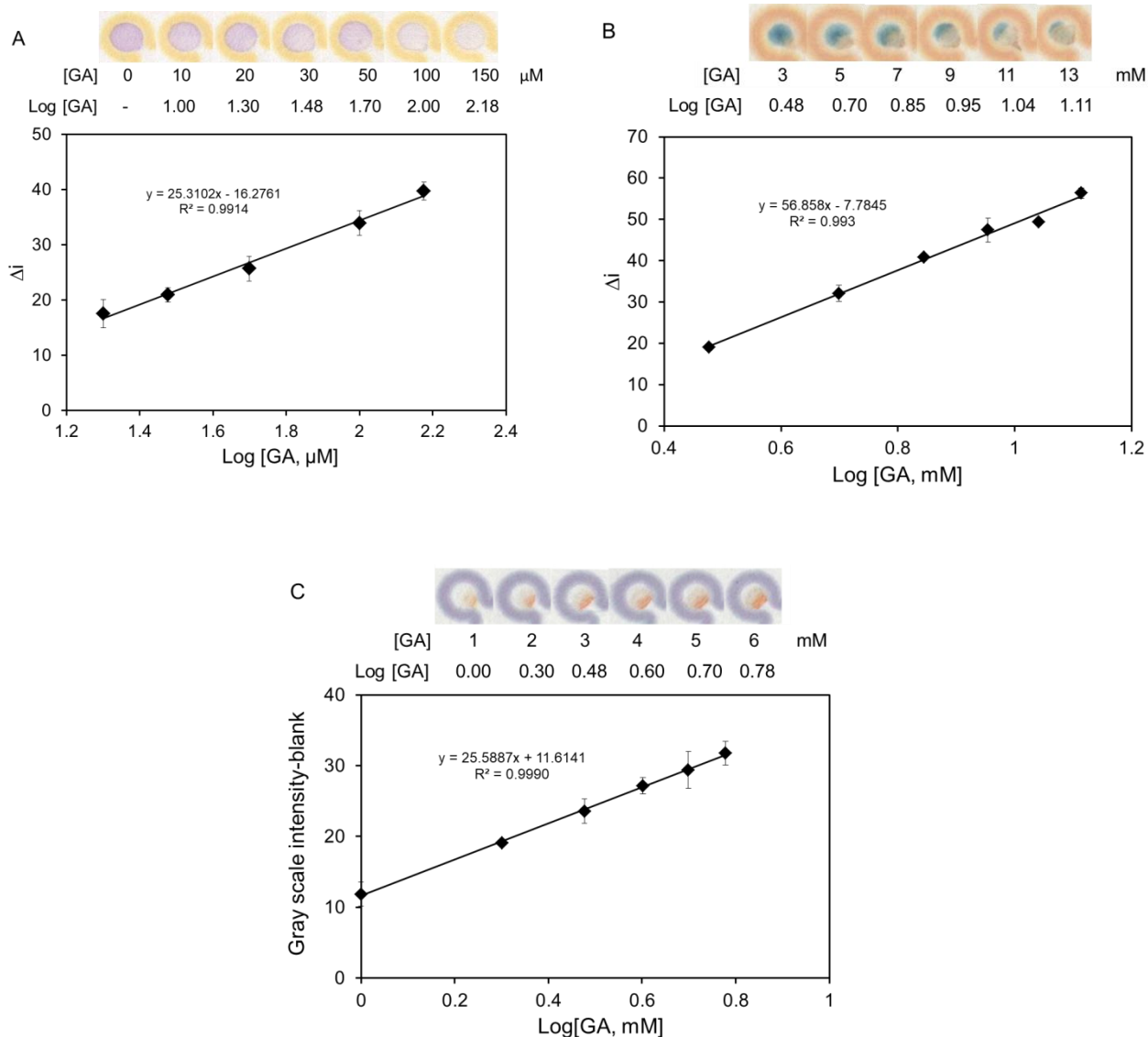


**ภาพที่ 7** (A) รูปแสดงความเข้มสีของ ABTS<sup>+</sup> ที่มีความเข้มข้น ABTS ที่แตกต่างกัน และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับความเข้มข้นของ ABTS (n=4) (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของ ABTS<sup>+</sup> กับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง ABTS<sup>+</sup> กับ กรดแกลลิก(n=4)

### การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี CUPRAC DPPH และ ABTS บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิก ด้วยวิธี CUPRAC DPPH และ ABTS บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น เมื่อพิจารณาถึงวิธี DPPH และ ABTS พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มสีของ DPPH และ ABTS<sup>+</sup> จะลดลง เมื่อนำค่าความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อิมเมจเจ (Image J) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าผลต่างของความเข้มสี ( $\Delta i = i_{\text{control}} - i_x$  เมื่อ  $i_{\text{control}}$  และ  $i_x$  คือความเข้มสีที่การวิเคราะห์กรดแกลลิกความเข้มข้น 0 และ ที่กรดแกลลิกความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ) จะให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 20-150  $\mu\text{M}$  และ 3-13 mM (ดังภาพที่ 8A และ 8B ตามลำดับ) ซึ่งช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้ของวิธี DPPH มีช่วงที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Xie & Schaich, 2014) เมื่อพิจารณาถึงวิธี CUPRAC พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแกลลิก ความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(I) จะเพิ่มขึ้นด้วย ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 1-6 mM (ดังภาพที่ 8C) ซึ่งช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้ของวิธี CUPRAC มีช่วงที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Kondakçı *et al.*, 2013)

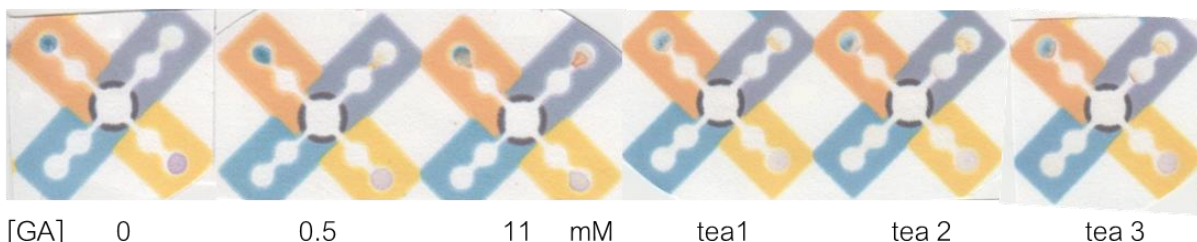
นอกจากนี้ความสัมพันธ์ในเชิง log ของความเข้มข้นกับความเข้มสีสามารถพบได้โดยทั่วไปในการวิเคราะห์แบบการตรวจวัดสีที่มีการวัดสัญญาณด้วยการถ่ายภาพและการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์แบบกระดาษ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเพียงเล็กน้อยที่ความเข้มข้นสูง (Li *et al.*, 2010; Steiner *et al.*, 2010)



**ภาพที่ 8** แสดงรูปและกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิก ด้วยวิธี (A) DPPH (n=4) (B) ABTS (n=4) และ (C) CUPRAC (n=4)

ต่อมาทำการศึกษาความสามารถในการทำซ้ำของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น และศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) โดยค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 1 จากตารางพบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาสามารถวิเคราะห์กรดแกลลิกได้ ที่ความเข้มข้นต่ำ มีความสามารถในการทำซ้ำที่ดีโดยจะแสดงด้วยค่าความสามารถในการทำซ้ำวันเดียวกัน และความสามารถในการทำซ้ำระหว่างวัน นอกจากนี้เมื่อนำแต่ละวิธีมาวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ พร้อมกัน พบว่าให้แนวโน้ม

ที่ดีและเป็นไปตามทฤษฎีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยในกรณีที่ไม่ได้เติมกรดแกลลิก (GA=0 mM) วิธี CUPRAC จะไม่มีสี ในขณะที่วิธี ABTS และ DPPH จะมีสีเขียวและสีม่วง ตามลำดับ เมื่อมีเติมกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 mM วิธี CUPRAC จะเริ่มมีสีเหลือง วิธี ABTS จะให้ความเข้มสีเหลืองลดลงเล็กน้อยและสำหรับวิธี DPPH จะปรากฏความเข้มสีม่วงที่จางหายไป เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดแกลลิกเป็น 11 mM พบว่า วิธี CUPRAC จะเห็นมีสีเหลืองชัดมากขึ้น ส่วนวิธี ABTS และ DPPH ความเข้มสีเขียวและสีม่วงแทบจางหายไปหมด (ดังภาพที่ 9) แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้พร้อมกันสามวิธี นอกจากนี้ เมื่อนำอุปกรณ์ดังกล่าวไปตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชา พบว่า ให้สัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับตัวควบคุม (GA=0 mM) ของวิธีวิเคราะห์ทั้งสามวิธี แสดงให้เห็นเบื้องต้นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจริงได้



**ภาพที่ 9** การวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆกันและการวิเคราะห์ตัวอย่างชาด้วยวิธี CUPRAC DPPH และ ABTS พร้อมกันบนอุปกรณ์แบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

**ตารางที่ 1** การวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี CUPRAC DPPH และ ABTS

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	ช่วงความเป็นเส้นตรง	สมการเส้นตรง	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ )	ความสามารถในการทำซ้ำวันเดียวกัน (%RSD)	ความสามารถในการทำซ้ำระหว่างวัน (%RSD)	ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD)
CUPRAC	1 - 6 mM	$y = 25.59x + 11.61$	0.999	0.70 – 1.61	2.55-3.74	1.00 mM
DPPH	20 - 150 $\mu$ M	$y = 15.96 - 13.47$	0.992	0.91 – 4.04	1.86-4.23	1.10 $\mu$ M
ABTS	3 - 13 mM	$y = 56.86x - 7.78$	0.993	1.39 – 4.91	2.09-4.85	1.30 mM

## สรุปผลการวิจัย

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้พร้อมกันถึง 3 วิธี ได้แก่วิธี CUPRAC DPPH และ ABTS โดยได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธีบนอุปกรณ์ จากนั้นได้นำเอาสภาวะที่เหมาะสมมาตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่าอุปกรณ์ดังกล่าวสามารถวิเคราะห์กรดแกลลิกได้ด้วยความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ถึงมิลลิโมลาร์ เทียบเท่ากับช่วงที่ตรวจวัดได้กับงานวิจัยที่เคยมีรายงาน มีความสามารถในการทำซ้ำอยู่ในช่วงที่ดี และให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำ จากผลการทดลองเบื้องต้นจะเห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม ใช้สารปริมาณน้อยกว่าถึง 100 เท่า อุปกรณ์มีน้ำหนักเบาและราคาไม่แพง ไม่ต้องจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ มีแนวโน้มสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์พกพาไปตรวจวัดภาคสนามได้ และเมื่อนำเอาอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์ตัวอย่างชา 3 ชนิดพบว่ามีความสามารถในการลดลงและเพิ่มขึ้นของสีเป็นไปตามทฤษฎี โดยตัวอย่างที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการฟอกจางสีเขียวและม่วงของวิธี ABTS และ DPPH ตามลำดับ ส่วนวิธี CUPRAC จะมีสีเหลืองเกิดขึ้น ในขั้นตอนต่อไปจะนำเอาตัวอย่างจริงไปทำการทดสอบเทียบกับวิธีมาตรฐานเพื่อยืนยันความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 6/2560 และทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับหน่วยวิจัยด้านนวัตกรรมทางเซนเซอร์เพื่อพัฒนาและผลิตชุดทดสอบประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

## เอกสารอ้างอิง

- Abe, K., Suzuki, K., & Citterio, D. (2008). Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. *Analytical Chemistry*, 80(18), 6928-6934.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6657-6662
- Bener, M., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2013). Novel optical fiber reflectometric cuprac sensor for total antioxidant capacity measurement of food extracts and biological samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8381-8388

- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *In Methods In Enzymology*, 299, 15-27.
- Bruzewicz, D. A., Reches, M., & Whitesides, G. M. (2002). Low-Cost Printing of Poly (dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. *J. Immunol. Methods*, 266, 1-5.
- Cardoso, T. M., Garcia, P. T., & Coltro, W. K. (2015). Colorimetric determination of nitrite in clinical, food and environmental samples using microfluidic devices stamped in paper platforms. *Analytical Methods*, 7(17), 7311-7317.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., & Dyatmiko, W. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80(4), 1144-1152.
- Kondağcı, E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2013). Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method. *Talanta*, 115, 583-589.
- Fenton, E. M., Mascarenas, M. R., López, G. P., & Sibbett, S. S. (2008). Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1(1), 124-129.
- Garcia, E. J., Oldoni, T. L. C., Alencar, S. M. D., Reis, A., Loguercio, A. D., & Grande, R. H. M. (2012). Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian Dental Journal*, 23(1), 22-27.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 29-36.
- Li, X., Tian, J., & Shen, W. (2010). Quantitative biomarker assay with microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(1), 495-501.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Lu, Y., Shi, W., & Jiang, L. (2009). Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, 30, 1-4.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1318-1320.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Wiley, B. J., Gupta, M., & Whitesides, G. M. (2008). FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 8(12), 2146-2150.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., & Carrilho, E. (2010). Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*, 82(1), 3-10.

- Oliveira, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., Ferreirall, M. J. P., Romoffll, P., & Baaderl, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503.
- Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.
- Pyrzynska, K., & Pękal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5(17), 4288-4295
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Sameenoi, Y., Panymeesamer, P., Supalakorn, N., Koehler, K., Chailapakul, O., Henry, C. S., & Volckens, J. (2012). Microfluidic paper-based analytical device for aerosol oxidative activity. *Environmental Science & Technology*, 47(2), 932-940.
- Steiner, M. S., Meier, R. J., Duerkop, A., & Wolfbeis, O. S. (2010). Chromogenic sensing of biogenic amines using a chameleon probe and the red– green– blue readout of digital camera images. *Analytical chemistry*, 82(20), 8402-8405.
- Vella, S. J., Beattie, P., Cademartiri, R., Laromaine, A., Martinez, A. W., Phillips, S. T., Mirica, K. A., & Whitesides, G. M. (2012). Measuring markers of liver function using a micropatterned paper device designed for blood from a fingerstick. *Analytical chemistry*, 84(6), 2883-2891.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 701-705.
- Xie, J., & Schaich, K. M. (2014). Re-evaluation of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4251-4260.