



โครงการ

## การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ      การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยอุปกรณ์ฐานกระดาษ  
Determination of antioxidant by paper-based platform

ชื่อนิสิต            นางสาวสุชานุช สอนศรี

ภาควิชา             เคมี

ปีการศึกษา        2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยอุปกรณ์ฐานกระดาษ

Determination of antioxidant by paper-based platform

โดย

นางสาวสุชานุช สอนศรี

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

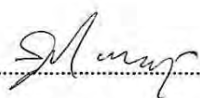
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

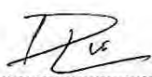
โครงการ การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยอุปกรณ์ฐานกระดาษ  
โดย นางสาวสุชานุช สอนศรี

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....  ..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรภคกุล)

.....  ..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

.....  ..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ลักขณา ดุบาส)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ ..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้



Project Title                    Determination of antioxidant by paper-based platform  
Student name                    Miss Suchanuch Sornsri                    Student ID 5633156723  
Advisor name                    Assist. Prof. Dr. Fuangfa Unob  
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016

### Abstract

With an increasing consumption and production of healthy dietary products rich in antioxidants, a simple and cost-effective test is required for the measurement of the antioxidant capacity of these products. In this research, a paper-based colorimetric method for sensitive detection of antioxidants in beverage was developed. The colorimetric detection was based on the reaction of the antioxidant with a chromogenic reagent consisted of silver ions and silver nanoparticles (AgNPs) or silver nanoplates (AgNPLs) which acted as seeding nucleation. Silver ions was reduced by antioxidant compounds to silver(0) deposited on AgNPs or AgNPLs, resulting in larger clusters of AgNPs or AgNPLs. The colorimetric response on the paper changed from white to brown depending on the concentration of antioxidant involved. Ascorbic acid was selected as the representative of antioxidant species and the method showed a linear response in the concentration range from 0 to 1 mM ascorbic acid ( $R^2$  0.990). Common beverage ingredients like reducing sugars did not interfere with the paper-based. The method was applied to determine the amount of antioxidant in tea samples and the results could be presented in term of ascorbic acid equivalents (AAE). This assay is particularly appealing for remote sensing applications, where specialized equipment is not available.

Keywords: antioxidant, paper-based, colorimetric method

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อคิดเห็น และข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินงานและการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นใน โครงการวิจัยนี้ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ มาโดยตลอด ทำให้ผู้วิจัยได้นำข้อมูลเหล่านี้มา ดำเนินงานและแก้ปัญหาดังกล่าว และงานวิจัยและรายงานฉบับนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงได้ หากไม่ได้รับความ กรณียกย่องสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงการวิจัย ได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล และ อาจารย์ ดร.ลักษณา ดุบาส ที่กรุณาตรวจสอบ แก้ไขและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบทุนโครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ สำหรับเป็นค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ในการดำเนินโครงการครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ ในหน่วยวิจัย Environmental Analysis Research Unit (EARU) ที่เป็น กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่มีส่วนให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการ ปฏิบัติงานมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ ครอบครัวของผู้ทำวิจัยที่คอยให้กำลังใจและการสนับสนุนตลอดการดำเนิน โครงการให้ผ่านอุปสรรคต่าง ๆ จนสำเร็จลุล่วงตามที่ตั้งใจ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	5
2.1 เทคนิคการตรวจวัดโดยการเปรียบเทียบสี	5
2.2 อนุภาคนาโนของเงิน	5
2.3 อนุมูลอิสระ	6
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ	7
2.5 การตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระ	8
2.6 อุปกรณ์ฐานกระดาษ	8
2.7 โหมดสี	9
2.7.1 โหมด RGB	9
2.7.2 โหมดระดับสีเทา	10
2.8 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด	10
2.8.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัด	11
2.8.2 ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ	11
2.8.3 ความแม่นยำ	11
2.8.4 ความเที่ยง	12

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3 การทดลอง</b>	<b>14</b>
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
3.2 สารเคมี	14
3.3 การเตรียมสารละลาย	15
3.3.1 การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต	15
3.3.2 การเตรียมสารละลายไตรโซเดียมซิติเรตความเข้มข้น 1% w/v	15
3.3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.01-1.00 มิลลิโมลาร์	15
3.3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.01-1.00 มิลลิโมลาร์	15
3.3.5 การเตรียมสารละลายกลูโคสและฟรุคโตสความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 โมลาร์	16
3.4 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน	16
3.5 การเตรียมอุปกรณ์ฐานกระดาษ	16
3.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop	18
3.7 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ	20
3.7.1 เตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี	20
3.7.2 การใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ	22
3.7.3 การศึกษาศึกษาผลของตัวแปรต่อการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ	22
3.7.4 การศึกษาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ	23
3.7.5 การศึกษาผลของตัวรบกวน	23
3.7.6 การตรวจหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเครื่องดื่ม	23
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง</b>	<b>25</b>
4.1 การออกแบบอุปกรณ์ฐานกระดาษ	25
4.2 การใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ	25
4.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตที่เหมาะสม	26



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินทรงกลมที่เหมาะสม	29
4.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นที่เหมาะสม	31
4.2.4 ผลของเวลาที่ใช้ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ	33
4.2.5 ผลของปริมาตรสารละลายตัวอย่างต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มสี	35
4.2.6 ผลของชนิดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน	37
4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด	39
4.3.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ	39
4.3.2 ขีดจำกัดของการตรวจวัด และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ	41
4.3.3 ความแม่นยำ	42
4.3.4 ความเที่ยง	43
4.4 การศึกษาการเกิดการรวมกลุ่มของอนุภาคนาโนเงินด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี	44
4.5 การใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเครื่องดื่ม	47
4.5.1 ผลของตัวรบกวนจากตัวอย่างต่อการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ	47
4.5.2 ผลการทดสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเครื่องดื่มชา	48
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง</b>	<b>49</b>
ข้อเสนอแนะและข้อควรระวัง	50
เอกสารอ้างอิง	51
ประวัติผู้วิจัย	55

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ค่าความเที่ยงที่ยอมรับได้ของการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตามมาตรฐาน AOAC INTERNATIONAL	12
ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
ตารางที่ 3.2 สารเคมี	14
ตารางที่ 3.3 การเตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรดต่อการเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ	21
ตารางที่ 3.4 การเตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินทรงกลมต่อการเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ	21
ตารางที่ 3.5 การเตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่นต่อการเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ	21
ตารางที่ 3.6 ตัวแปรและช่วงของการศึกษาในการพัฒนาวิธีการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ	22
ตารางที่ 4.1 ผลของความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษต่อการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อทดสอบกับกรดแอสคอร์บิก	27
ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนของเงินทรงกลมในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษต่อการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อทดสอบกับกรดแอสคอร์บิก	29
ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่นบนอุปกรณ์ฐานกระดาษต่อการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อทดสอบกับกรดแอสคอร์บิก	31
ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีเมื่อทดสอบกรดแอสคอร์บิกด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษในระยะเวลาที่แตกต่างกัน	34
ตารางที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีเมื่อใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษตรวจวัดกรดแอสคอร์บิกในปริมาณที่แตกต่างกัน	36
ตารางที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อใช้วิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและกรดแกลลิก	38
ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อใช้วิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก	39

## สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.8 ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดได้	42
ตารางที่ 4.9 ค่าความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.05, 0.30 และ 0.70 มิลลิโมลาร์	43
ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นของอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อใช้ทดสอบด้วยרבกวน	47
ตารางที่ 4.11 การทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มจากชาตัวอย่าง	48



## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน	5
รูปที่ 2.2 การเกิดเซอร์เฟส พลาสมอน เรโซแนนซ์ โดยแสดงการสั่นของกลุ่มอิเล็กตรอนในแถบเหนียวน้ำเมื่อมีแสงจากภายนอกส่องผ่าน	6
รูปที่ 2.3 ภาพจำลองของโมเลกุลที่เสถียร (ซ้าย) และอนุมูลอิสระ (ขวา)	7
รูปที่ 2.4 การเกิดปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างวิตามินอี (สารต้านอนุมูลอิสระ) กับ อนุมูลไฮดรอกซิล ( $\cdot\text{OH}$ )	8
รูปที่ 2.5 ตัวอย่างอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ใช้ตรวจวัดโลหะ $\text{Cu}^{2+}$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	9
รูปที่ 2.6 โหมดสี	10
รูปที่ 2.7 โหมดระดับสีเทา	10
รูปที่ 3.1 รูปแบบอุปกรณ์ฐานกระดาษ	17
รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมอุปกรณ์ฐานกระดาษ	17
รูปที่ 3.3 การเปิดภาพด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop	18
รูปที่ 3.4 การเปลี่ยนโหมดภาพเป็น grayscale	18
รูปที่ 3.5 การเลือกพื้นที่บริเวณทดสอบของอุปกรณ์ฐานกระดาษ	19
รูปที่ 3.6 การเปิดหน้าต่าง Histogram เพื่อดูค่าความเข้มสี	19
รูปที่ 3.7 โปรแกรมแสดงค่าความเข้มสี grayscale ของบริเวณที่เลือกไว้	20
รูปที่ 3.8 การใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ	22
รูปที่ 4.1 อุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับการวิเคราะห์	25
รูปที่ 4.2 กลไกการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ฐานกระดาษและสีของกระดาษทดสอบ	26
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นของเซลล์เวอร์โนเตรตต่างกัน	28
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินทรงกลมต่างกัน	30
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นต่างกัน	32

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกเมื่อทดสอบกับอุปกรณ์ฐานกระดาษในระยะเวลาที่แตกต่างกัน	35
รูปที่ 4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษกับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่ทดสอบโดยใช้ปริมาตรสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่แตกต่างกัน	37
รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและกรดแอสลิกด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ	39
รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ	40
รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีของการทดสอบสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ทำการวิเคราะห์ซ้ำด้วยอุปกรณ์กระดาษ	43
รูปที่ 4.11 ตัวอย่างลักษณะสเปกตรัมของสารละลายอนุภาคนาโนเงินที่เกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาคนาโน	45
รูปที่ 4.12 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิด AgNPs/AgNO <sub>3</sub> กับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	45
รูปที่ 4.13 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิด AgNPLs/AgNO <sub>3</sub> กับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	46

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีกลุ่มคนที่สนใจดูแลสุขภาพมากขึ้น มีความใส่ใจในการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มที่มีประโยชน์ ทำให้มีการผลิตเครื่องดื่มหลายชนิดที่มีการเติมสารต่าง ๆ ที่ช่วยในการส่งเสริมสุขภาพ และหนึ่งในสารที่สำคัญในเครื่องดื่ม คือ สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีงานวิจัยของ Halliwell [1] ที่บ่งชี้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าในเครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มีสารต้านอนุมูลอิสระจริงหรือไม่ จึงมีงานวิจัยมากมายพัฒนาการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่ม

วิธีการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น การตรวจวัดโดยให้สารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เช่น ใช้ตัวทำปฏิกิริยาเคมี คือ Co(II)/EDTA [2] หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ที่เรียกว่า วิธี DPPH [3] วิธี TRAP (total radicals trapping antioxidant parameter) [4] หรือการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ไอออนโลหะ (เช่น ไอออนของโลหะเงิน ทองแดง หรือทอง) ผ่านปฏิกิริยารีดอกซ์ [5-6] เป็นต้น เทคนิคในการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ไอออนของโลหะ เป็นเทคนิคหนึ่งที่ไม่ซับซ้อนในการเกิดปฏิกิริยา อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่มีสภาพไว (sensitivity) ที่ดี และมีความแม่นยำ (accuracy) อีกด้วย นอกจากนี้เครื่องมือที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดของปฏิกิริยาข้างต้นนั้นมีหลากหลาย เช่น การใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) การใช้เครื่องตรวจวัดการเปล่งแสง (chemiluminescence analyzer) แต่ทั้งสองวิธีนี้ยังจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีการใช้การตรวจวัดความเข้มของสี (colorimetric detection) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ยืดต่อการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี และมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก

จากการศึกษาผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการใช้ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ไอออนโลหะของปฏิกิริยารีดอกซ์มี 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 ตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยดูความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนของทองแดง (cupric ion reducing antioxidant capacity, CUPRAC) เป็นวิธีที่มีพื้นฐานมาจากปฏิกิริยารีดักชันของ Cu(II) เป็น Cu(I) ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารตัวอย่าง ทำให้การเปลี่ยนแปลงสี จากนั้นนำไปวัดความเข้มสีของสารประกอบ Cu(I) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารตัวอย่าง ตัวอย่างงานวิจัยในลักษณะนี้เช่น Apak และคณะ [5] ได้หาสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นกลุ่มของกรดแอสคอร์บิก วิตามินอี และสารประกอบพอลิฟีนอลในอาหาร (dietary polyphenols)

วิธีที่ 2 ตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยดูจากความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนของโลหะทอง และใช้วิธีตรวจวัดความเข้มสีในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทำปฏิกิริยาบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based platform) โดยให้ไอออนของโลหะทอง ( $Au^{4+}$ ) เกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง เกิด

เป็นอนุภาคนาโนของทอง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีบนกระดาษ การตรวจวัดทำได้โดยเปรียบเทียบสีของสารตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงกับสีของสารมาตรฐาน ตัวอย่างงานวิจัยในลักษณะนี้เช่น Dimosthenis และคณะ [6] ได้ทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มตัวอย่างชา และไวน์แดง โดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษ ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดที่สามารถทำได้ง่าย มีสภาพไว และให้ผลที่แม่นยำ เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งไม่ยุ่งยากในการใช้เครื่องมือ สามารถทดสอบได้รวดเร็ว และมีราคาถูก

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่ม โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ไอออนของโลหะ บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ โดยใช้ไอออนของโลหะเงิน ( $Ag^+$ ) ร่วมกับอนุภาคนาโนของเงิน (silver nanoparticles) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเริ่มต้น (nucleation seeding) และช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น เมื่อไอออนของเงินเกิดปฏิกิริยารีดักชันเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่าง จะเกิดเป็นโลหะเงินรวมตัวและเกาะเป็นกลุ่มเพิ่มขึ้นบนอนุภาคนาโนของเงินเริ่มต้น ทำให้อนุภาคนาโนของเงินมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีสีที่เปลี่ยนไป และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

## 1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบัน อนุภาคนาโนของโลหะถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย สำหรับการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น เนื่องจากเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระเกิดปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนของโลหะจะทำให้คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของอนุภาคนาโนเปลี่ยนแปลงไป ด้วยลักษณะที่โดดเด่นในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัตินี้เอง จึงเริ่มมีงานวิจัยที่ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างอนุภาคนาโนของโลหะกับสารต้านอนุมูลอิสระเกิดขึ้น

ในปี 2012 Özyürek และคณะ [8] ได้พัฒนาวิธีหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้อนุภาคนาโนของเงินเป็นตัวกลางเพื่อให้อนุภาคนาโนของเงินที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของไอออนโลหะเงิน ( $Ag^+$ ) ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมารวมตัว ได้อนุภาคที่มีขนาดที่ใหญ่ขึ้นในสารละลาย ส่งผลให้สารละลายมีสีที่เปลี่ยนไป และเข้มขึ้นตามจำนวนของสารต้านอนุมูลอิสระที่มากขึ้น จากนั้นนำสารละลายไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 423 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี แล้วคำนวณหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้หน่วยเทียบเท่าโทรลอคซ์ (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) อ้างอิงถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้ศึกษาการหาปริมาณของทั้ง hydrophilic และ lipophilic ซึ่งประกอบไปด้วยพอลิฟีนอลลิกกรดแอสคอร์บิก และวิตามินอี ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบกับสารตัวอย่างคือ เครื่องดื่มชาเขียว น้ำมันมะกอก และน้ำผลไม้

ในช่วงเวลาเดียวกัน เริ่มมีงานวิจัยที่นำกระดาษมาใช้งานในลักษณะของอุปกรณ์ตรวจวัด เนื่องจากมีราคาถูก ใช้งานง่าย และพกพาสะดวก มีการศึกษาการเตรียมและใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษเป็นอุปกรณ์ในการตรวจวัด เช่น ในปี 2012 Zhong และคณะ [9] ทำการศึกษาข้อมูลของแวกซ์แต่ละชนิด (wax) เพื่อเตรียมอุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based devices) โดยการศึกษาสภาวะต่าง ๆ เช่น ผลของอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่สุด เพื่อให้แวกซ์ซึ่งเป็นส่วนของไฮโดรโฟบิกซึมลงไปใช้อุปกรณ์กระดาษอย่างสมบูรณ์

ตั้งแต่ในปี 2013 มีการนำอุปกรณ์ฐานกระดาษร่วมกับอนุภาคนาโนมาใช้เป็นตัวกลางในการวิจัยมากขึ้น เช่น Sharpe และคณะ [10] ได้พัฒนาและอธิบายลักษณะการใช้งานของอุปกรณ์ฐานกระดาษที่มีอนุภาคนาโนของซีเรีย (ceria nanoparticles) เกิดขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้นบนกระดาษ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ ที่สารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เข้มขึ้นตามปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณด้วยเทคนิคการตรวจวัดโดยการเทียบสี (colorimetric method) โดยทำการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ทั่วไป ประกอบด้วย กรดแอสคอร์บิก กรดแกลลิก กรดวานิลลิก เควอซิทิน กรดคาเฟอิก และเอพิกัลโลแคเทชินแกลแลต ซึ่งในการตรวจวัดด้วยวิธีนี้มีช่วงของการตรวจวัดตั้งแต่ 20-400 ไมโครโมลาร์ โดยมีสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือ เครื่องดื่มชาชนิดต่าง ๆ และยาที่มีสารสกัดจากเห็ด (medicinal mushroom) ซึ่งรายงานผลปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในหน่วยเทียบเท่ากรดแกลลิก (gallic acid equivalents, GAE) อุปกรณ์ชนิดนี้สามารถทดสอบได้ง่าย พกพาสะดวก และสามารถนำไปใช้ภาคสนามได้

ต่อมาในปี 2015 Ferreira และคณะ [11] ประดิษฐ์อุปกรณ์สำหรับตรวจหาปริมาณของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างน้ำส้มและยาคาวิตามินซีชนิดเม็ด โดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษเป็นตัวกลางที่มีโซนาไฮโดรโอฟบิลล้อมรอบบริเวณทำปฏิกิริยาเพื่อป้องกันการไหลของสาร โดยให้กรดแอสคอร์บิกทำหน้าที่รีดิวซ์ไอออนของโลหะเงิน ( $Ag^+$ ) ให้เปลี่ยนไปเป็นอนุภาคนาโนของเงิน (Ag nanoparticles) และอุปกรณ์ฐานกระดาษนี้เปลี่ยนสีจากสีเหลืองจนถึงสีเทาตามปริมาณที่เพิ่มขึ้นของกรดแอสคอร์บิก แล้ววัดความเข้มของสีด้วยเครื่องสแกนหรือเครื่องวัดความเข้มแสงที่คณะผู้วิจัยทำขึ้นเอง ซึ่งอุปกรณ์นี้สามารถใช้งานง่าย พกพาสะดวก ให้ความถูกต้องและเที่ยงเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานอย่างวิธี DPPH [3]

ในปี 2015 Dimosthenis และคณะ [6] ได้ทดสอบหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มตัวอย่างชาและไวน์แดง โดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษเป็นตัวกลาง และมีหลักการวิเคราะห์คล้ายกับงานวิจัยของ Ferreira และคณะ [11] นั่นคือ ใช้ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ไอออนของโลหะทอง ( $AuCl_4^-$ ) ให้เกิดเป็นอนุภาคนาโนของทองคำ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโลคัลไลซ์ เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (localized surface plasmon resonance, LSPR) ของอนุภาคนาโนทองคำ จากนั้นตรวจวัดปริมาณโดยเทคนิคการตรวจวัดในการเปรียบเทียบสี และรายงานผลในหน่วยเทียบเท่ากรดแกลลิก มีช่วงการตรวจวัดอยู่ที่ 10 ไมโครโมลาร์ ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถทำได้ง่าย มีสภาพไว และให้ผลที่มีความแม่นยำเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

ในปี 2016 Hidayat และคณะ [12] ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอลที่เป็นสารประกอบที่มีมากในเครื่องดื่มชาเขียว โดยใช้โซเดียมเพอร์ริโอเดรต ( $NaIO_4$ ) ไปออกซิไดส์สารประกอบกลุ่มฟีนอล จากนั้นฟีนอลที่ถูกออกซิไดส์จะเกิดปฏิกิริยาคู่ควบ (coupling reaction) กับสารประกอบ 3-methyl-2-benzothiazolinone (MBTH) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารที่ให้สี และให้สารประกอบสีแดง ซึ่งทำการตรวจวัดบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ และหาปริมาณด้วยเทคนิคการตรวจวัดโดยเปรียบเทียบสี วิธีนี้มีค่าการ



ตรวจวัดต่ำสุด (LOD) อยู่ที่ 10.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีช่วงของการตรวจวัดอยู่ที่ 25-300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอุปกรณ์ที่ทำได้ง่าย ราคาถูก และสามารถตรวจหาปริมาณของสารในกลุ่มพีนอลได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ต้องการผู้เชี่ยวชาญ

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ผู้วิจัยสนใจใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการทำการวิเคราะห์ เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ที่ใช้งานง่าย มีราคาถูก ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญมากในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง จึงเป็นอุปกรณ์ที่สามารถเข้าถึงกลุ่มคนทั่วไป และมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ภาคสนาม ซึ่งวิธีตรวจสอบที่สอดคล้องกับอุปกรณ์ฐานกระดาษคือ เทคนิคการตรวจวัดโดยเปรียบเทียบสี เนื่องจากสามารถมองเห็นได้ง่าย โดยตาเปล่า และสามารถนำไปวิเคราะห์ความเข้มสีจากโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ต่อได้ เช่น ImageJ หรือ Adobe Photoshop เป็นต้น

### 1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.3.1. ออกแบบและสร้างอุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ
- 1.3.2. พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเครื่องดื่มสมูทด้วยวิธีอุปกรณ์ฐานกระดาษ

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการวิเคราะห์ที่ใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษชนิดใหม่ที่สามารถใช้งานได้ง่ายเพื่อตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่ม

## บทที่ 2

### ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 เทคนิคการตรวจวัดโดยการเปรียบเทียบสี

วิธีตรวจวัดโดยการเปรียบเทียบสี (colorimetric method) [13] เป็นวิธีการวิเคราะห์โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) กับสารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยาหรือรีเอเจนต์ (reagent) ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดสี แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงสีหรือการเปลี่ยนความเข้มของสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งความเข้มของสีที่เปลี่ยนไปเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สำหรับการตรวจวัดนั้น สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงได้โดยใช้เทคนิคสเปกโตรเมตรี หรือสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่าซึ่งได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากทำได้สะดวก รวดเร็ว และง่ายต่อการวิเคราะห์

ตัวอย่างการตรวจวัดโดยการเปรียบเทียบสี เช่น การตรวจวัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ siloxane 3-aminopropyltriethoxysilane (APTMS) และ glutaraldehyde (GA) ที่อยู่บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ [14] โดยสารประกอบเชิงซ้อนของ APTMS-GA มีสีแดงอิฐ แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำให้ความเข้มสีเปลี่ยนไปตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดังรูปที่ 2.1

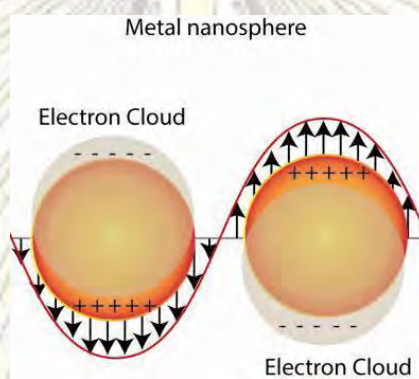


รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน [14]

#### 2.2 อนุภาคนาโนของเงิน

อนุภาคนาโนของเงิน (silver nanoparticles, AgNPs) ถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เช่น ใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (antibacterial agent) ใช้เป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor) เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเฉพาะตัวของอนุภาคนาโนของเงิน [15] ซึ่งคุณสมบัติของอนุภาคนาโนของเงินที่สำคัญ คือ คุณสมบัติเชิงแสง (optical property) [16] และการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนของเงิน ตัวอย่างเช่น อนุภาคนาโนของเงินที่มีรูปร่างทรงกลมจะมีสีเหลือง ในขณะที่แผ่นนาโนของเงิน (silver nanoplates, AgNPLs) ซึ่งมีโครงสร้างเป็น 2 มิติ สามารถมีโครงสร้างหลายรูปทรง เช่น ทรงหกเหลี่ยม (hexagonal) ทรงสามเหลี่ยมตัดปลาย (truncated triangular) ทรงปริซึมสามเหลี่ยมปลายกลม (rounded-tip triangular prism) และทรงแผ่นกลม (circular disks) ซึ่งจะ

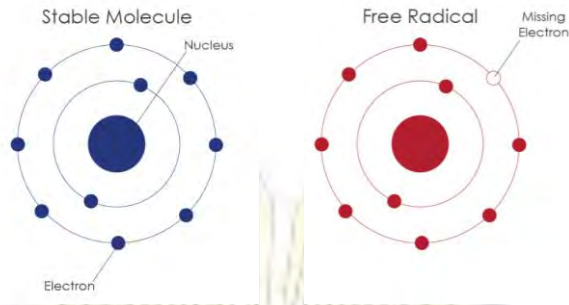
มีสีที่แตกต่างกัน เช่น สีแดง สีม่วง หรือสีน้ำเงิน เป็นต้น เมื่อคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมาตกกระทบอนุภาคโลหะ กลุ่มอิเล็กตรอนที่ถูกจำกัดอยู่ในอนุภาคระดับนาโนจะเกิดการสั่น (collective oscillation) ส่งผลให้เกิดการกระเจิงแสง (scattering) และดูดกลืนแสง (absorption) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า โลคัลไลซ์ เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (localized surface plasmon resonance, LSPR) ด้วยเหตุนี้ AgNPLs จึงมีลักษณะพิเศษ และมีสีอยู่ในสเปกตรัมในช่วงวิสิเบิล ซึ่งขึ้นอยู่กับรูปร่าง ขนาด และสภาวะแวดล้อม ดังนั้น ในการวิเคราะห์ทางเคมี ถ้าให้อนุภาคนาโนเกิดปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปทรงของอนุภาคนาโน จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของ LSPR เกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดในวิธีการเปรียบเทียบสี หรือใช้ร่วมกับเครื่องมือหรืออุปกรณ์ตรวจวัดในการวิเคราะห์สารที่ต้องการ [6, 17-19]



รูปที่ 2.2 การเกิดเซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ โดยแสดงการสั่นของกลุ่มอิเล็กตรอนในแถบเหนี่ยวนำเมื่อมีแสงจากภายนอกส่องผ่าน [20]

### 2.3 อนุมูลอิสระ

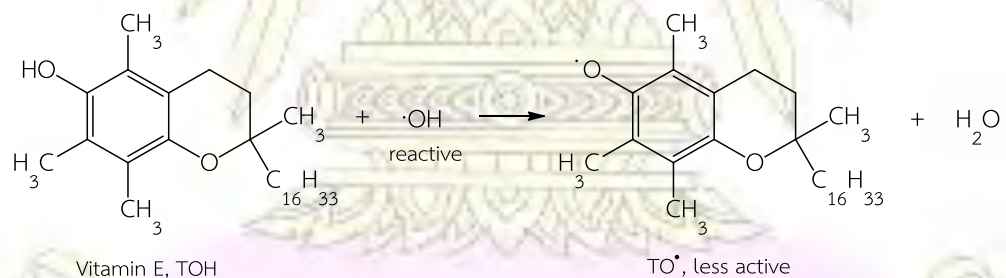
อนุมูลอิสระ (free radical) [21] คือ อะตอม โมเลกุล หรือ ไอออนที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ (unpaired electron) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อได้อย่างว่องไวกับโมเลกุลอื่นรอบข้าง ในระบบชีวภาพ อนุมูลอิสระส่วนมากจะเกิดจากโมเลกุลของออกซิเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ ซึ่งจัดอยู่ในพวกไวต่อปฏิกิริยาที่พบมากที่สุดในร่างกายมนุษย์ และเรียกโมเลกุลเหล่านี้ที่มีอิเล็กตรอนเพิ่มเข้ามาอีกหนึ่งตัวว่า รีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species, ROS) รีแอกทีฟไนโตรเจนสปีชีส์ (reactive nitrogen species, RNS) และรีแอกทีฟซัลเฟอร์สปีชีส์ (reactive sulphur species, RSS) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล ( $\cdot\text{OH}$ ) อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) อนุมูลไนตริกออกไซด์ ( $\text{NO}\cdot$ ) อนุมูลลิพิดเพอร์ออกไซด์ ( $\text{LOO}\cdot$ ) อนุมูลเมทิล ( $\cdot\text{CH}_3$ ) เป็นต้น



รูปที่ 2.3 ภาพจำลองของโมเลกุลที่เสถียร (ซ้าย) และอนุมูลอิสระ (ขวา) [22]

#### 2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [21] คือ โมเลกุลที่ทำให้อนุมูลอิสระมีประจุเป็นกลาง โดยการรับหรือให้อิเล็กตรอน เพื่อกำจัดสถานะที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ของอนุมูลอิสระ โมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระและทำลายความเป็นอนุมูลอิสระของสารเหล่านั้น ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระบางโมเลกุลเมื่อเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว สารดังกล่าวจะกลายเป็นอนุมูลอิสระโมเลกุลใหม่ที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาน้อยลง ส่งผลให้มีความเป็นอันตรายต่ำกว่าโมเลกุลของอนุมูลอิสระชนิดเดิม สารต้านอนุมูลอิสระส่วนมากมีวงอะโรมาติกในโมเลกุล เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระจะกลายเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่จะสามารถเคลื่อนที่ภายในวงอะโรมาติกได้ ทำให้อนุมูลอิสระนี้มีความเสถียร หรือ มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาต่ำลง ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การเกิดปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างวิตามินอี (สารต้านอนุมูลอิสระ) กับ อนุมูลไฮดรอกซิล ( $\cdot\text{OH}$ )

## 2.5 การตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระ

ในปัจจุบันมีวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารและเครื่องดื่มหลายวิธี แต่ยังไม่มียุทธวิธีมาตรฐานที่ใช้เพื่อตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระแน่นอน เนื่องจากมีปัจจัยที่หลากหลายที่ส่งผลต่อการหาปริมาณที่แน่นอน กล่าวคือ สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละตัวเกิดปฏิกิริยาเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระแต่ต่างกันออกไป ทำให้ยังไม่มีวิธีใดที่สามารถวัดปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างถูกต้องอย่างแท้จริงในอาหารหรือเครื่องดื่ม แต่อย่างไรก็ตามสหภาพเคมีบริสุทธิ์และเคมีประยุกต์ระหว่างประเทศ (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) ได้รวบรวมวิธีหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไว้เพื่อให้เลือกใช้ในการตรวจวัด [30] ซึ่งวิธีดังกล่าวมีหลักการหาปริมาณอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน วิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมีหลักการ 2 ประเภท คือ (1) การถ่ายโอนอิเล็กตรอน (electron transfer, ET) และ (2) การถ่ายโอนอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) แต่ด้วยหลักการทั้งสองที่มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกัน ทำให้เป็นการยากที่จะนำผลมาเปรียบเทียบกัน เนื่องจากมีปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ เช่น ค่าศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ และพีเอช เป็นต้น Apak และคณะ ร่วมกับ IUPAC [23] จึงได้ทำการรวบรวมข้อมูลวิธีตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ที่มีหลักการงานที่แตกต่างกัน เพื่อแบ่งประเภท ศึกษาการหาปริมาณของแต่ละวิธี และระบุปัจจัยที่มีผลต่อการหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ

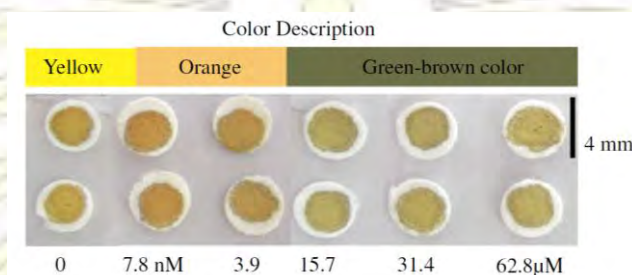
ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้หลักการถ่ายโอนอิเล็กตรอน โดยใช้ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ให้อิเล็กตรอนแก่ไอออนเงิน ( $Ag^+$ ) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแล้วเกิดเป็นอนุภาคนาโนของเงิน ( $AgNPs$ ) ซึ่งสามารถรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้นตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้มีสีที่เปลี่ยนไปตามคุณสมบัติเชิงแสงของอนุภาคนาโนของเงิน

## 2.6 อุปกรณ์ฐานกระดาษ

อุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based device) [24,25] เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดปริมาณสารที่สนใจบนกระดาษ โดยจะออกแบบเป็นสองบริเวณคือ บริเวณที่ชอบน้ำและบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งบริเวณที่ชอบน้ำ (hydrophilic zone) จะมีการไหลของสารตัวอย่างด้วยแรงแคพิลลารีไปเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่ตรึงอยู่บนกระดาษ ส่วนในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic zone) จะประยุกต์ใช้วัสดุที่ไม่ชอบน้ำ เช่น แวกซ์หรือขี้ผึ้ง ในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ เพื่อป้องกันการไหลของสารตัวอย่างหรือรีเอเจนต์ออกนอกบริเวณที่ต้องการวิเคราะห์ โดยจุดเริ่มต้นของการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดโดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษนี้ เริ่มจากความ

ต้องการอุปกรณ์ในทางการแพทย์ที่ช่วยวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคที่มีความสะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดโดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษไม่เพียงแต่มีส่วนช่วยในการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์เท่านั้น แต่มีการพัฒนาให้มีความสามารถตรวจวัดสารต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น ตรวจวัดโลหะหนักในอาหาร [26] ตรวจวัดโลหะหนักในแหล่งน้ำ [27] ตรวจวัดสารเคมีที่อยู่ในฝุ่นผง [28] เป็นต้น โดยอุปกรณ์ฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา สามารถพกพาได้สะดวก มีราคาถูก สามารถนำไปใช้ได้จริงในภาคสนาม เนื่องจากใช้งานง่ายและมีประสิทธิภาพ



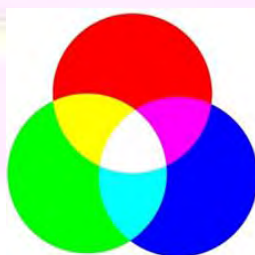
รูปที่ 2.5 ตัวอย่างอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ใช้ตรวจวัดโลหะ  $\text{Cu}^{2+}$  ที่ความเข้มข้นต่างๆ [29]

## 2.7 โหมดสี

โหมดสี (color mode) คือ รูปแบบของสีต่าง ๆ ในโปรแกรมที่ผู้ใช้สามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับรูปภาพที่จะนำไปใช้งาน เช่น โหมดสี RGB และ โหมดระดับสีเทา (grayscale)

### 2.7.1 โหมด RGB

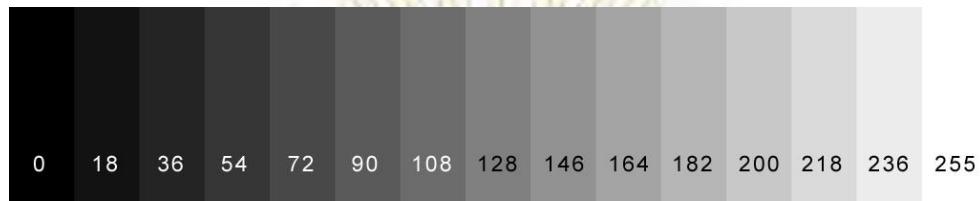
โหมดสี RGB [30] ประกอบด้วยสีสามสี คือ สีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน ดังรูปที่ 2.6 โดยแต่ละสีจะไล่ได้ 256 ระดับ โดยใช้หลักการการรวมแสงสี ซึ่งสามารถสร้างสีได้สูงสุด 16.7 ล้านสี ระบบสี RGB เป็นระบบสีของแสง ซึ่งเกิดจากการหักเหของแสงผ่านแท่งแก้วปริซึมแล้วเกิดแถบสีที่เรียกว่า สเปกตรัม (spectrum) ซึ่งแยกสีตามทิวสายตามองเห็นได้ 7 สี คือ ม่วง คราม น้ำเงิน เขียว เหลือง แสด แดง ส่วนใหญ่การใช้สีลักษณะนี้จะใช้ในอุปกรณ์ที่เกี่ยวกับแสง ได้แก่ จอภาพ กล้องดิจิทัล เป็นต้น



รูปที่ 2.6 โหมดสี RGB

### 2.7.2 โหมดระดับสีเทา

โหมดระดับสีเทา (grayscale mode) [31] เป็นโหมดสีที่มีเพียงสองสี คือ สีขาว และสีดำ แต่มีระดับความเข้มของสีดำ 255 ระดับรวมกับสีขาวอีกหนึ่งสี ทำให้โหมดสีนี้มีเพียง 256 สี ภาพระดับสีเทาจะมีการไล่ระดับความอ่อนแก่ของสีอยู่ระหว่างสีขาวและสีดำ ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 โหมดระดับสีเทา

ในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคการตรวจวัดโดยการเทียบสีเพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโหมดสี เนื่องจากสีจะเปลี่ยนจากสีขาวของกระดาษเป็นสีน้ำตาลถึงสีเทา ซึ่งความเข้มของสีแปรผันตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มากขึ้น และจากสีน้ำตาลไปเป็นสีเทายู่คนละเฉดสี ดังนั้น การเปรียบเทียบสีจึงต้องเปลี่ยนโหมดภาพจาก RGB เป็นโหมดระดับสีเทา เพื่อให้การเปรียบเทียบความเข้มของสีมีความถูกต้องมากที่สุด โดยสามารถเปลี่ยนเฉดสีและหาค่าความเข้มสีได้ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ เช่น Adobe Photoshop หรือ ImageJ เป็นต้น

## 2.8 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด (method validation) [32] เป็นกระบวนการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ว่ามีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสารตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้งานหรือไม่ โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัดจะพิจารณาคุณสมบัติของวิธีตรวจวัด ดังนี้

### 2.8.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัด

ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวัดได้ โดยขีดจำกัดของการตรวจวัด หาได้โดยการวัด blank ของสารตัวอย่าง (sample blank) อย่างน้อย 7 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่า SD ของค่าเฉลี่ยความเข้มระดับสีเทา (mean gray value)

ขีดจำกัดของการตรวจวัดคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\square\square\square = \frac{3 \times \square\square}{\square\square\square\square}$$

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของ blank ที่วัดได้

Slope คือ ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน

### 2.8.2 ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ

ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่สามารถหาปริมาณหรือรายงานผลได้โดยมีความแม่นยำ และความเที่ยงที่ยอมรับได้ โดยขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณหาได้โดยการวัด blank ของสารตัวอย่าง (sample blank) อย่างน้อย 7 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่า SD ของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นระดับสี่เท่า

ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\square\square\square = \frac{10 \times \square\square}{\square\square\square\square}$$

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของ blank ที่วัดได้

Slope คือ ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน

### 2.8.3 ความแม่นยำ

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) หมายถึง คุณลักษณะที่ชี้ว่าผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริงหรือค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ เนื่องจากในทางปฏิบัติยากที่จะทราบค่าจริง จึงใช้วิธีเปรียบเทียบกับค่าที่เป็นที่ยอมรับแทน ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์เป็นคุณลักษณะที่แสดงถึงการให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความสอดคล้องกับค่าจริง

การเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ (reference value) ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ศึกษา เทียบกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่นที่อ้างอิงได้ เช่น วิธีมาตรฐาน (reference method หรือ standard method) และเปรียบเทียบผลโดยใช้หลักสถิติทดสอบค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงว่าเป็นไปตามเกณฑ์หรือไม่ โดยใช้ t-test จากสูตร ดังนี้

$$\square_{\square\square\square} = (\bar{\square} - \square) \frac{\sqrt{\square}}{\square}$$

เมื่อ  $t_{cal}$  คือ ค่า t ที่ได้จากการคำนวณ



$\bar{X}$	คือ ค่าเฉลี่ย
$\mu$	คือ ค่าอ้างอิง
SD	คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
n	คือ จำนวนครั้งที่วิเคราะห์

นำค่า  $t$  ที่คำนวณได้ ( $t_{cal}$ ) ไปเปรียบเทียบกับค่า  $t$ วิกฤต ( $t_{crit}$ ) โดยมีเกณฑ์ว่า  $t_{cal}$  น้อยกว่า  $t_{crit}$  แสดงว่าค่าเฉลี่ยของการทดสอบไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญ

#### 2.8.4 ความเที่ยง

ความเที่ยง (precision) หมายถึง ความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดิมซ้ำกันหลายครั้งด้วยวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา โดยการกระจายตัวของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำมักแสดงด้วย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) หรือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ระดับความเที่ยงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยสามารถหารระดับความเที่ยงโดยพิจารณาได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD)

**ตารางที่ 2.1** ค่าความเที่ยงที่ยอมรับได้ของการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตามมาตรฐาน AOAC INTERNATIONAL [33]

Analyte [%]	Analyte ratio	Unit	RSD [%]
100	1	100%	1.3
10	$10^{-1}$	10%	2.8
1	$10^{-2}$	1%	2.7
0.1	$10^{-3}$	0.1%	3.7
0.01	$10^{-4}$	100 ppm	5.3
0.001	$10^{-5}$	10 ppm	7.3
0.0001	$10^{-6}$	1 ppm	11

Analyte [%]	Analyte ratio	Unit	RSD [%]
0.00001	$10^{-7}$	100 ppb	15
0.000001	$10^{-8}$	10 ppb	21
0.0000001	$10^{-9}$	1 ppb	30



บทที่ 3  
การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ	ยี่ห้อ/รุ่น
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Denver Instrument
เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง	Mettler Toledo
กระดาษกรอง เบอร์ 1	Whatman
บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 250 และ 500 มิลลิลิตร	Pyrex, Duran
ขวดกำหนดปริมาตร ขนาด 10, 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร	Pyrex
ไมโครปิเปต ขนาด 20, 1000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร	Transferpette
สมาร์ทโฟน	iPhone 5s
ดินสอเทียน (grease pencil)	Mitsubishi
ตุ้บ	Memmert
เครื่องให้ความร้อน	Corning

3.2 สารเคมี

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้มีความบริสุทธิ์ในเกรดเพื่อใช้วิเคราะห์ (analytical reagent (AR) grade) รายการสารเคมีทั้งหมดแสดงในตารางที่ 3.2 และในงานวิจัยนี้ใช้น้ำ MilliQ ในการเตรียมสารละลายทั้งหมด

ตารางที่ 3.2 รายการสารเคมี

สารเคมี	ผู้จัดจำหน่าย
กรดแอสคอร์บิก (l-ascorbic acid)	UNILAB
กรดแกลลิก (gallic acid)	Sigma-Aldrich
กลูโคส (glucose)	Sigma-Aldrich
ฟรุคโตส (fructose)	Sigma-Aldrich

สารเคมี	ผู้จัดจำหน่าย
ซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate)	AENCORE
ไตรโซเดียมซิเตรต (trisodium citrate)	Fisher Scientific

### 3.3 การเตรียมสารละลาย

#### 3.3.1 การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต

ชั่งซิลเวอร์ไนเตรตน้ำหนักละเอียดใกล้เคียง 0.85 กรัม ละลายในน้ำ MilliQ จนมีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ในขวดกำหนดปริมาตร ได้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใช้เป็นสารละลายตั้งต้นเพื่อเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 1, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิโมลาร์ โดยการปิเปตสารละลายสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรที่เหมาะสมและเจือจางด้วยน้ำ MilliQ และปรับปริมาตรสุดท้ายในขวดกำหนดปริมาตร

#### 3.3.2 การเตรียมสารละลายไตรโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 1% w/v ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งไตรโซเดียมซิเตรต 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ MilliQ จนมีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายไตรโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 1% w/v

#### 3.3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.01-1.00 มิลลิโมลาร์

ชั่งกรดแอสคอร์บิกน้ำหนักละเอียดใกล้เคียง 0.44 กรัม ละลายในน้ำ MilliQ จนมีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ในขวดกำหนดปริมาตร ได้สารละลายกรดแอสคอร์บิก 5.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใช้เป็นสารละลายตั้งต้นเพื่อเตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 0.70 และ 1.00 มิลลิโมลาร์ โดยการปิเปตสารละลายกรดแอสคอร์บิก 5.0 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรที่เหมาะสมและเจือจางด้วยน้ำ MilliQ และปรับปริมาตรสุดท้ายในขวดกำหนดปริมาตร

#### 3.3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.01-1.00 มิลลิโมลาร์

ชั่งกรดแกลลิกน้ำหนักละเอียดใกล้เคียง 0.425 กรัม ละลายในน้ำ MilliQ จนมีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ในขวดกำหนดปริมาตร ได้สารละลายกรดแกลลิก 5.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใช้เป็นสารละลายตั้งต้นเพื่อเตรียมสารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 0.70 และ 1.00 มิลลิโมลาร์ โดยการปิเปตสารละลายกรดแกลลิก 5.0 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม และเจือจางด้วยน้ำ MilliQ และปรับปริมาตรสุดท้ายในขวดกำหนดปริมาตร

### 3.3.5 การเตรียมสารละลายกลูโคสและฟรุกโตสความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 โมลาร์

ชั่งกลูโคส 1.80 กรัม ให้ทราน้ำหนักละเอียด ละลายในน้ำ MilliQ และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดกำหนดปริมาตร ได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 โมลาร์ จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ ปริมาตร 5.00 และ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ MilliQ ได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ สำหรับสารละลายฟรุกโตสทำเช่นเดียวกันกับวิธีข้างต้น เนื่องจากมีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_6H_{12}O_6$  เหมือนกัน และเป็นคู่อิโซเมอร์กัน

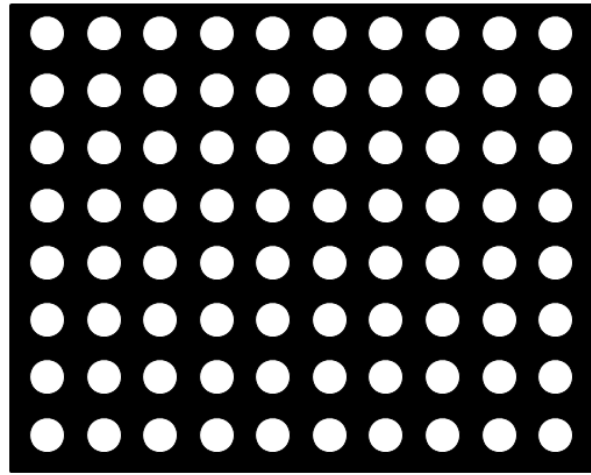
### 3.4 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน

ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไอออนเงินจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ( $AgNO_3$   $1.00 \times 10^{-3}$  M, 50 mL) ด้วยสารละลายไตรโซเดียมไซเตรต (1% w/v  $C_6H_5O_7Na_3$ , 5.00 mL) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

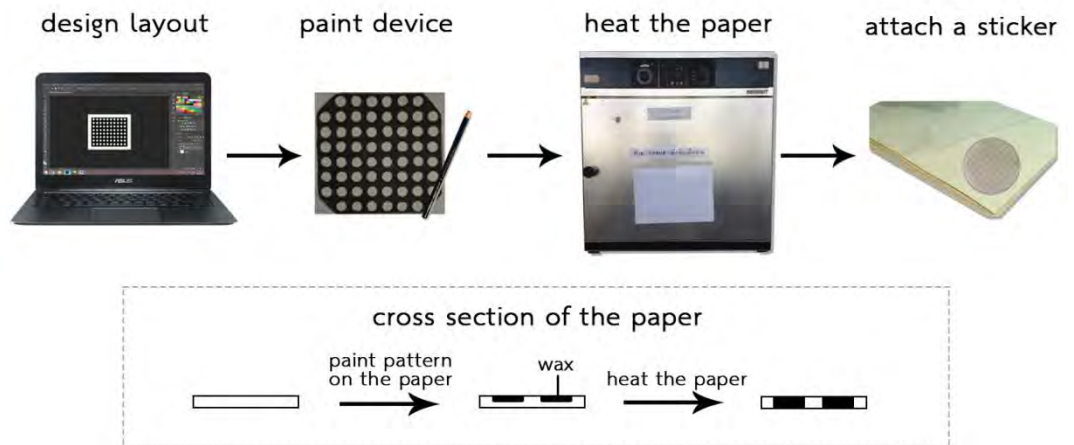
1. ต้มสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 50 mL จนมีอุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. หยดสารละลายไตรโซเดียมไซเตรต 5 mL อย่างช้า ๆ และให้ความร้อนแก่สารละลายจนสารละลายเปลี่ยนสีเป็นเหลืองอมน้ำตาล
3. ทำให้สารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนของเงินเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ได้สารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนของเงินที่มีความเข้มข้นประมาณ  $7 \times 10^{-4}$  M

### 3.5 การเตรียมอุปกรณ์ฐานกระดาษ

1. ออกแบบอุปกรณ์ฐานกระดาษด้วยโปรแกรม Microsoft Word โดยกำหนดรูปแบบเป็นวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.8 เซนติเมตร
2. ลอกลายวงกลมลงบนกระดาษกรอง (Whatman no.1) ส่วนตรงจวดสาร คือบริเวณภายในรูปทรงวงกลม และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) รอบนอกวงกลมจะระบายด้วยดินสอสีเทียนชนิด grease pencil (สีดำ) แสดงดังรูปที่ 3.1
3. นำกระดาษกรองไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้แว็กซ์ละลายซึมเข้าสู่กระดาษ
4. ตัดแผ่นสติ๊กเกอร์ใสบริเวณด้านหลังให้แน่น แสดงขั้นตอนทั้งหมดดังรูปที่ 3.2



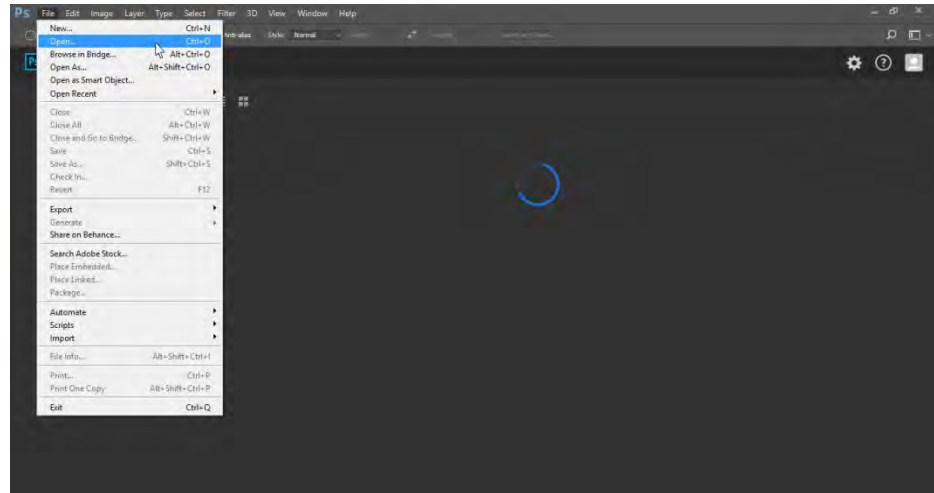
รูปที่ 3.1 รูปแบบอุปกรณ์ฐานกระดาษ



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมอุปกรณ์ฐานกระดาษ

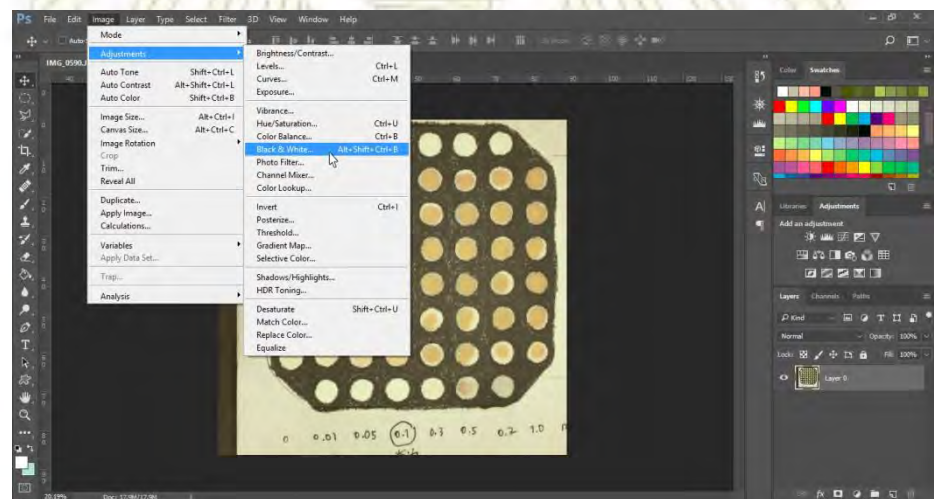
### 3.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความเข้มสีของรูปภาพโดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop

1. เปิดโปรแกรม Adobe Photoshop จากนั้นเลือกรูปภาพที่ต้องการโดยใช้คำสั่ง File แล้วคลิก open



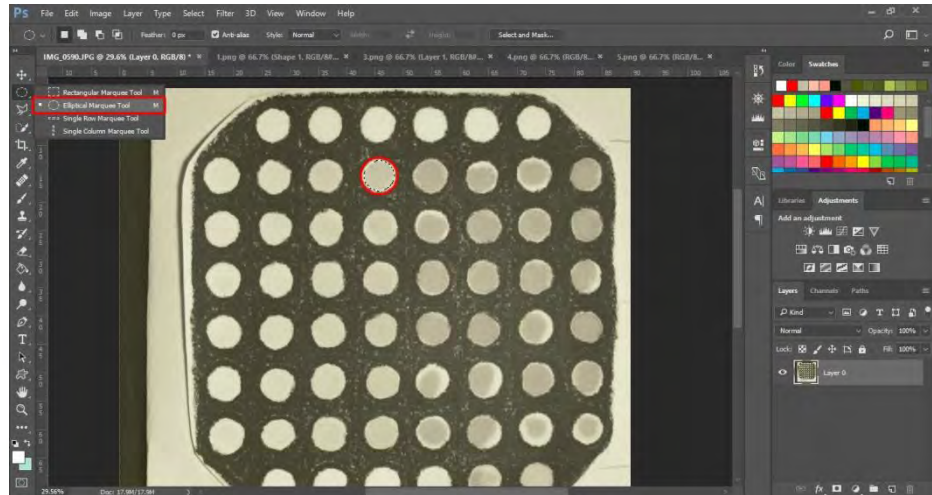
รูปที่ 3.3 การเปิดภาพด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop

2. เปลี่ยนโหมดภาพเป็นโหมดระดับสีเทา (grayscale mode) โดยเลือกคำสั่ง Image แล้วคลิก Adjustments แล้วเลือก Black and White แล้วคลิก OK



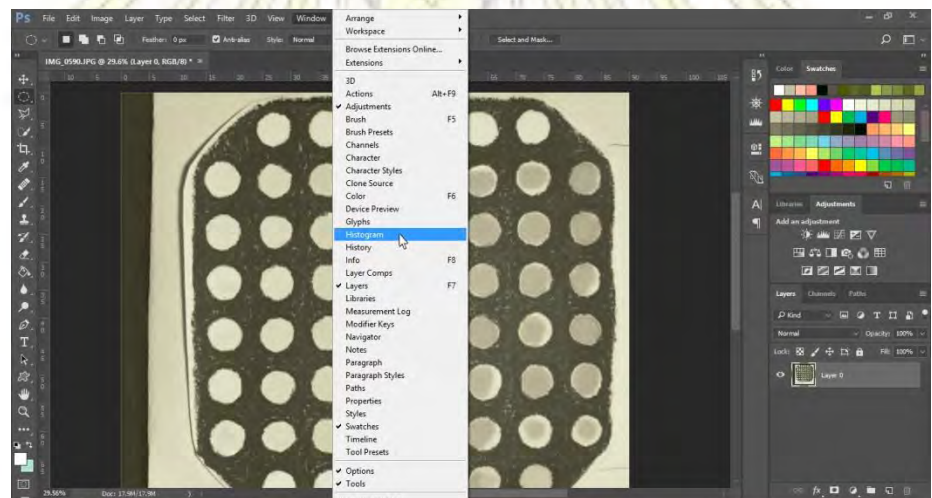
รูปที่ 3.4 การเปลี่ยนโหมดภาพเป็น grayscale

3. เลือกเครื่องมือ Elliptical Marquee Tool จากนั้นลากเมาส์เพื่อเลือกพื้นที่ในบริเวณทดสอบเพื่อวัดความเข้มของสี



รูปที่ 3.5 การเลือกพื้นที่บริเวณทดสอบของอุปกรณ์ฐานกระดาษ

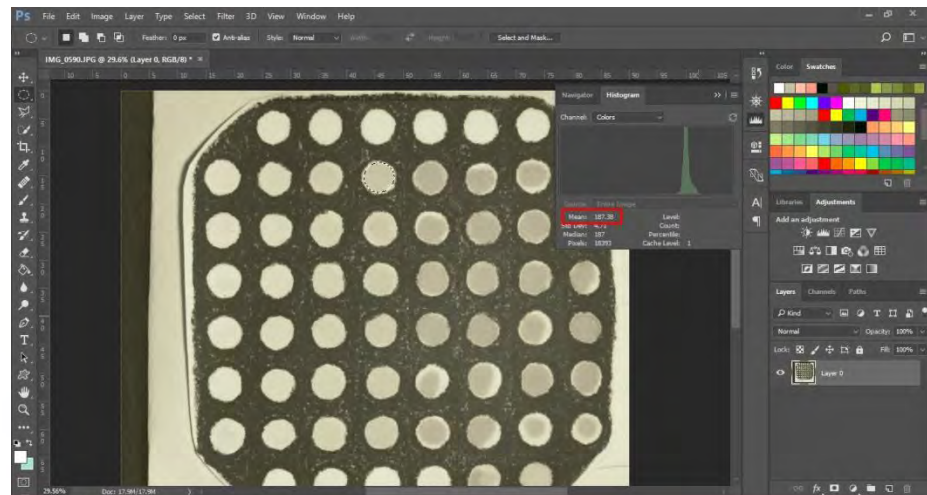
4. เลือกคำสั่ง window แล้วคลิก Histogram จะมีหน้าต่างของ Histogram ปรากฏขึ้น



รูปที่ 3.6 การเปิดหน้าต่าง Histogram เพื่อดูค่าความเข้มสี



## 5. บันทึกค่าความเข้มของสีระดับสีเทาโดยดูได้จากค่า Mean (mean gray value)



รูปที่ 3.7 โปรแกรมแสดงค่าความเข้มสี grayscale ของบริเวณที่เลือกไว้

### 3.7 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ

#### 3.7.1 เตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี

รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี (chromogenic reagent) มีไอออนของเงินเป็นสารตั้งต้นหลักที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเกิดเป็นโลหะเงินที่รวมตัวกับอนุภาคนาโนของเงินตั้งต้นที่เป็นองค์ประกอบอีกหนึ่งชนิดในรีเอเจนต์ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ไอออนของเงินจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตและผสมกับอนุภาคนาโนของเงินปริมาณเล็กน้อยเป็นรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรต และผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินทั้งทรงกลม และแบบแผ่น ต่อการเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ ทำการเตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีทำได้โดย ปิเปตสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตปริมาตรต่างๆ ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายอนุภาคนาโนของเงินผสมลงไปปริมาตรที่ต้องการศึกษา โดยใช้ปริมาตรที่แสดงในตารางที่ 3.3, 3.4 และ 3.5 และปรับปริมาตรด้วยน้ำ MilliQ

**ตารางที่ 3.3** การเตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตต่อการเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

ปริมาณสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารละลายอนุภาคนาโน ของเงินทรงกลม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)
3	1	10
4	1	10
5	1	10
6	1	10

**ตารางที่ 3.4** การเตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินทรงกลมต่อการเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

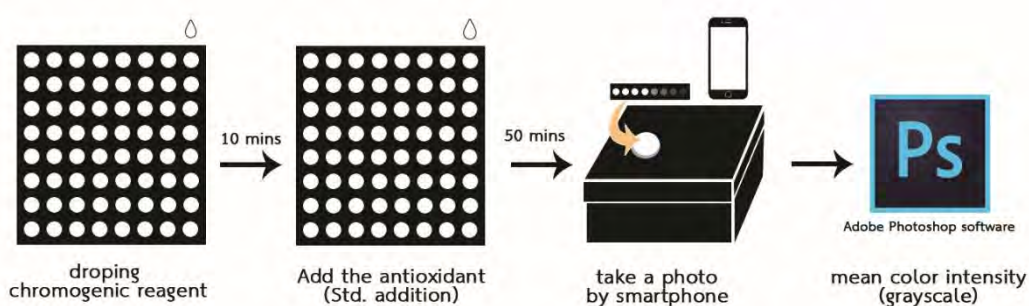
ปริมาณสารละลายอนุภาคนาโน ของเงินทรงกลม (ไมโครลิตร)	ปริมาณสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)
160	5	10
200	5	10
240	5	10
390	5	10
630	5	10

**ตารางที่ 3.5** การเตรียมรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่นต่อการเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

ปริมาณสารละลายอนุภาคนาโน ของเงินแบบแผ่น (ไมโครลิตร)	ปริมาณสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)
20	5	10
30	5	10
40	5	10
50	5	10

### 3.7.2 การใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

1. หยดรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี (Chromogenic Reagent, CR) ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณทดสอบของอุปกรณ์ฐานกระดาษ จากนั้นรอให้แห้ง 10 นาที
2. จากนั้นหยดสารละลายมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาตรที่ต้องการ ลงบนบริเวณทดสอบของอุปกรณ์ฐานกระดาษ ทิ้งไว้ในระยะเวลาที่เหมาะสม
3. นำไปถ่ายภาพด้วยกล้องสมาร์ทโฟนในกล่องควบคุมแสง
4. นำภาพที่ถ่ายไปหาค่าความเข้มของสีที่เปลี่ยนแปลงด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop ตามหัวข้อ 3.6



รูปที่ 3.8 การใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

### 3.7.3 การศึกษาผลของตัวแปรต่อการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

ทำศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยตัวแปรและช่วงที่ทำการศึกษาแสดงดังในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ตัวแปรและช่วงของการศึกษาในการพัฒนาวิธีการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

ตัวแปร	ช่วงของการตรวจวัด
ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรต	3-6 มิลลิโมลาร์
ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินทรงกลม	1.5-6.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่น	1.5-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง	5-15 ไมโครลิตร
เวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัด	10-60 นาที

### 3.7.4 การศึกษาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

ในการทดลองนี้ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ 2 ชนิด คือ กรดแอสคอร์บิก และกรดแกลลิก เพื่อเป็นสารมาตรฐานในการตรวจหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง

โดยทั่วไปการรายงานปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมักรายงานเป็นหน่วยเทียบเท่าของกรดแกลลิก (gallic acid equivalents, GAE) หรือ หน่วยเทียบเท่าของโทรลอกซ์ (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) แต่เนื่องจากสารเคมีทั้งกรดแกลลิกและโทรลอกซ์มีราคาแพง ผู้วิจัยจึงสนใจใช้กรดแอสคอร์บิกซึ่งเป็นหนึ่งในสารต้านอนุมูลอิสระที่หาง่ายและมีราคาถูกกว่าสารทั้งสองชนิดข้างต้น เพื่อเป็นสารมาตรฐานในการรายงานค่าของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงทดสอบวิเคราะห์กรดแกลลิกและกรดแอสคอร์บิกด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 1.00 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารมาตรฐานกับสีที่เปลี่ยนไประหว่างกรดแอสคอร์บิกและกรดแกลลิกบนอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ออกแบบขึ้น

### 3.7.5 การศึกษาผลของตัวרבกววน

สารที่อาจรบกวนการวิเคราะห์และที่อาจพบได้ในตัวอย่างเครื่องดื่ม คือ สารที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ ซึ่งในเครื่องดื่มส่วนใหญ่ที่พบคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ ในการศึกษานี้ทำการทดลองโดยดูผลการเปลี่ยนแปลงสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อใช้ทดสอบน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 โมลาร์ และทดสอบเปรียบเทียบกับบริเวณควบคุมที่ใช้ น้ำ MilliQ ทดสอบ โดยถ่ายรูปเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นโหมดสีเทาและหาความเฉลี่ยความเข้มของสี และคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยสีที่เปลี่ยนแปลงไป

### 3.7.6 การตรวจหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเครื่องดื่ม

ทำการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเครื่องดื่มที่เตรียมจากตัวอย่างชาเขียวญี่ปุ่นยี่ห้อ เซน ชาดำ และชาเอลส์เกรย์ยี่ห้อ Twinings

#### วิธีเตรียมสารเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งใบชาแห้งน้ำหนักประมาณ 0.30 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. เทน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในใบชาที่ชั่งไว้ คนสารละลายเล็กน้อย และทิ้งไว้ 10 นาที
3. นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง และเจือจางสารละลาย 10 เท่า ด้วยน้ำ MilliQ
4. นำตัวอย่างเครื่องดื่มชาที่เตรียมได้ไปหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระตามหัวข้อ 3.7.2 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากการใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน

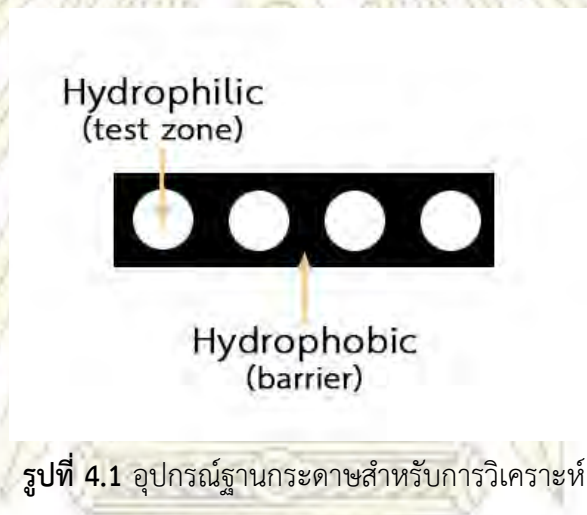


## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 การออกแบบอุปกรณ์ฐานกระดาษ

ได้ออกแบบอุปกรณ์ฐานกระดาษที่สามารถใช้งานได้ง่าย สะดวกในการนำไปใช้ และมีต้นทุนต่ำ ซึ่งอุปกรณ์กระดาษประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ บริเวณที่ชอบน้ำ และบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ โดยบริเวณที่ชอบน้ำเป็นบริเวณสำหรับทดสอบ (test zone) ที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีกับสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารตัวอย่าง โดยสารตัวอย่างจะไหลด้วยแรงแคปิลลารีจนเต็มบริเวณทดสอบ ในขณะที่บริเวณที่ไม่ชอบน้ำเป็นบริเวณสำหรับควบคุมปริมาณสารละลายไม่ให้ไหลออกนอกบริเวณที่ทำการทดสอบ ซึ่งทำการเตรียมส่วนนี้ด้วยการระบายด้วยดินสอเทียนและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ซึ่งเป็นเงื่อนไขที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกระดาษกรองเบอร์หนึ่ง นั่นคือ แวกซ์ซึมลงไปสู่ด้านหลังของกระดาษและไม่ล้นออกมาบริเวณที่ต้องการทดสอบ อุปกรณ์ฐานกระดาษที่ออกแบบแสดงในรูปที่ 4.1



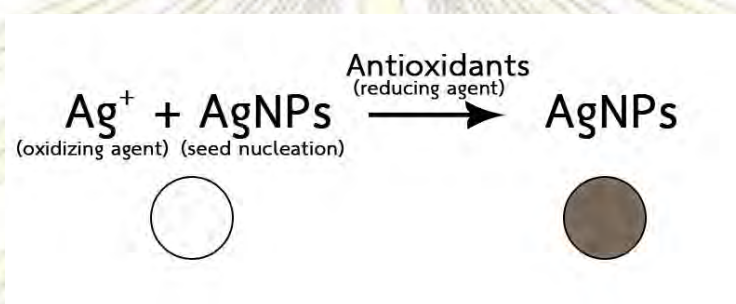
รูปที่ 4.1 อุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับการวิเคราะห์

#### 4.2 การใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดลอง ทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและไอออนของเงิน ( $Ag^+$ ) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี (chromogenic reagent) โดยไอออนของเงินทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วเกิดเป็นอนุภาคนาโนของโลหะเงิน (AgNPs) ซึ่งมีคุณสมบัติเชิงแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนเงินที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี โดยเริ่มจากการหยดรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีลงบนบริเวณทดสอบของอุปกรณ์ฐานกระดาษรอให้แห้ง แล้วหยดสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกและกรดแกลลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีที่เกิดขึ้นเนื่องจากเกิดอนุภาคนาโนของโลหะเงิน

เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ สารจะไหลด้วยแรงแคพิลลารีและมีปริมาตรตัวทำละลายต่ำ จึงอาจทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ดังกล่าวช้ากว่าปฏิกิริยาในสารละลาย นี้ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะตรึงอนุภาคนาโนของเงินส่วนหนึ่งไว้บนกระดาษเพื่อเป็นตัวเริ่มต้น (nucleation seeding) ให้อนุภาคนาโนของเงินที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยามาเกิดการรวมตัวและเกาะตัวเป็นกลุ่ม (aggregation) บนอนุภาคนาโนเงินเริ่มต้น ทำให้ได้อนุภาคนาโนของเงินที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม ส่งผลให้มีสีที่เปลี่ยนไปชัดเจนยิ่งขึ้น

ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงออกแบบให้รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีประกอบไปด้วยไอออนของเงินและอนุภาคนาโนของเงินตั้งต้น ซึ่งในที่นี้จะศึกษาทั้งอนุภาคนาโนเงินทรงกลมและอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่น เมื่อไอออนของเงินเกิดปฏิกิริยารีดักชันเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระ จะกลายเป็นโลหะเงินเกาะรวมตัวบนอนุภาคนาโนของเงิน ส่งผลให้อนุภาคนาโนของเงินมีขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี แสดงดังรูปที่ 4.2































รูปที่ 4.2 กลไกการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ฐานกระดาษและสีของกระดาษทดสอบ

#### 4.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของซิลเวอร์ในเตรตที่เหมาะสม

ทำการทดลองศึกษาผลของความเข้มข้นของซิลเวอร์ในเตรต ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี โดยเลือกศึกษาที่ความเข้มข้น 3, 4, 5 และ 6 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่มีปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างเครื่องดื่มชา [6,8,10] โดยในการทดลองนี้ ควบคุมค่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินเริ่มต้นในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีไว้ที่ 3.85 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเปลี่ยนความเข้มข้นของซิลเวอร์ในเตรตในสารผสมให้แตกต่างกันออกไป จากนั้นนำกระดาษที่หยดรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีมาทดสอบกับสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0-1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเปรียบเทียบสีและหาค่าความเข้มของสีที่ให้ความเข้มที่ดีที่สุด ซึ่งอุปกรณ์กระดาษเปลี่ยนจากสีขาวดั้งเดิมของกระดาษเป็นสีเหลือง สีน้ำตาลเข้ม จนกระทั่งถึงสีเทา ตามความเข้มข้นของแอสคอร์บิกที่มากขึ้น จากนั้นสังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงและทำการสแกนรูปของอุปกรณ์ฐานกระดาษด้วยเครื่องสแกนเนอร์ ทำการเปลี่ยนภาพให้อยู่ในโหมดระดับสีเทา เนื่องจากสีเหลือง สีน้ำตาล และสีเทาอยู่คนละเฉดสี ดังนั้น การเปรียบเทียบสีจึงต้องเปลี่ยนโหมดภาพจาก RGB

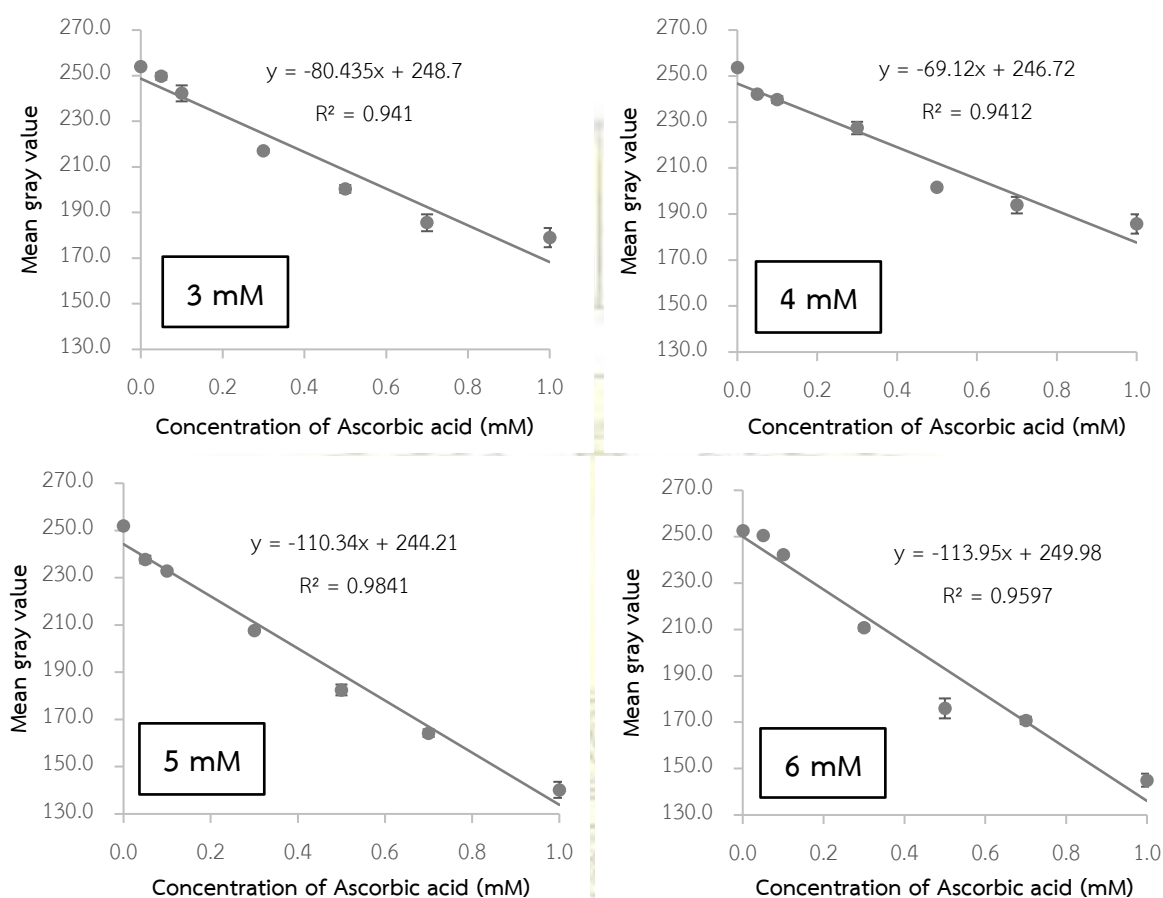
เป็นไหมระดับสีเทา เพื่อให้การเปรียบเทียบความเข้มของสีมีความถูกต้องมากที่สุด โดยสีที่เข้มมากจะ  
ให้ค่าเฉลี่ยความเข้มสีในไหมระดับสีเทา (mean gray value) ที่ต่ำ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1  
และรูปที่ 4.3

**ตารางที่ 4.1** ผลของความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีบนอุปกรณ์ฐาน  
กระดาษต่อการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อทดสอบกับกรดแอสคอร์บิก

ความเข้มข้นของ สารละลาย $\text{AgNO}_3$ (mM)	ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (mM) และความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ						
	0.00	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	1.00
3	 [253.9±0.2]	 [249.7±1.5]	 [242.2±3.5]	 [217.1±0.8]	 [200.4±1.7]	 [185.5±3.7]	 [179.0±4.2]
4	 [253.6±0.1]	 [242.0±0.6]	 [239.7±1.5]	 [227.4±2.7]	 [201.5±0.9]	 [193.9±3.6]	 [185.7±4.0]
5	 [252.0±0.1]	 [237.7±1.6]	 [232.8±0.9]	 [207.6±0.7]	 [182.5±2.3]	 [164.2±1.6]	 [140.2±3.4]
6	 [252.6±0.4]	 [250.6±0.6]	 [242.2±0.7]	 [210.7±1.2]	 [175.9±4.3]	 [170.8±1.6]	 [145.0±2.8]

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ








































**รูปที่ 4.3** กราฟแสดงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตต่างกัน

จากตารางที่ 4.1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากระดาษที่เตรียมจากรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่มีความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเท่ากับ 5.0 มิลลิโมลาร์ ให้สีที่มีความเข้มมากที่สุดเมื่อทดสอบกับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งสังเกตได้จากความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษที่เปลี่ยนแปลงไปในตารางที่ 4.1 เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีโหมดสีเทาและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก จะเห็นว่ากราฟจากความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตเท่ากับ 5.0 มิลลิโมลาร์ มีแนวโน้มของการเปลี่ยนสีที่ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า  $R^2$  ที่ใกล้ 1 มากที่สุด และมีความชันสูง แสดงว่าสีที่เปลี่ยนแปลงไปมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก และมีความไวต่อการวิเคราะห์ (sensitivity) ที่ดีที่สุดด้วย

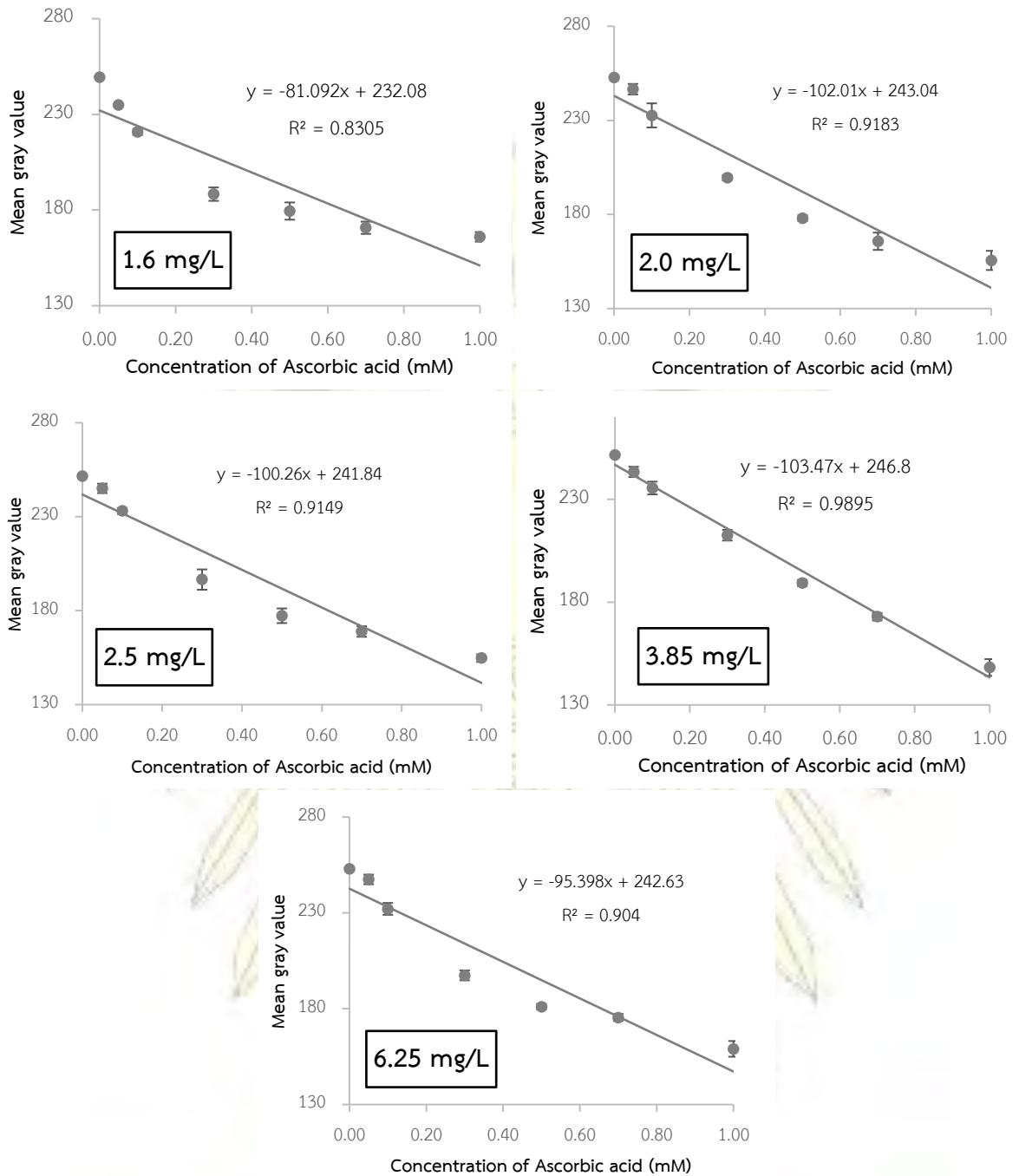
#### 4.2.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินทรงกลมที่เหมาะสม

ทำการทดลองศึกษาผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินทรงกลม (AgNPs) ของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี ซึ่งทำหน้าที่เป็นอนุภาคตั้งต้นที่ถูกตรึงไว้บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ โดยเลือกศึกษาที่ความเข้มข้นในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี เท่ากับ 1.6, 2.0, 2.5, 3.85 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำการทดลองโดยควบคุมค่าความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับเปลี่ยนปริมาณของสารละลายอนุภาคนาโนของเงินทรงกลม (ตามตารางที่ 3.8) จากนั้นทดสอบกับสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.0-1.0 มิลลิโมลาร์ สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงและทำการสแกนรูปของอุปกรณ์ฐานกระดาษด้วยเครื่องสแกนเนอร์ ทำการเปลี่ยนภาพให้อยู่ในโหมดระดับสีเทา เพื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มของสีที่ให้ความเข้มที่ดีที่สุด โดยสีที่เข้มมากจะให้ค่าเฉลี่ยความเข้มสีในโหมดระดับสีเทาดำ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปภาพที่ 4.4

**ตารางที่ 4.2** ผลของความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนของเงินทรงกลมในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษต่อการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อทดสอบกับกรดแอสคอร์บิก

ความเข้มข้นของ สารละลาย AgNPs (mg/L)	ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (mM) และความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ						
	0.00	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	1.00
1.6	 [249.4±0.2]	 [235.0±0.5]	 [220.8±1.6]	 [188.3±3.5]	 [179.8±4.5]	 [170.8±3.2]	 [166.0±2.5]
2.0	 [252.8±0.3]	 [246.6±2.8]	 [232.7±6.4]	 [199.5±1.4]	 [178.1±1.5]	 [165.8±4.6]	 [155.6±5.1]
2.5	 [251.5±0.2]	 [245.1±2.5]	 [233.1±1.6]	 [196.6±5.4]	 [177.3±3.9]	 [168.9±2.8]	 [154.8±2.0]
3.85	 [251.6±0.1]	 [243.3±0.5]	 [235.5±1.6]	 [212.6±2.5]	 [189.3±4.3]	 [172.9±1.2]	 [148.2±3.2]
6.25	 [253.1±0.4]	 [247.5±2.5]	 [232.1±3.1]	 [197.4±2.6]	 [181.0±1.5]	 [175.5±1.8]	 [159.1±4.1]

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ



**รูปที่ 4.4** กราฟแสดงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินทรงกลมต่างกัน





























จากตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าค่าเฉลี่ยของสีที่ต่ำที่สุดคือ ที่ความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนของเงินเท่ากับ 3.85 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตได้จากสีที่เปลี่ยนแปลงบนอุปกรณ์ฐานกระดาษสามารถแยกออกด้วยตาเปล่าได้ทุกระดับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีโหมดสีเทาและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ดังแสดงในรูปที่ 4.4 จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนเงินเท่ากับ 3.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แนวโน้มที่เป็นเส้นตรงที่สุด

เนื่องจากมีค่า  $R^2$  ที่ใกล้เคียง 1 มากที่สุด และมีความชันสูง จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี

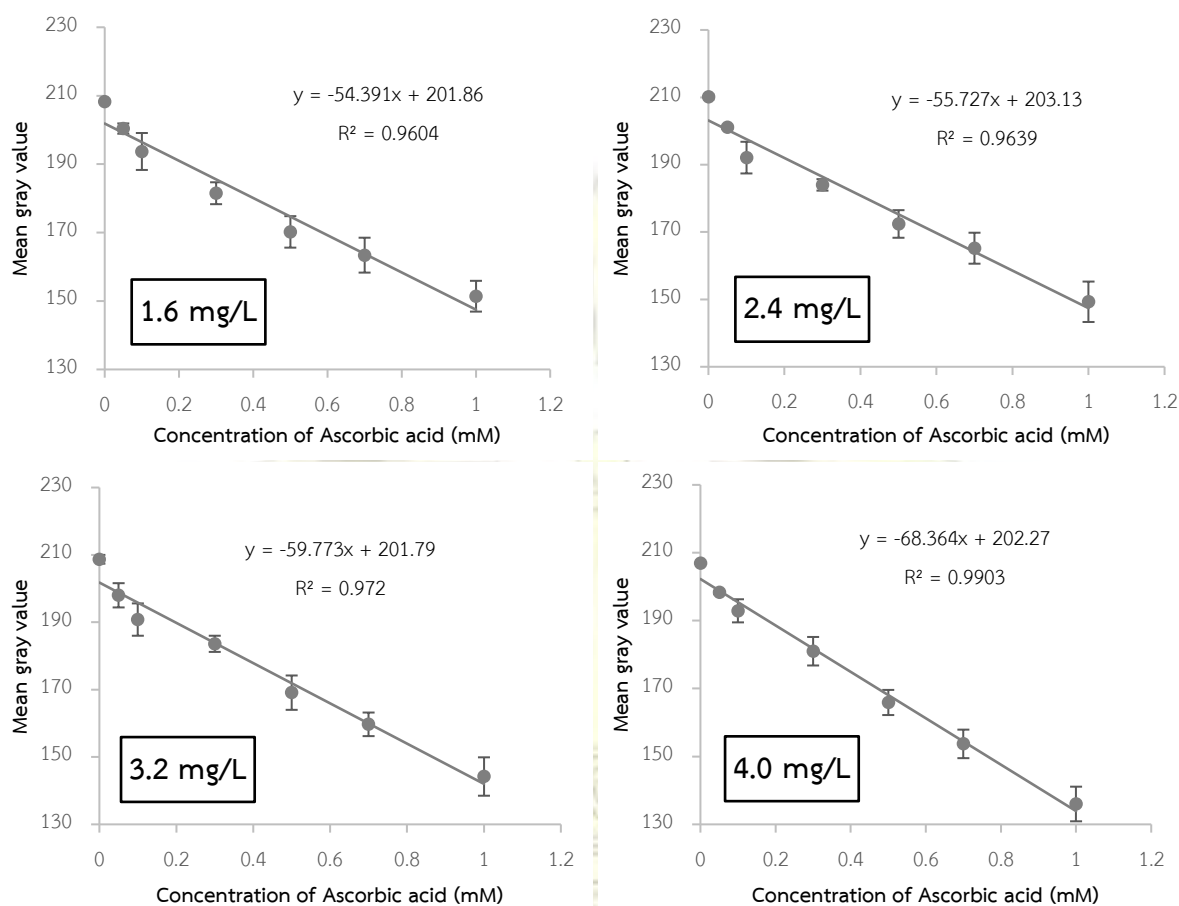
#### 4.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นที่เหมาะสม

ทดลองใช้อนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่น (AgNPLs) ชนิดที่มีสีน้ำเงินเข้ม ทำหน้าที่เป็นอนุภาคตั้งต้นในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ถูกตรึงบนอุปกรณ์ฐานกระดาษเช่นเดียวกับอนุภาคนาโนเงินทรงกลม โดยเลือกศึกษาที่ความเข้มข้น 1.6, 2.4, 3.2 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของอนุภาคนาโนเงินทรงกลม โดยควบคุมค่าความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตให้เท่ากับ 5.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับเปลี่ยนปริมาณของสารละลายอนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่น (ตารางที่ 3.9) จากนั้นทดสอบกับสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.0-1.0 มิลลิโมลาร์ ทำการถ่ายภาพอุปกรณ์ฐานกระดาษด้วยสมาร์ทโฟนในกล่องควบคุมแสง ทำการเปลี่ยนภาพให้อยู่ในโหมดระดับสีเทา เพื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มของสีที่ให้ความเข้มที่ดีที่สุด โดยสีที่เข้มมากจะให้ค่าเฉลี่ยความเข้มสีในโหมดระดับสีเทาดำ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปภาพที่ 4.5

**ตารางที่ 4.3** ผลของความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่นบนอุปกรณ์ฐานกระดาษต่อการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อทดสอบกับกรดแอสคอร์บิก

ความเข้มข้นของ สารละลาย AgNPLs (mg/L)	ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (mM) และความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ						
	0.00	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	1.00
1.6	 [208.3±0.5]	 [200.4±1.5]	 [193.7±5.4]	 [181.5±3.2]	 [170.2±4.6]	 [163.4±5.1]	 [151.4±4.5]
2.4	 [210.1±0.7]	 [201.1±0.5]	 [192.1±4.7]	 [184.0±1.7]	 [172.4±4.1]	 [165.2±4.6]	 [149.3±6.0]
3.2	 [208.7±1.3]	 [198.0±3.6]	 [190.8±4.8]	 [183.6±2.4]	 [169.1±5.1]	 [159.7±3.5]	 [144.2±5.7]
4.0	 [209.0±0.2]	 [196.0±0.5]	 [190.4±3.4]	 [181.0±4.2]	 [164.1±3.7]	 [152.9±4.2]	 [136.0±5.1]

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นต่างกัน

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.5 จะสังเกตเห็นว่า การทดสอบสารละลายแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้นต่ำ 0.05-0.30 มิลลิโมลาร์ อุปกรณ์ฐานกระดาษให้สีที่ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แม้จะมีการเปลี่ยนความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่นในช่วงที่ศึกษา ในขณะที่ในการวิเคราะห์สารละลายแอสคอร์บิกความเข้มข้นสูง ตั้งแต่ 0.50 มิลลิโมลาร์ เป็นต้นไป จะสังเกตเห็นว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้สีที่เข้มกว่าการใช้สารละลายอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นที่มีความเข้มข้นอื่น และเมื่อนำผลการทดลองมาสร้างกราฟเพื่อดูความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยความเข้มสีโหมดสีเท่ากับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้นอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นต่างกัน ยืนยันได้ว่ากราฟที่ให้แนวโน้มที่ดี มีความเป็นเส้นตรง และมีค่า  $R^2$  เข้าใกล้ 1 มากที่สุดคือ กราฟผลการทดลองที่ได้จากการใช้สารละลายอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งให้ความชันกราฟเส้นตรงที่สูงสุด นอกจากนี้ไม่ได้ทำการทดลองใช้สารละลายอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากทำให้สารละลายรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีเริ่มมีสีตั้งต้นที่เข้มข้น และสีเริ่มต้นของการวิเคราะห์บนอุปกรณ์กระดาษมีสีน้ำเงินเจือปน

ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อเกิดปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกได้ยากขึ้น ดังนั้น จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี

จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.2.1-4.2.3 ข้างต้น ทำให้ได้เงื่อนไขที่ดีที่สุดของความเข้มข้นของส่วนประกอบของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี โดยแบ่งเป็น 2 ระบบ ดังนี้

ระบบที่ 1 รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีประกอบด้วยไอออนของเงินและอนุภาคนาโนเงินทรงกลมเป็นอนุภาคตั้งต้น (AgNPs/AgNO<sub>3</sub> chromogenic reagent) ใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่มีความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์และสารละลายอนุภาคนาโนของเงินทรงกลมที่มีความเข้มข้น 3.85 มิลลิกรัมต่อลิตร

ระบบที่ 2 รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีประกอบด้วยไอออนของเงินและอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นเป็นอนุภาคตั้งต้น (AgNPs/AgNO<sub>3</sub> chromogenic reagent) ใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่มีความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์และสารละลายอนุภาคนาโนของเงินแบบแผ่นที่มีความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร





























#### 4.2.4 ผลของเวลาที่ใช้ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ

ทำการศึกษาผลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงสี เพื่อให้ได้เวลาที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ โดยศึกษาที่ระยะเวลา 15, 30, 40 และ 50 นาที โดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษที่ใช้รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีประกอบด้วยไอออนของเงินและอนุภาคนาโนทรงกลมเป็นอนุภาคตั้งต้น ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิกในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ปริมาตรสารละลายกรดแอสคอร์บิก 10 ไมโครลิตร สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงและถ่ายรูปอุปกรณ์ฐานกระดาษในกล่องควบคุมแสงที่เวลาต่าง ๆ หลังจากให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีและกรดแอสคอร์บิก ซึ่งรูปถ่ายจะถูกเปลี่ยนเป็นเฉดสีเทาและวัดค่าเฉลี่ยระดับสีเทา ดังแสดงในตารางที่ 4.4

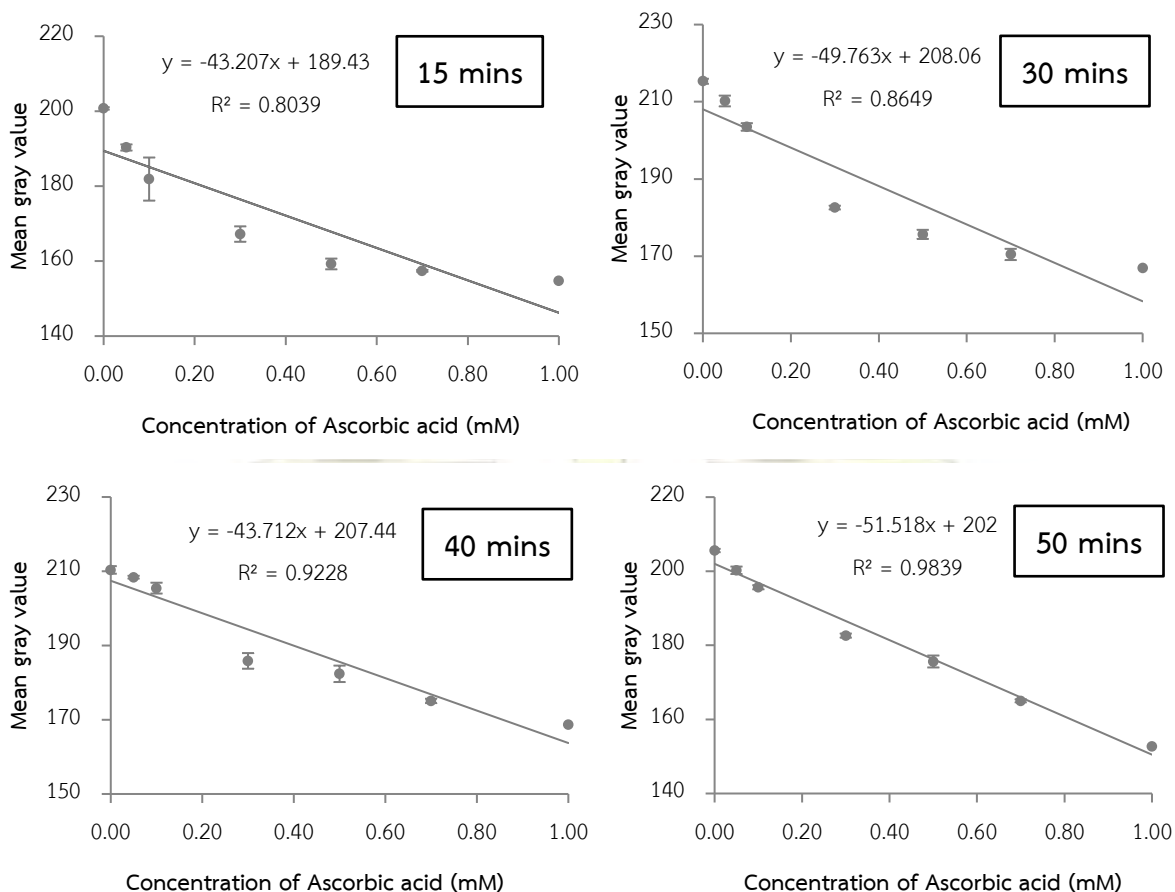
จากการทดลองพบว่าที่เวลา 15 นาที อุปกรณ์ฐานกระดาษเริ่มแห้งและสีที่เปลี่ยนแปลงในช่วงความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกช่วงความเข้มข้นสูง (0.30-1.00 มิลลิโมลาร์) ไม่มีความแตกต่างกันเนื่องจากปฏิกิริยารีดอกซ์ยังเกิดไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสีได้ เมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 30 และ 40 นาที พบว่ามีความแตกต่างของความเข้มสีของกระดาษในช่วงความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกสูง และเห็นการเปลี่ยนสีที่ชัดเจน โดยอุปกรณ์ฐานกระดาษแสดงสีที่ต่างกันตามความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกเมื่อให้เวลาทำปฏิกิริยา 50 นาที ซึ่งเมื่อให้เวลานานกว่านี้สีของกระดาษเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แสดงว่าปฏิกิริยารีดอกซ์เกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว เมื่อนำผลการทดลองมาสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับค่าเฉลี่ยของสีเมื่อทดสอบบนอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ผลการทดลองยืนยันว่าที่เวลา 50 นาที กราฟมีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด นั่นคือ ค่า R<sup>2</sup> เข้าใกล้

1 มากที่สุด ในการทดลองนี้จึงเลือกระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ  
ที่ 50 นาที

**ตารางที่ 4.4** การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีเมื่อทดสอบกรดแอสคอร์บิกด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษในระยะเวลาที่  
แตกต่างกัน

ระยะเวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (mM) และความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ						
	0.00	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	1.00
15	 [200.7±0.6]	 [190.3±0.3]	 [181.8±0.8]	 [167.2±5.7]	 [159.2±2.0]	 [157.3±1.4]	 [154.7±0.2]
30	 [215.3±2.3]	 [210.2±0.6]	 [203.4±1.3]	 [182.5±0.9]	 [175.6±0.4]	 [170.4±1.1]	 [166.9±1.4]
40	 [210.3±0.9]	 [208.4±1.0]	 [205.4±0.3]	 [185.8±1.4]	 [182.3±2.1]	 [175.0±2.2]	 [168.7±0.5]
50	 [205.5±0.7]	 [200.2±0.4]	 [195.6±1.0]	 [182.6±0.5]	 [175.6±0.5]	 [165.0±1.6]	 [152.6±0.4]

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกเมื่อทดสอบกับอุปกรณ์ฐานกระดาษในระยะเวลาที่แตกต่างกัน






















#### 4.2.5 ผลของปริมาตรสารละลายตัวอย่างต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มสี

ศึกษาผลของปริมาตรสารละลายตัวอย่างเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ โดยทำการทดลองหยดรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีลงในบริเวณทดสอบ 5.0 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรที่กระจายอยู่บนบริเวณทดสอบของอุปกรณ์กระดาษพอติ จากนั้น ปรับเปลี่ยนปริมาตรของสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ใช้ทดสอบเป็น 5.0, 10.0 และ 15.0 ไมโครลิตร กล่าวคือ เมื่อปริมาตรของสารละลายกรดแอสคอร์บิกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้จำนวนโมลของกรดแอสคอร์บิกเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยให้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 50 นาที จากนั้นสังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงและทำการสแกนรูปอุปกรณ์ฐานกระดาษด้วยสแกนเนอร์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 เมื่อใช้ปริมาตรของสารละลายกรดแอสคอร์บิก 5.0 ไมโครลิตร พบว่าการเปลี่ยนแปลงของสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษเกิดขึ้นแบบไม่ชัดเจนที่ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกต่ำ ๆ (0.05-0.10 มิลลิโมลาร์) เมื่อเพิ่มปริมาตรเป็น 10.0 และ 15.0 ไมโครลิตร ทำให้สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีในช่วงความเข้มข้นต่ำของกรดแอสคอร์บิกได้ แต่ที่ 15.00 ไมโครลิตร ส่งผลให้สีที่เปลี่ยนแปลงบนอุปกรณ์กระดาษในช่วงความเข้มข้น 0.50-1.00 มิลลิโมลาร์ มีสีที่ใกล้เคียงกันและแยก

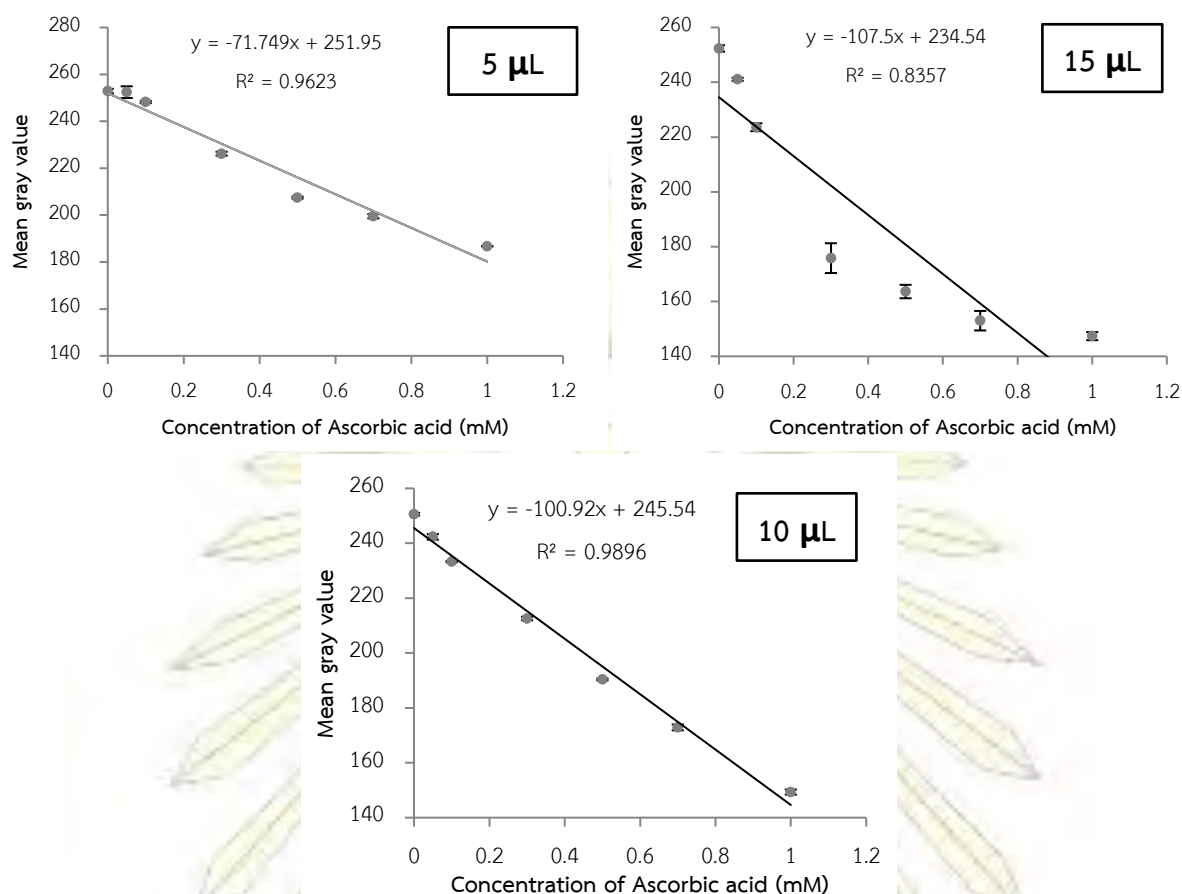


ความแตกต่างได้ยาก การเลือกใช้สารละลายกรดแอสคอร์บิกปริมาตร 10.0 ไมโครลิตร จึงมีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถให้การเปลี่ยนแปลงสีบนอุปกรณ์กระดาษที่แตกต่างกันในช่วงความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก 0.0–1.0 มิลลิโมลาร์ ทำให้ใช้งานครอบคลุมการตรวจวัดได้ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง และเมื่อสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิกกับค่าเฉลี่ยความเข้มสีระดับสีเทา ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่า เมื่อใช้ปริมาตรเท่ากับ 10.0 ไมโครลิตร จะได้กราฟที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่มีค่า  $R^2$  เข้าใกล้ 1 มากที่สุด ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงเลือกใช้ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง 10.0 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

**ตารางที่ 4.5** การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีเมื่อใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษตรวจวัดกรดแอสคอร์บิก ในปริมาตรที่แตกต่างกัน

ปริมาตร สารละลายกรด แอสคอร์บิก ( $\mu\text{L}$ )	ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (mM) และความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ						
	0.00	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	1.00
5	 [252.9±1.0]	 [252.4±2.4]	 [248.2±0.4]	 [226.1±0.8]	 [207.5±0.4]	 [199.6±0.9]	 [186.7±0.1]
10	 [250.6±0.4]	 [242.3±1.0]	 [233.3±0.2]	 [212.5±0.6]	 [190.3±0.3]	 [172.9 ±1.0]	 [149.3±0.9]
15	 [252.3±1.1]	 [241.0±0.5]	 [223.6±1.4]	 [175.8±5.4]	 [163.6±2.4]	 [153.0±3.5]	 [147.4±1.4]

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษกับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่ทดสอบโดยใช้ปริมาตรสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่แตกต่างกัน

























#### 4.2.6 ผลของชนิดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

ในการทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ส่วนใหญ่ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และรายงานปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับปริมาณกรดแกลลิก แต่สารชนิดนี้มีราคาสูง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกกรดแอสคอร์บิกซึ่งเป็นหนึ่งในสารต้านอนุมูลอิสระที่มีราคาถูก และมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับกรดแกลลิก เพื่อนำมาเป็นสารมาตรฐานในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิกกับกรดแกลลิก แล้วเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ ผลแสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นบนอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อเปรียบเทียบกับตาเปล่า และที่ปรับจากรูปถ่ายเป็นโหมดระดับสีเทา ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ ระหว่างการใช้สารมาตรฐานเป็นกรดแกลลิกและกรดแอสคอร์บิก ทั้งในระบบที่ใช้รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ใช้อนุภาคนาโนเงินทรงกลม และใช้อนุภาคนาโนเงินแบบแผ่น เมื่อนำผลการทดลองไปสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มของสีที่เปลี่ยนแปลงไปกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระ (กรด

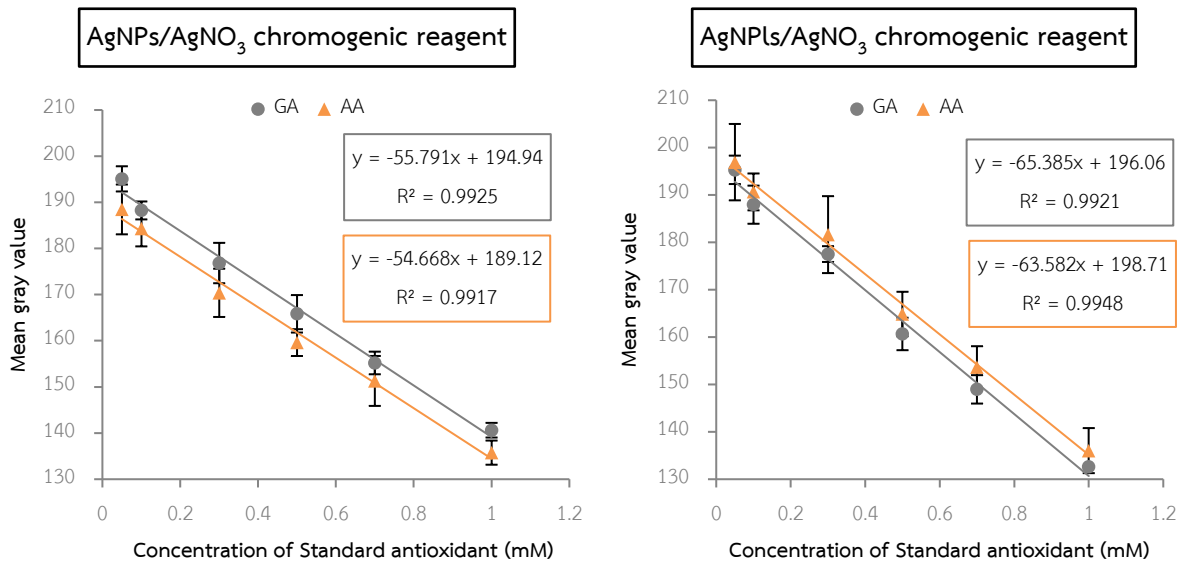
แกลลิกและกรดแอสคอร์บิก) ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.8 จะเห็นว่า จากผลการทดลองที่ได้จากทั้งสองระบบปริเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี กราฟมาตรฐานที่ได้เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.05-1.00 มิลลิโมลาร์ และกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกและกรดแอสคอร์บิกมีความชันที่ใกล้เคียงกัน และมีค่าเฉลี่ยความเข้มของสีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ กล่าวคือ ค่าเฉลี่ยความเข้มสีจากกรดแอสคอร์บิกสามารถแทนค่าเฉลี่ยความเข้มสีจากกรดแกลลิกได้

ดังนั้น กรดแอสคอร์บิกจึงสามารถเป็นตัวแทนของสารมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษในการทดลองนี้ได้

**ตารางที่ 4.6** การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อใช้วิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและกรดแกลลิก

ชนิดของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี	ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (mM) และความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ					
	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	1.00
AgNPs/AgNO <sub>3</sub>	 [188.5±1.8]	 [184.3±1.3]	 [170.4±1.7]	 [159.6±0.9]	 [151.3±1.8]	 [135.8±0.8]
AgNPLs/AgNO <sub>3</sub>	 [196.9±2.9]	 [190.6±1.3]	 [181.6±2.7]	 [164.9±1.5]	 [153.7±1.4]	 [136.0±1.5]
ชนิดของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี	ความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิก (mM) และความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ					
	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	1.00
AgNPs/AgNO <sub>3</sub>	 [195.1±0.9]	 [188.2±0.6]	 [176.8±1.4]	 [165.8±1.3]	 [155.2±0.8]	 [140.6±0.5]
AgNPLs/AgNO <sub>3</sub>	 [195.3±0.5]	 [187.9±1.0]	 [177.5±1.3]	 [160.6±0.5]	 [148.9±1.1]	 [132.6±1.0]

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและกรดแกลลิก ด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ

### 4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด

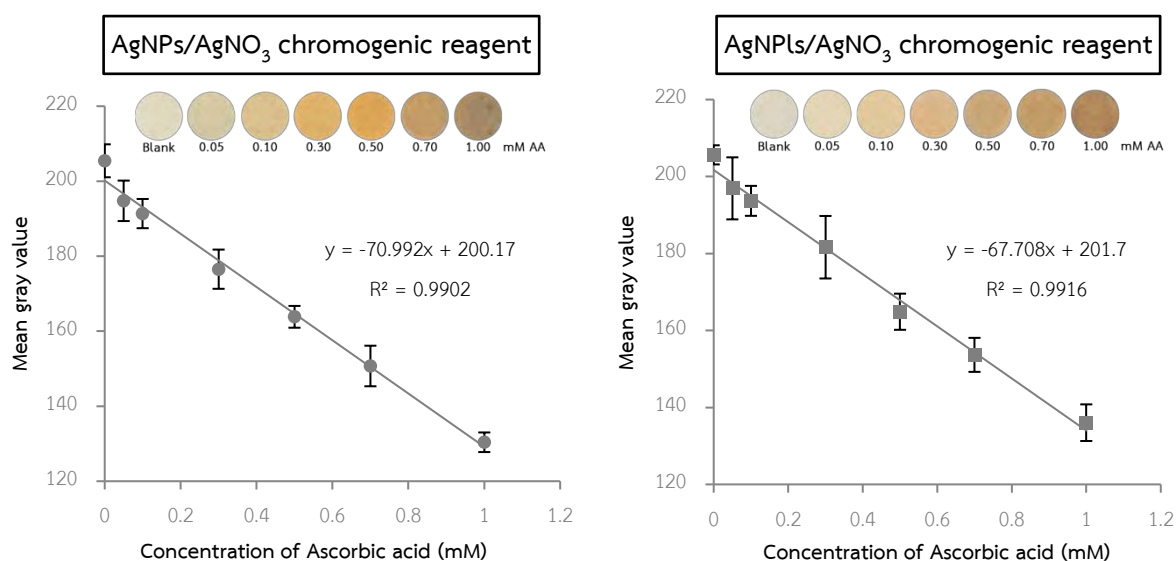
#### 4.3.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มสีในโหมดระดับสีเทา (mean gray value) ของภาพถ่ายของอุปกรณ์ฐานกระดาษ ที่ใช้ทดสอบสารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.0-1.0 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 4.7) กับความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิกเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีบนอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อใช้วิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

ชนิดของรีเอเจนต์	ความเข้มสีที่เปลี่ยนไปเมื่อทดสอบกับสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น (mM)							
	ที่ก่อให้เกิดสี	0.00	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70	1.00
AgNPs/AgNO <sub>3</sub>								
	[207.4±0.4]	[188.4±1.8]	[184.3±1.3]	[170.3±1.7]	[159.6±0.9]	[151.2±1.8]	[135.7±0.8]	
AgNPLs/AgNO <sub>3</sub>								
	[205.6±0.3]	[196.9±2.9]	[193.6±1.3]	[181.6±2.7]	[164.8±1.5]	[153.6±1.4]	[136.0±1.5]	

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษ

จากรูปที่ 4.9 ได้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกและค่าเฉลี่ยความเข้มสีในโหมดระดับสีเทา เมื่อทดสอบด้วยระบบรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ใช้อนุภาคนาโนเงินทรงกลมเป็นตัวตั้งเริ่มต้น ได้สมการเส้นตรงเป็น  $y = -70.992x + 200.17$  เมื่อ  $y$  คือ ความเฉลี่ยความเข้มสีระดับสีเทา และ  $x$  คือความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก หน่วย มิลลิโมลาร์ และมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9902 ในขณะที่ผลการทดสอบด้วยระบบรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ใช้อนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นเป็นตัวตั้งเริ่มต้น ได้สมการเส้นตรงเป็น  $y = -67.708x + 201.7$  เมื่อ  $y$  คือ ความเฉลี่ยความเข้มสี และ  $x$  คือความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก หน่วย มิลลิโมลาร์ และมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9916 เมื่อเปรียบเทียบความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้งสองระบบค่าของอุปกรณ์ฐานกระดาษพบว่า ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และจากค่า  $R^2$  ของเส้นตรงทั้งสองที่สร้างจากผลการทดลองที่ได้ แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง หรือความเป็นเส้นตรง (linearity) ที่ค่อนข้างดี ดังนั้นสามารถนำกราฟมาตรฐานจากทั้งสองระบบรีเอเจนต์ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระได้

#### 4.3.2 ขีดจำกัดของการตรวจวัด และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ

##### 1. ระบบของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ใช้อนุภาคนาโนเงินทรงกลมเป็นตัวตั้งเริ่มต้น

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มเฉลี่ยสีกับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ได้สมการ  $y = -70.992x + 200.17$

ความชันของกราฟมาตรฐาน = 70.992

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความเข้มข้น = 0.23

หาค่า LOD จากสูตร

$$\square\square\square = \frac{3 \times \square\square}{\square\square\square\square}$$

แทนค่าความชันและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในสมการ จะได้ LOD = 0.0097 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิก

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.0097 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิก

หาค่า LOQ จากสูตร

$$\square\square\square = \frac{10 \times \square\square}{\square\square\square\square}$$

แทนค่าความชันและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในสมการ จะได้ LOQ = 0.032 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิก

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดปริมาณและรายงานผลได้อย่างเป็นที่ยอมรับในความถูกต้อง เท่ากับ 0.032 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิก

## 2. ระบบของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ใช้อนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นเป็นตัวตั้งเริ่มต้น

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มเฉลี่ยสีกับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ได้สมการ  $y = -67.708x + 201.7$

ความชันของกราฟมาตรฐาน = 67.708

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยความเข้มสี = 0.26

หาค่า LOD จากสูตร

$$\square\square\square = \frac{3 \times \square\square}{\square\square\square\square}$$

แทนค่าความชันและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในสมการ จะได้ LOD = 0.0011 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิก

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.0011 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิก

หาค่า LOQ จากสูตร

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{Slope}}$$

แทนค่าความชันและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในสมการ จะได้ LOQ = 0.038 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิก

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดปริมาณและรายงานผลได้อย่างเป็นที่ยอมรับในความถูกต้อง 0.038 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิก

#### 4.3.3 ความแม่นยำ

การทดสอบความแม่นยำของการทดลองทำโดยเปรียบเทียบแนวโน้มของค่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดได้จากวิธีอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ออกแบบขึ้นกับวิธีตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระบนอุปกรณ์ฐานกระดาษโดยใช้ไอออนของโลหะทองแล้วเกิดเป็นอนุภาคนาโนของทอง จากงานวิจัยของ Dimosthenis และคณะ [6] ในการตรวจวัดในเครื่องตีมหาเขียว ชาดำ และชาเอิลล์เกรย์ แสดงค่าของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้ในแต่ละวิธีดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดได้

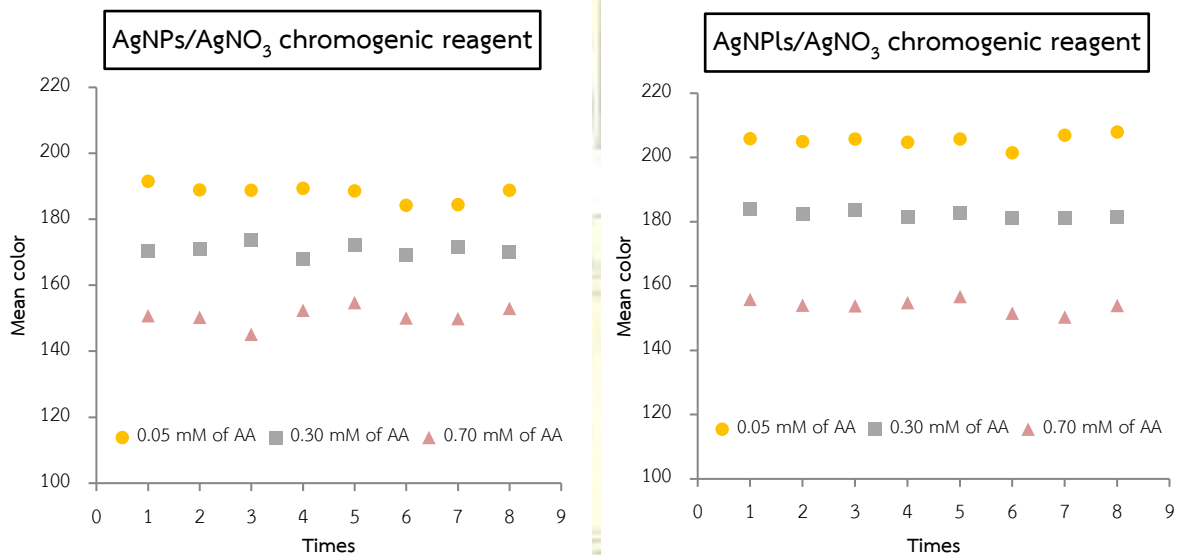
วิธีตรวจวัด	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดได้ (mgAA/g)		
	ชาเขียว	ชาดำ	ชาเอิลล์เกรย์
AgNPs/AgNO <sub>3</sub> paper-based	23.73	2.91	2.33
AgNPLs/AgNO <sub>3</sub> paper-based	26.00	2.98	2.21
AuNPs sensor paper-based [6]	20.50	3.01	2.17

จากผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจพบด้วยระบบอุปกรณ์ฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ มีค่าใกล้เคียงกับค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีรายงานในตัวอย่างชาชนิดเดียวกัน ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้น่าจะนำไปใช้วิเคราะห์ได้อย่างมีความแม่นยำ

#### 4.3.4 ความเที่ยง

การทดสอบความเที่ยงของการทดลองทำโดยตรวจวัดค่าความเข้มข้นของอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อนำมาตรวจวัดสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.05, 0.30 และ 0.70 มิลลิโมลาร์ โดยทำการ

วิเคราะห์สารละลายกรดแอสคอร์บิกที่แต่ละความเข้มข้นซ้ำ 8 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.9 ดังนี้



รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีของการทดสอบสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ทำการวิเคราะห์ซ้ำด้วยอุปกรณ์กระดาษ

ตารางที่ 4.9 ค่าความเข้มสีของสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.05, 0.30 และ 0.70 มิลลิโมลาร์

ชนิดของรีเอเจนต์ ที่ก่อให้เกิดสี	ความเข้มข้นของ กรดแอสคอร์บิก (mM)	Mean gray value	%RSD
AgNPs/AgNO <sub>3</sub>	0.05	188.8 ± 1.3	1.33
	0.30	170.7 ± 1.8	1.04
	0.70	150.5 ± 2.9	1.89
AgNPLs/AgNO <sub>3</sub>	0.05	205.7 ± 1.9	0.92
	0.30	182.0 ± 1.1	0.61
	0.70	153.9 ± 2.1	1.38

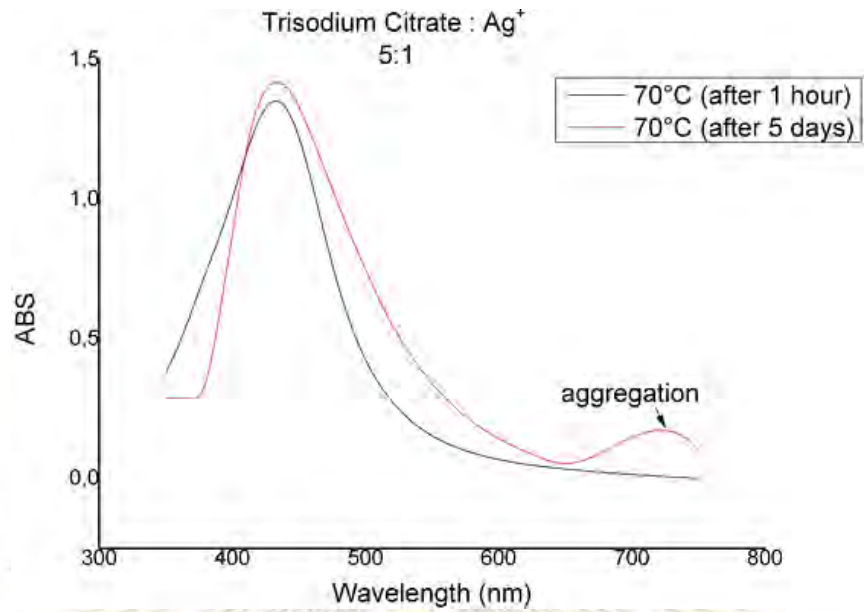
ผลการทดลองจากตารางที่ 4.9 พบว่าการวิเคราะห์สารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.05, 0.30 และ 0.70 มิลลิโมลาร์ ทั้งระบบที่ใช้รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่มีอนุภาคนาโนเงินทรงกลมและแบบแผ่นเป็นตัวตรึงเริ่มต้น มีค่า %RSD ต่ำกว่า 3.7 ที่ทุกความเข้มข้น นั่นคือ วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีอุปกรณ์ฐานกระดาษมีความเที่ยงที่ยอมรับได้ ตามมาตรฐานขององค์กร AOAC INTERNATIONAL [33]



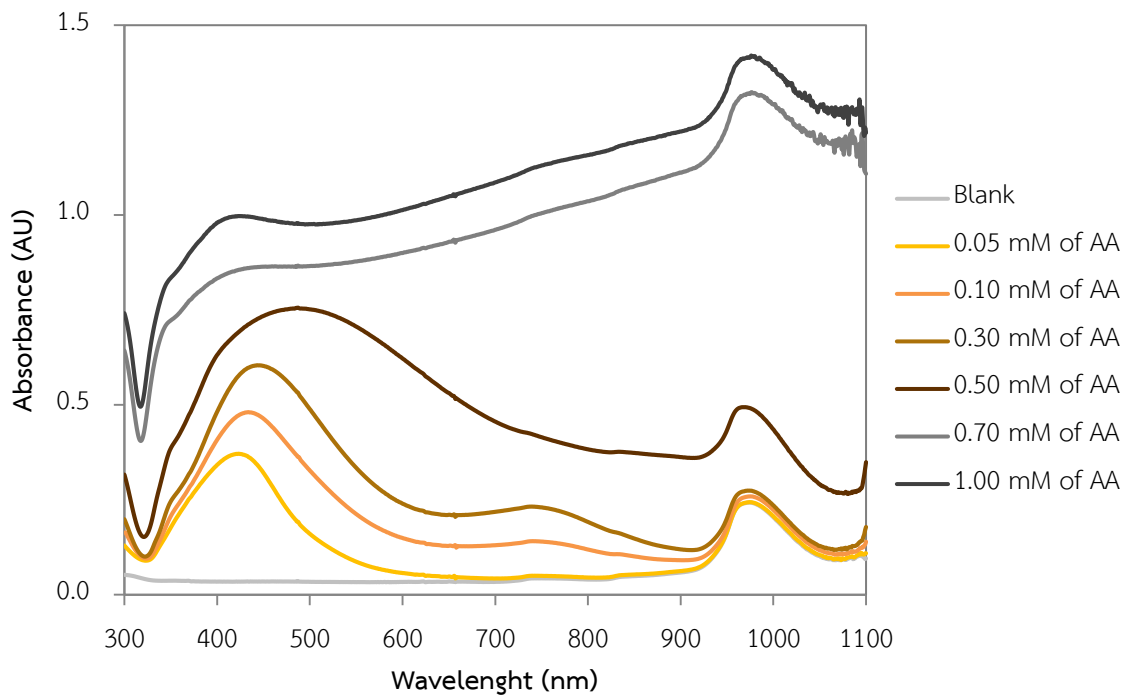
#### 4.4 การศึกษาการเกิดการรวมกลุ่มของอนุภาคนาโนเงินด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี

เพื่ออธิบายกลไกการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ใช้อนุภาคนาโนเงินและไอออนของเงิน ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารละลายรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ประกอบด้วยอนุภาคนาโนของเงินและไอออนของเงิน ก่อนและหลังการเติมกรดแอสคอร์บิก เพื่อติดตามการเกิดการรวมกลุ่ม (aggregation) หรือการเปลี่ยนขนาดอนุภาคให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากเกิดการตกตะกอนของโลหะเงินที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยารีดักชันของไอออนเงินด้วยกรดแอสคอร์บิก ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในช่วงความยาวคลื่น 300 ถึง 1,000 นาโนเมตร โดยนำรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีผสมกับสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.05-1.00 ในอัตราส่วน 1:2 และมี blank solution คือ รีเอเจนต์ในน้ำ MilliQ พบว่า

ระบบที่ใช้รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีโดยใช้อนุภาคนาโนเงินทรงกลมเป็นตัวตั้งเริ่มต้น แสดงสเปกตรัมดังรูปที่ 4.12 โดยปกติลักษณะของสเปกตรัมของสารละลายอนุภาคนาโนจะมีพีคมากกว่า 1 พีค [35] ตามสมบัติเชิงแสงในอนุภาคนาโน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.11 ในการทดลองนี้พบว่า สารละลายแบลงก์ไม่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นวิสิเบิล (400-700 นาโนเมตร) เนื่องจากเป็นสารละลายใสไม่มีสี และมีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 900-1,000 นาโนเมตรเล็กน้อย เนื่องจากรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีมีอนุภาคนาโนเงินเริ่มต้นอยู่ในปริมาณหนึ่ง เมื่อให้รีเอเจนต์เกิดปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกในช่วงความเข้มข้น 0.05-0.50 มิลลิโมลาร์ สารละลายกลายเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม สเปกตรัมมีช่วงการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 420-502 นาโนเมตร และมีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 900-1,000 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิกเป็น 0.70 และ 1.00 มิลลิโมลาร์ อนุภาคนาโนของเงินมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือเกิดการรวมตัวกันทำให้ขนาดใหญ่ขึ้นมาก สารละลายที่ได้มีสีเทาดำ และสเปกตรัมดูดกลืนแสงสูงขึ้นทั้งช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 425-1,000 นาโนเมตร ทุกเส้นสเปกตรัมมีพีคมีลักษณะกว้างขึ้นและสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกเพิ่มขึ้น นั่นคือ เมื่อไอออนเงินเกิดปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกได้โลหะเงิน ซึ่งจะรวมตัวกับอนุภาคนาโนของเงินตั้งต้น ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นหรือเกิดการรวมกลุ่มกัน

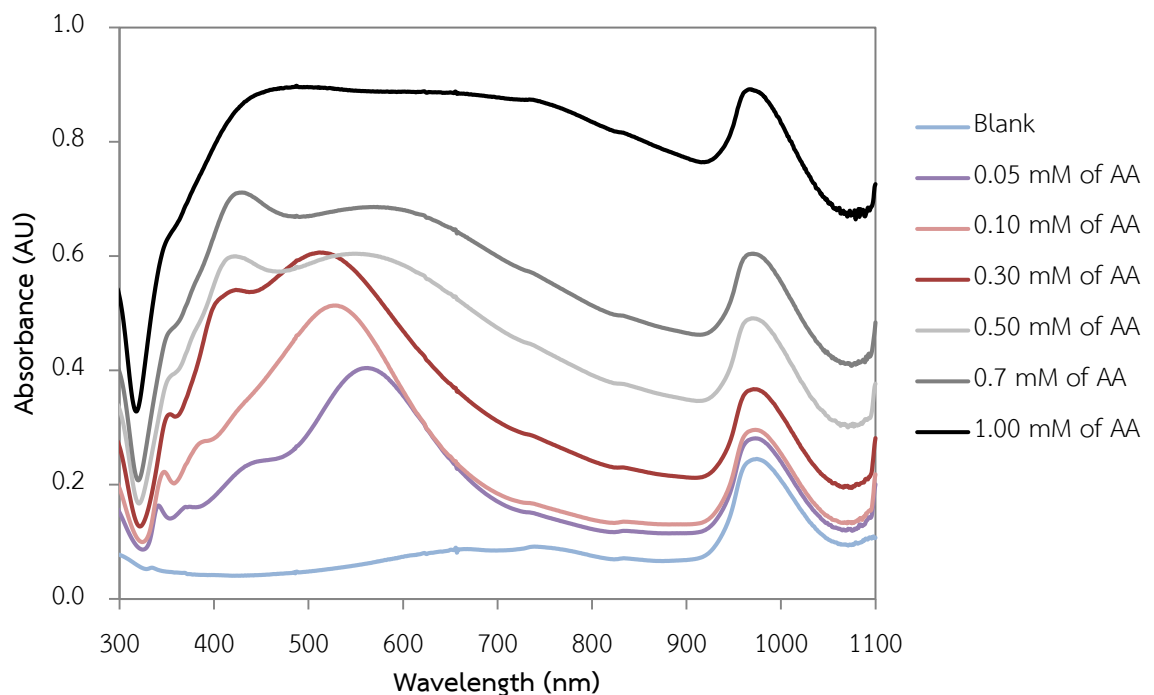


รูปที่ 4.11 ตัวอย่างลักษณะสเปกตรัมของสารละลายอนุภาคนาโนเงินที่เกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาคนาโน [35]



รูปที่ 4.12 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิด AgNPs/AgNO<sub>3</sub> กับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ระบบที่ใช้รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีโดยใช้อุณหภูมิเงินแบบแผ่นเป็นตัวตั้งเริ่มต้น แสดงสเปกตรัมดังรูปที่ 4.13 พบว่า สารละลายแบล็กซึ่งเป็นสารละลายไอสีฟ้าอ่อน มีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 700-800 นาโนเมตร และมีการดูดกลืนแสงเล็กน้อยที่ความยาวคลื่นช่วง 900-1,000 นาโนเมตร เมื่อให้รีเอเจนต์เกิดปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกในช่วงความเข้มข้น 0.05-0.30 มิลลิโมลาร์ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงเหลืองน้ำตาล สีชมพูเหลืองน้ำตาล และสีน้ำตาลแดงตามลำดับ สเปกตรัมมีการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 500-600 นาโนเมตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกเป็น 0.50-1.00 มิลลิโมลาร์ สเปกตรัมดูดกลืนแสงในช่วง 400-1,000 นาโนเมตร มีลักษณะสูงขึ้น เนื่องจากอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือเกิดการรวมตัวกัน ส่งผลให้สารละลายมีความขุ่นที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าและมีสีเทาเข้มขึ้นจนเกือบดำตามลำดับ ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกเพิ่มขึ้นสเปกตรัมมีการดูดกลืนแสงสูงขึ้น และมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงแบบ blue shift คือ สเปกตรัมการดูดกลืนแสงเลื่อนไปทางความยาวคลื่นที่ลดลง เนื่องจากอนุภาคนาโนของเงินเกิดการรวมตัวกันทำให้ขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้อนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นมีสีเปลี่ยนแปลงไป โดยในทุกสเปกตรัมมีการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 900-1,000 นาโนเมตร สูงขึ้นเป็นลำดับตามความเข้มข้นของแอสคอร์บิกที่เพิ่มขึ้น นั่นคือ เมื่อเกิดไอออนเงินปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกได้โลหะเงิน ซึ่งจะรวมตัวกับอนุภาคนาโนของเงินตั้งต้น ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นหรือเกิดการรวมกลุ่มกัน



รูปที่ 4.13 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี AgNPLs/AgNO<sub>3</sub> กับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

## 4.5 การใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเครื่องดื่ม

### 4.5.1 ผลของตัวรบกวนจากตัวอย่างต่อการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

สำหรับการทดลองนี้อาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์เพื่อตรวจวัดหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีไอออนของเงินเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อเกิดเป็นโลหะเงินสะสมบนอนุภาคนาโนของเงินที่เป็นตัวตั้งเริ่มต้น ทำให้อนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดสีที่เปลี่ยนแปลง ดังนั้น องค์ประกอบที่อยู่ในเครื่องดื่มที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้อาจรบกวนการวิเคราะห์ได้ ซึ่งสารที่มีอยู่ในเครื่องดื่มส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล ซึ่งอาจถูกออกซิไดส์ได้ด้วยรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี

เนื่องจากการทดลองนี้ สนใจวิเคราะห์ตัวอย่างชาที่ทำเป็นเครื่องดื่ม เช่น ชาผงชนิดซองซึ่งส่วนมากจะประกอบด้วยใบชาเพียงอย่างเดียว จึงไม่มีน้ำตาลที่สามารถรบกวนระบบได้ แต่เพื่อที่จะสามารถนำอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ออกแบบไปประยุกต์ใช้กับเครื่องดื่มอื่น ๆ ในท้องตลาด ผู้วิจัยจึงทดสอบระบบกับน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 โมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีอยู่ในเครื่องดื่ม เช่น น้ำผลไม้ เป็นต้น ทำการทดสอบโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ใช้วิเคราะห์น้ำ MilliQ (blank test) กับสารละลายของตัวรบกวน ผลแสดงในตารางที่ 4.10 จากการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มสีระดับสีเทาของกระดาษที่เป็น blank test และที่ใช้ทดสอบน้ำตาลแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 98% ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อสารต้านอนุมูลอิสระและไม่ถูกรบกวนการวิเคราะห์ด้วยน้ำตาลที่มีในตัวอย่าง

ตารางที่ 4.10 ความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษเมื่อใช้ทดสอบตัวรบกวน






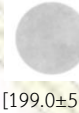
ชนิดของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี	ความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ				
	MilliQ (Blank)	Glucose (M)		Fructose (M)	
		0.1	0.5	0.1	0.5
AgNPs/AgNO <sub>3</sub>	[211.4±3.8]	[211.4±3.9]	[209.5±1.6]	[210.1±2.4]	[209.9±0.9]
AgNPLs/AgNO <sub>3</sub>	[223.3±3.0]	[222.1±3.6]	[218.8±2.5]	[222.6±1.7]	[222.2±2.5]

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ

#### 4.5.2 ผลการทดสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเครื่องดื่มชา

เมื่อได้วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคการตรวจวัดเชิงสี ด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ออกแบบขึ้น จึงนำไปทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในชาตัวอย่าง โดยใช้การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบกับปริมาณกรดแอสคอร์บิกซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (mgAA/g) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 การทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มจากชาตัวอย่าง

ชนิดของรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสี	ความเข้มสีของอุปกรณ์ฐานกระดาษ					
	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ		ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ		ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ	
	ชาเขียว	(mmAA/g)	ชาดำ	ชาเอลด์เกรย์	(mmAA/g)	
AgNPs/AgNO <sub>3</sub>	 [170.0±0.9]	23.73±0.77	 [196.7±1.0]	2.91±0.82	 [197.2±2.2]	2.33±0.38
AgNPLs/AgNO <sub>3</sub>	 [171.7±0.1]	26.00±0.98	 [198.3±1.9]	2.98±0.35	 [199.0±5.2]	2.21±0.55

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บ คือค่า Mean gray value จากการทดสอบ 3 ซ้ำ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ใช้อุณหภูมิโนเงินทรงกลมเป็นตัวตั้งเริ่มต้น พบว่า เครื่องดื่มจากตัวอย่างชาเขียว ชาดำ และชาเอลด์เกรย์ ได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ 23.73, 2.91, และ 2.33 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของสารตัวอย่าง ตามลำดับ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ด้วยระบบรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ใช้อุณหภูมิโนเงินแบบแผ่นเป็นตัวตั้งเริ่มต้น ได้ปริมาณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ 26.00, 2.98 และ 2.21 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของสารตัวอย่าง ในเครื่องดื่มจากชาเขียว ชาดำ และชาเอลด์เกรย์ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจากการตรวจวัดทั้งสองระบบรีเอเจนต์ให้ค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 98%

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษควมคู่กับการตรวจวัดเชิงสีได้สำเร็จ โดยมีหลักการวิเคราะห์จากปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่ประกอบด้วยไอออนของโลหะเงินและอนุภาคนาโนเงินทรงกลมหรือแบบแผ่นเป็นตัวตั้งเริ่มต้น เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์กับสารต้านอนุมูลอิสระแล้วเกิดเป็นโลหะเงินเพิ่มขึ้นบนอนุภาคนาโนของเงิน ทำให้อนุภาคนาโนของเงินมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีสีที่เปลี่ยนไป จากนั้นวัดค่าเฉลี่ยความเข้มสีโดยโปรแกรม Adobe photoshop และใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐานแทนสารต้านอนุมูลอิสระในการรายงานปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดในช่วงความเข้มข้น 0.00 ถึง 1.00 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้วิธีตรวจวัดที่ใช้รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่มีอนุภาคนาโนเงินทรงกลมเป็นตัวตั้งเริ่มต้น พบว่ามีขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 0.0097 และ 0.032 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนในวิธีที่ใช้รีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีที่มีอนุภาคนาโนเงินแบบแผ่นเป็นตัวตั้งเริ่มต้น มีขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 0.0011 และ 0.038 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 50 นาที ซึ่งอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเครื่องดื่มชาได้จริง มีความจำเพาะต่อสารต้านอนุมูลอิสระสูง เตรียมอุปกรณ์ง่าย ใช้งานง่าย มีราคาถูก พกพาสะดวก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในภาคสนาม

## ข้อเสนอแนะและข้อควรระวัง

- เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิด ดังนั้น ควรศึกษาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น เพื่อศึกษาแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างสีที่เปลี่ยนไปบนอุปกรณ์ฐานกระดาษกับสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดที่มีโครงสร้างทางเคมีต่างกัน
- ในการเตรียมอุปกรณ์ฐานกระดาษ ควรใช้ความระมัดระวังขณะหยดรีเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดสีลงบนกระดาษ เพื่อให้รีเอเจนต์กระจายตัวอยู่บนกระดาษได้เท่า ๆ กัน และป้องกันการเกิดสีที่ไม่สม่ำเสมอบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ
- เนื่องจากสารละลายกรดแอสคอร์บิกสามารถสลายตัวได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อน ดังนั้น จึงควรเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งที่จะใช้ และหลีกเลี่ยงจากแสงแดด
- การถ่ายรูปสีที่เปลี่ยนแปลงไปบนอุปกรณ์ฐานกระดาษแต่ละครั้งควรกำหนดระยะห่างระหว่างกระดาษกับกล้อง และโฟกัสที่จุดเดิมทุก ๆ ครั้งในการถ่ายภาพ และจัดวางตำแหน่งกระดาษทดสอบที่ตำแหน่งเดียวกันเสมอ รวมทั้งควบคุมแสงภายนอกให้เหมือนกันทุกครั้ง เพื่อลดความคลาดเคลื่อนเมื่อนำไปหาค่าเฉลี่ยความเข้มสี

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Barry, H. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 33-50.
- [2] Giokas, L. D.; Vlessidis, G. A.; Evmiridis, P. N. On-Line Selective Detection of Antioxidants Free-Radical Scavenging Activity Based on Co(II)/EDTA-Induced Luminol Chemiluminescence by Flow Injection Analysis. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *589*, 59–65.
- [3] Aoshima, H.; Hirata, S.; Ayabe, S. Antioxidative and Anti-Hydrogen Peroxide Activities of Various Herbal Teas. *Food Chem.* **2007**, *103*, 617-622.
- [4] Li, B.; Derek A. P. Methods for Determining the Efficacy of Radical-Trapping Antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *82*, 187-202.
- [5] Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, E. S.; Bektasoglu, B.; Berker, I. K.; Özyurt, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, *Molecules.* **2007**, *12*, 1496–1547.
- [6] Dimosthenis, L. G.; Tatiana, G. C.; Foteini, A. K.; Athanasios, G. V. Paper-Based Assay of Antioxidant Activity Using Analyte-Mediated on-Paper Nucleation of Gold Nanoparticles as Colorimetric Probes. *Anal. Chim. Acta.* **2015**, *860*, 61-69.
- [7] Aruoma, I. O.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B. Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1880-1885.
- [8] Özyürek, M.; Güngör, N.; Baki, S.; Güçlü, K.; Apak, R. Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols. *Anal Chem.* **2012**, *84*, 8052-8059.
- [9] Zhong, W. Z.; Wang, P. Z.; Huang, D. X. G. Investigation of Wax and Paper Materials for the Fabrication of Paper-Based Microfluidic Devices. *Microsyst Technol.* **2012**, *18*, 649-659.



- [10] Sharpe, E.; Frasco, T.; Andreescu, A.; Andreescu, S. Portable Ceria Nanoparticle-Based Assay for Rapid Detection of Food Antioxidants (NanoCerac). *Analyst*, **2013**, *138*, 249–262.
- [11] Ferreira, M. C. D.; Giordano, F. G.; Soares, C.; Oliveira, J.; Mendes, R.; Piazzetta, M.; Gobbi, L. A.; Cardoso, B. M. Optical Paper-Based Sensor for Ascorbic Acid Quantification Using Silver Nanoparticles. *Talanta*. **141**, 2015, 188-194.
- [12] Hidayat, A. M.; Jannah, F.; Kuswandi, B. Development of Paper Based Sensor for The Determination of Total Phenolic Content in Green Tea Beverages. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. **2016**, *9*, 424-430.
- [13] Colorimetric analysis. [Online]. Available form: [https://en.wikipedia.org/wiki/Colorimetric\\_analysis](https://en.wikipedia.org/wiki/Colorimetric_analysis) (accessed Feb 5, 2017)
- [14] Zhou, M.; Yang, M.; Zhou, F. Paper Based Colorimetric Biosensing Platform Utilizing Cross-Linked Siloxane as Probe. *Biosens Bioelectron*. **2014**, *55*, 39-43.
- [15] Shuang, T. H.; Christopher, B. M.; Kristina, T.; G, C. R. Chemical Interaction between Silver Nanoparticles and Thiols: a Comparison of Mercaptohexanol Against Cysteine. *Sci. China. Chem*. **2014**, *57*, 1199-1210.
- [16] Ratyakshi.; Chauhan, P. R. Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles. *Asian J. Chem*. **2009**, *21*, 113-116.
- [17] Lopez, I. A.; Gomez, I. Photoinduced Shape Transformation from Nanospheres to Silver Triangular Nanoprism and Nanodisks: Citrate Ion Concentration and Stirring Effects. *Rev. Mex. Fis*. **2012**, *58*, 289-292.
- [18] Wu, C.; Zhou, X.; Wei, J. Localized Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles Synthesized by a Versatile Solution Reaction. *Nanoscale. Res. Lett*. **2015**, *10*, 1058.

- [19] Vilela, D.; Gonzalez, M. C.; Escarpa, A. Sensing Colorimetric Approaches based on Gold and Silver Nanoparticles Aggregation: Chemical Creativity behind the Assay. A Review. *Anal. Chim. Acta.* **2012**, *751*, 24-43.
- [20] Cobley, C. M.; Chen, J.; Cho, E. C.; Wang, L. V.; Xia, Y. Gold Nanostructures: a Class of Multifunctional Materials for Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 44–56.
- [21] Lü, M. J.; Lin, H. P.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 840-860.
- [22] What is a Free Radical. [Online]. Available form: <http://primoh2.com/what-is-a-free-radical/> (accessed Feb 7, 2017)
- [23] Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, M. K.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 957-998.
- [24] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Whitesides, G. M. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Anal Chem.* **2010**, *82*, 3-10.
- [25] การพัฒนาอุปกรณ์ปฏิบัติการบนกระดาษสำหรับการตรวจวัดสารปั้งชี้ทางชีวภาพจากเลือด. [Online]. Available form: [http://www.trf.or.th/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6700:2015-07-24-12-07-47&catid=333:2557&Itemid=433](http://www.trf.or.th/index.php?option=com_content&view=article&id=6700:2015-07-24-12-07-47&catid=333:2557&Itemid=433) (accessed Feb 8, 2017)
- [26] Zhang, Y.; Zuo, P.; Ye, B. C. A Low-Cost and Simple Paper-Based Microfluidic Device for Simultaneous Multiplex Determination of Different Types of Chemical Contaminants in Food. *Biosens Bioelectron.* **2015**, *68*, 14-19.
- [27] Zhang, M.; Ge, L.; Ge, S.; Yan, M.; Yu, J.; Huang, J.; Liu, S. Three-Dimensional Paper-Based Electrochemiluminescence Device for Simultaneous Detection of Pb<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> Based on Potential-Control Technique. *Biosens Bioelectron.* **2013**, *41*, 544-550.

- [28] Alkasir, R. S. J.; Rossner, A.; Andreescu, S. Portable Colorimetric Paper-Based Biosensing Device for the Assessment of Bisphenol A in Indoor Dust. *Environ Sci Technol.* **2015**, *49*(16), 9889-9897.
- [29] Ratnarathorn, N.; Chailapakul, O.; Henry, S. C.; Dungchai, W. Simple Silver Nanoparticle Colorimetric Sensing for Copper by Paper-Based Devices. *Talanta.* **2012**, *99*, 552-557.
- [30] RGB, CMYK or PMS? Choosing the right Color Model. [Online]. Available form: <http://www.designwebidentity.com/rgb-cmyk-pms-choosing-color-model> (accessed Feb 9, 2017)
- [31] Photoshop CS6 Fundamentals: Color Modes. [Online]. Available form: <http://www.graphics.com/article-old/photoshop-cs6-fundamentals-color-modes> (accessed Feb 9, 2017)
- [32] การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation). [Online]. Available form: <http://reo06.mnre.go.th/home/images/upload/file/report/Jurairut070509.pdf> (accessed Feb 9, 2017)
- [33] AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures. [Online]. Available form: [www.pfigueiredo.org/Bromono2b.pdf](http://www.pfigueiredo.org/Bromono2b.pdf) (accessed Feb 9, 2017)
- [34] Benzie, F. F. I.; Szeto, T. Y. Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 633–636.
- [35] Pris, M. Influence of Different Parameters on Wet Synthesis of Silver Nanoparticles. Applied Physics Program, University of Twente, 2014.

## ประวัติผู้วิจัย

นางสาวสุชานุช สอนศรี เกิดเมื่อวันที่ 30 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดสุโขทัย สำเร็จการศึกษา  
ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนอุดมดรุณี จังหวัดสุโขทัย เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อใน  
หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556  
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 310/3 หมู่ 2 ตำบลบ้านกล้วย อำเภอเมือง จังหวัดสุโขทัย รหัสไปรษณีย์  
64000 อีเมล suchanuch.sorn@gmail.com

