

รายงานการวิจัย

ชุดต้นแบบเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผักและผลไม้แบบอัตโนมัติ

A Prototype for Automated Assay of Total Anti-oxidant Activity



ชื่อผู้วิจัย

ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชัน

สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCM
TX
553
A43
รท0616 (ค.1)

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน... 121184
วัน, เดือน, ปี 25 ส.ค. 2555

b. 12408900
i.

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2554

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ฉบับปรับปรุงแก้ไข_17 พฤศจิกายน 2553

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) ชุดต้นแบบเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผักและผลไม้แบบอัตโนมัติ

(ภาษาอังกฤษ) A Prototype for Automated Assay of Total Anti-oxidant Activity

แหล่งเงิน เงินงบประมาณรายได้ คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ค.ศ. 2553 ถึง ก.ย. 2554

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัดและ อีเมล

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายณัฐวุฒิ เชิงชั้น

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Nathawut Choengchan

ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02-326-4339-53 ต่อ 653 โทรสาร 02-326-4415

E-mail nchoengchan@gmail.com และ knathaw@kmitl.ac.th

คำสำคัญ (Keywords) ชุดต้นแบบ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ผัก ผลไม้

บทคัดย่อ

ชุดต้นแบบในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิคไมโครฟลูอิดิกควบคู่กับการตรวจวัดการเรืองแสง โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของสารประกอบโคบอลต์อิตีที่เอที่มีต่อปฏิกิริยาระหว่างลูมินอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเมื่อให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผสมกับสารประกอบโคบอลต์อิตีที่เอจะสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่เกิดขึ้นนี้สามารถทำปฏิกิริยากับลูมินอลให้ผลิตภัณฑ์ที่เปล่งแสงออกมาได้ การวิเคราะห์ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดสามารถทำได้โดยป้อนสารละลายผสมของลูมินอลในสารประกอบโคบอลต์อิตีที่เอและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างต่อเนื่อง เข้าไปผสมกันบนไมโครชิปทำให้ได้สัญญาณการเรืองแสงคงที่ค่าหนึ่ง เมื่อฉีดสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระเข้าสู่ระบบสารต้านอนุมูลอิสระจะไปจับกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ส่งผลให้แสงที่วัดได้มีค่าลดลงแปรผันตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง ในงานวิจัยนี้ได้เสนอวิธีการประเมินค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในรูปแบบของค่า IC₅₀ (ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการลดแสงลง 50%) ของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มได้แก่กลุ่มน้ำคั้นแยกจากจากผลไม้ทั้ง 14 ชนิดคือ มะขามป้อม ฝรั่งสีขาว มะละกอ สับปะรด มังคุด มะเขือเทศราชินี ทับทิม ส้มเขียวหวาน ฝรั่งสีชมพู องุ่น มะนาว เสาวรส แอปเปิ้ลเขียว และแอปเปิ้ลฟูจิ ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นสารสกัดจากผักพื้นบ้านของไทยทั้ง 13 ชนิดประกอบด้วย ผักที่นิยมรับประทานในประเทศไทย 6 ชนิด คือ ผักคะน้า ผักบุ้ง ถั่วฝักยาว สะระแหน่ โหระพา ขมิ้น และอีก 6 ชนิดเป็นผักที่นิยมรับประทานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ผักตบชวา ผักเม็ก ผักกระโดน ผักแพ้ว

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผักขะแยง ผักอีหล้าและสารสกัดจากชาเขียว และกลุ่มสุดท้ายจะเป็นเครื่องดื่มทั้ง 8 ชนิดที่นิยมดื่มในประเทศไทย จากการทดลองพบว่าระบบที่พัฒนา มีความไวสูง สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำในระดับนาโนโมลาร์ได้ การวิเคราะห์มีความแม่นยำสูงที่ %การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ <2% (จำนวนครั้งในการฉีดสาร =10 ครั้ง) ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของระบบโดยการเปรียบเทียบลำดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับวิธีดีพีพีเอซซึ่งเป็นวิธีแบบดั้งเดิม พบว่าการทดลองให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยลำดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเรียงลำดับจากมากไปน้อยเป็นดังนี้คือ เคอร์ซีทิน > โทรลอคซ์ > กรดแกลลิก > กรดคาเฟอิก > รุทีน วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความ

Abstract

A microfluidic system based on luminol chemiluminescence detection was reported as a new method for evaluation of total antioxidant capacity (TAC). The indicator reaction was adopted from a catalytic effect of Co(II)/EDTA complex on chemiluminescence (CL) reaction between H_2O_2 and luminol. H_2O_2 , in the present of Co(II)/EDTA complex, can produce hydroxyl radical (HO^\bullet). This HO^\bullet reacts with luminol in microfluidic system to produce CL light. In order to, measure TAC, a constant CL intensity was generated as a background signal by continuously pumping all reagents into the microfluidic chip. Standard or sample solutions were injected into a stream of H_2O_2 to scavenge H_2O_2 and HO^\bullet . Decreasing in the CL signal depends upon the antioxidant capacity of the sample. In this work, TAC assay in term of IC_{50} was obtained for three groups of sample, including purely pressed fruit juices, vegetable extracts and beverages. In this work emblica, white guava, papaya, pineapple, red honey tomato, pomegranate, tangerine, pink guava, red grape, lemon, passion fruit, green apple and fuji apple were selected as a samples for TAC determined. Extracts of Thirteen Thai culinary plants were used to assess TAC. This type of sample comprised of six culinary plants and seven indigenious plants from North Eastern-Thai, common culinary plants in Thailand were kale, Thai water convolvulus, string beans, sweet basil, kitchen mint and turmeric and seven North Eastern-Thai indigenious plants from Ubonratchathani Province, Thailand, were teaw, metchun, rice paddy herb, smartweed, tummy wood, red-bead tree and green tea. Finally, the applicability of the developed method was tested by measuring the TAC of eight beverages commonly consumed in Thailand. This developed method was sensitive by the limit of detection was very low in nM level. The reproducibility was excellent at %RSD less than 2 (n=10). The reliability of this method was tested by comparing order of TAC from five known antioxidants with standard conventional DPPH method. The results showed that the two methods provided the same sequence of standard antioxidants as quercetin > trolox > gallic acid > caffeic acid > rutin, respectively. The developed method offers a convenient system for TAC assay in various natural compounds including fruit juice. The system was rapid, possible for automation and less reagent consumption.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากได้รับการสนับสนุนเงินวิจัย จากทุนวิจัยคณะ
วิทยาศาสตร์ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2554 และได้รับความอนุเคราะห์จาก ห้องปฏิบัติการ
นวัตกรรม-วิจัยการไหล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ
นาคะปรีชา หัวหน้าห้องปฏิบัติการ ซึ่งอนุเคราะห์อุปกรณ์บางส่วนสำหรับใช้ทำวิจัยและให้คำปรึกษาในการทำ
วิจัย

ผู้นักวิจัย ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉบับปรับปรุงแก้ไข_17 พฤศจิกายน 2553

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. วิธีดำเนินการ	
2.1 สารเคมี	5
2.2 เครื่องมือ	5
2.3 วิธีดำเนินการ	5
3. อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	6
3.1 การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	8
3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ FI เพื่อวิเคราะห์อะซีทัลดีไฮด์และเอทานอล	12
3.3 ศึกษาคุณลักษณะเด่นของระบบ FI	13
3.4 การประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเครื่องดื่มสุราและเครื่องดื่มผสมแอลกอฮอล์	13
4. สรุปผลการทดลอง	14
บรรณานุกรม	15

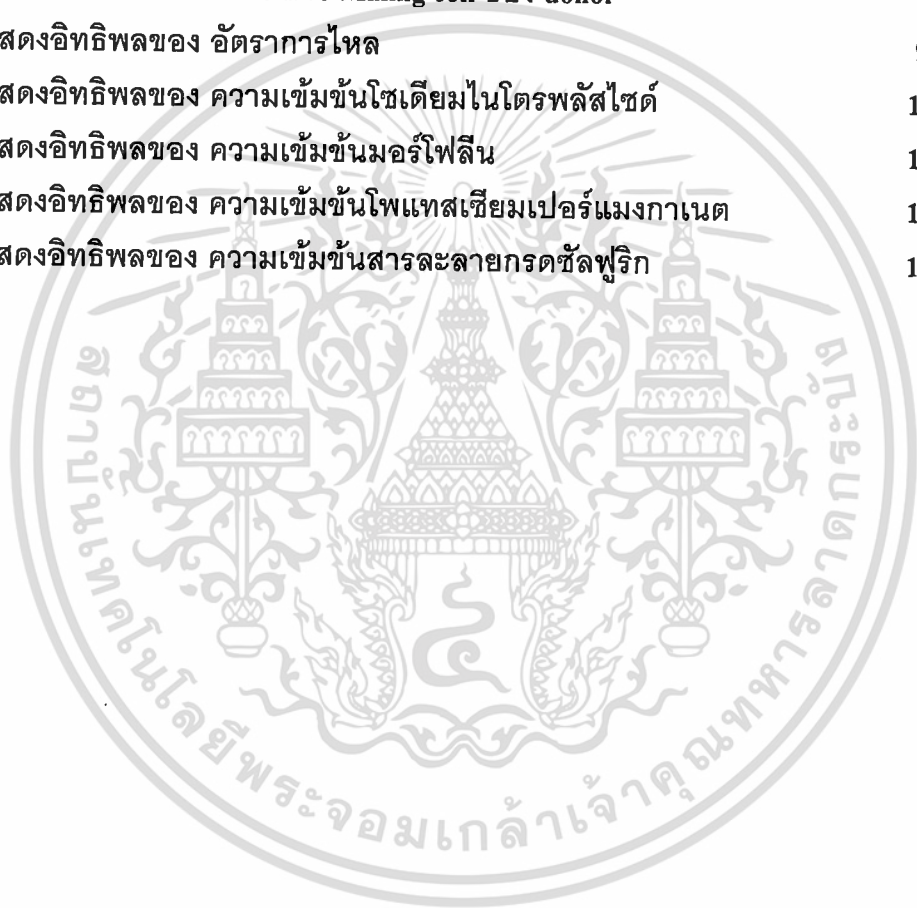
สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงคุณลักษณะเด่นของระบบFI ในการวิเคราะห์หาปริมาณ อะซีทัลดีไฮด์และเอทานอล	13
ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์และความเข้มข้นของเอทานอล ที่ตรวจพบในตัวอย่าง	13



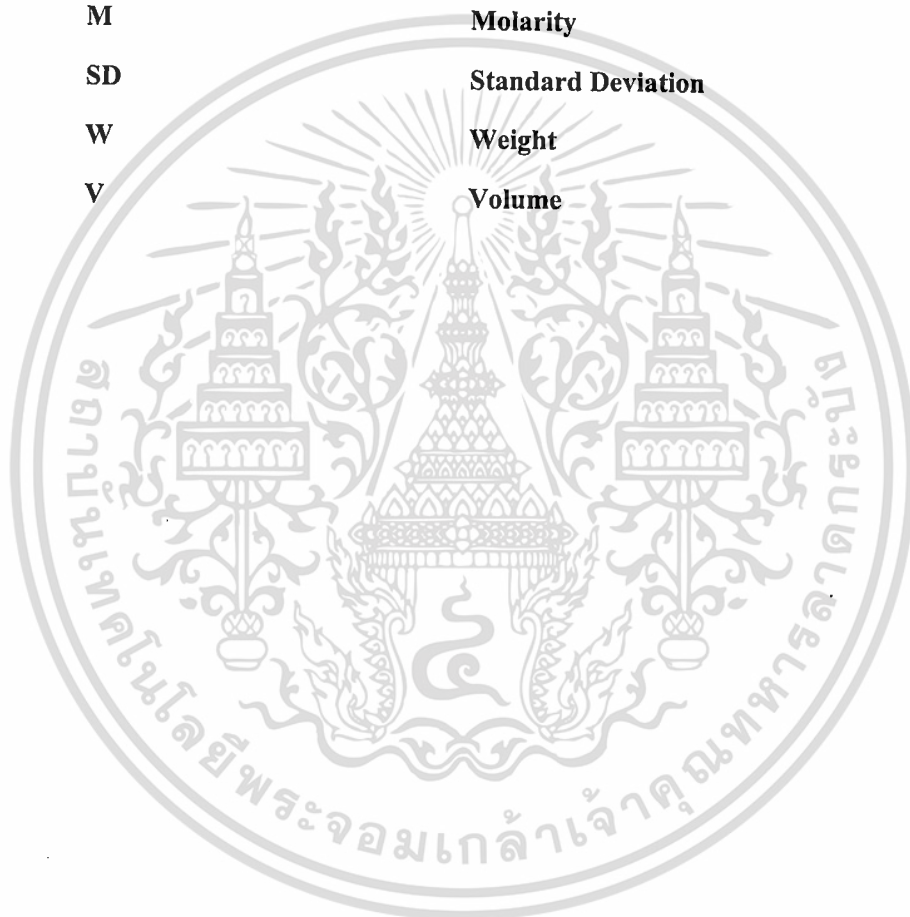
สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงระบบ FI เพื่อวิเคราะห์ อะซีทัลดีไฮด์ (ก) และเอทานอล (ข)	6
รูปที่ 3.1 แสดงสเปกตรัมของสารละลายอะซีทัลดีไฮด์ทำปฏิกิริยาระหว่าง สารละลายผสม มอร์โฟลีน กับ โซเดียมไนโตรพรัสไซด์	7
รูปที่ 3.2. กราฟแสดงอิทธิพลของ ความยาว Mixing coil ของ acceptor	8
รูปที่ 3.3 กราฟแสดงอิทธิพลของ ความยาว Mixing coil ของ donor	9
รูปที่ 3.3 กราฟแสดงอิทธิพลของ อัตราการไหล	9
รูปที่ 3.4 กราฟแสดงอิทธิพลของ ความเข้มข้นโซเดียมไนโตรพรัสไซด์	10
รูปที่ 3.5 กราฟแสดงอิทธิพลของ ความเข้มข้นมอร์โฟลีน	10
รูปที่ 3.6 กราฟแสดงอิทธิพลของ ความเข้มข้นโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต	11
รูปที่ 3.7 กราฟแสดงอิทธิพลของ ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟูริก	12



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

FI	Flow injection
g	Gram
GC	Gas Chromatography
GD	Gas-diffusion
m	Milli
M	Molarity
SD	Standard Deviation
W	Weight
V	Volume



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 ๕๐๐๐๑๓๕ กรุงเทพมหานคร
 โทร. ๐๒-๑๒๕๖๖๐๐๐ โทรสาร ๐๒-๑๒๕๖๖๐๐๑
 อีเมล: admission@kmitl.ac.th
www.kmitl.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 ๕๐๐๐๑๓๕ กรุงเทพมหานคร
 โทร. ๐๒-๑๒๕๖๖๐๐๐ โทรสาร ๐๒-๑๒๕๖๖๐๐๑
 อีเมล: admission@kmitl.ac.th
www.kmitl.ac.th

สงวนลิขสิทธิ์
 © ๒๕๖๓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

นิยามและโทษของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบใดๆก็ตาม ที่มีจำนวนอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จึงว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย เซลล์ต่างๆ จะถูกทำลาย โดยอนุมูลอิสระเกิดจาก 2 แหล่ง คือ (1) ภายในร่างกาย เช่น เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ และ(2) ภายนอกในร่างกาย จากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสี ultraviolet หรือจากมลพิษ เช่น คาร์บอนหรือก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ โดยปกติร่างกายจะรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมโดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่ถ้าเสียสมดุลโดยมีปริมาณของอนุมูลอิสระมากกว่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์อื่นเป็นที่มาของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง

ทำไมต้องทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผักและผลไม้?

การปรับสมดุลของอนุมูลอิสระทำได้โดยการบริโภคผักและผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ประเทศไทยนับว่าเป็นประเทศที่มีผักและผลไม้หลายชนิดซึ่งอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ จากข้อมูลของกองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (กระทรวงสาธารณสุข 2007) พบว่า ผักและผลไม้หลายชนิดมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น เบต้าแคโรทีน วิตามินอี และวิตามินซีมากพอสมควร ข้อมูลนี้ล้วนเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้บริโภคเพื่อที่จะเลือกบริโภคผักหรือผลไม้ที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากๆ ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผักและผลไม้ จึงเป็นเรื่องสำคัญ เพราะส่วนหนึ่งที่จะช่วยเสริมสร้างสุขภาพของคนไทยให้มีสุขภาพแข็งแรง สอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศ ตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554)

ทำไมถึงต้องพัฒนาวิธีเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบอัตโนมัติ

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิสระ เช่น วิตามินซี หรือสารประกอบฟีนอลิก แต่ในความเป็นจริงสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างหนึ่งๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายๆ ชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งรวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่ทราบว่าเป็นสารชนิดใดแน่นอน และสารต้านอนุมูลอิสระที่ยังไม่ทราบโครงสร้างและระบุไม่ได้ว่าคือสารใด ดังนั้น การที่จะทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดและแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างจึงเป็นการยาก ลึกลับและไม่ง่าย เพราะโดยความเป็นจริงแล้ว อาหาร ผักหรือผลไม้ มีการผสมกันของสารและองค์ประกอบต่างๆ ที่หลากหลาย ดังนั้น สิ่งที่น่าสนใจควรวัด ควรจะเป็นการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) มากกว่าที่จะต้องวิเคราะห์จนระบุชี้ชัดว่าเป็นสารใด ซึ่งการวัดเป็น TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า

จากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่า วิธีที่ใช้ประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) มักเป็นวิธีวิเคราะห์แบบที่ไม่สามารถเตรียมตัวอย่าง (Sample Pretreatment) ได้อย่างต่อเนื่อง ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ไม่เหมาะสมถ้ามีตัวอย่างที่ต้องทดสอบเป็นจำนวนมาก ดังนั้น ในโครงการนี้ จึงเสนอที่จะพัฒนาหลักการและชุดเครื่องมือต้นแบบสำหรับทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดโดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ควบคุมการทำงาน สามารถเตรียมตัวอย่างได้อัตโนมัติ ทำให้วิเคราะห์ได้สะดวก และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1 เพื่อพัฒนาหลักการใหม่สำหรับทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด
- 2 เพื่อสร้างชุดเครื่องมือต้นแบบใช้วัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด
- 3 เพื่อประยุกต์ใช้ชุดเครื่องมือต้นแบบที่พัฒนาขึ้นกับผักและผลไม้ในประเทศไทยเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการนี้ จะเริ่มจาก 'พัฒนาหลักการใหม่' โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลของของเหลวภายในท่อขนาดเล็ก เทคนิคดังกล่าวเรียกว่า Flow injection analysis หรือ FIA ซึ่งจะใช้ร่วมกับการตรวจวัดทางแสงเพื่อใช้ประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด

จากนั้นจะนำหลักการดังกล่าวไปพัฒนาต่อออกเป็น 'ชุดเครื่องมือต้นแบบ (Prototype)' สำหรับใช้วัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด โดยชุดเครื่องมือต้นแบบนี้ จะประดิษฐ์ให้ทำงานได้สะดวก รวดเร็ว และเป็นไปอย่างอัตโนมัติผ่านการควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ นอกจากนี้จะศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำชุดเครื่องมือต้นแบบไปใช้ทดแทนวิธีประเมินแบบเดิมซึ่งใช้เวลาวิเคราะห์นาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารผลงานวิจัยสำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่างกาย ทำให้การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าความเป็นจริง (วัชรระคุปต์ 2550) ในกรณีที่ต้องการวิเคราะห์ TAC ในงานที่จำนวนตัวอย่างมากๆ เทคนิคที่อาศัยการไหลของของเหลว เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างสูงเนื่องจากการวิเคราะห์ทำได้สะดวก เป็นอัตโนมัติ และรวดเร็ว โดยการวิเคราะห์มักจะพัฒนามาจากวิธีดั้งเดิมเช่น DPPH (Magalhaes, Segundo et al. 2006) และ ABTS (Ivekovic, Milardovic et al. 2005)

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด

Parejo และคณะ (Parejo, Codina et al. 2001) เสนอวิธีการวิเคราะห์ TAC โดยใช้ปฏิกิริยาการเรืองแสงระหว่าง luminol กับอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (OH^{\cdot}) ซึ่งปฏิกิริยานี้มีข้อดีที่เหนือกว่าวิธีอื่นที่กล่าวมาแล้ว เนื่องจาก OH^{\cdot} ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เป็นอนุมูลอิสระที่อันตรายและพบในร่างกายของมนุษย์ แต่วิธีนี้มีปัญหาที่ต้องอาศัยผู้ทำการทดลองที่ชำนาญ เพราะกระบวนการวัดต้องทำที่เวลาคงที่และเท่ากันทุกครั้ง ซึ่งทำได้ยากและมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดสูง

Giokas และคณะ (Giokas, Vlessidis et al. 2007) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยาดังกล่าวในระบบที่มีการไหลอย่างต่อเนื่องแบบโฟลอินเจกชัน ซึ่งเป็นระบบแบบกึ่งอัตโนมัติทำให้ใช้งานได้ง่ายขึ้นแม้กับผู้ที่ไม่ชำนาญมาก

Amatongchai และคณะ (Amatongchai, Hofmann et al. 2007) ใช้เทคนิคปฏิบัติการบนชิป (lab-on-a-chip) มาวิเคราะห์ TAC โดยใช้ปฏิกิริยาของ peroxyoxalate ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ TAC ในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามระบบเคมีที่ใช้วิเคราะห์ TAC ของ Amatongchai และคณะนี้เหมาะสมที่จะวัดในตัวอย่างสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เท่านั้น แต่ไม่เหมาะสมจะประเมิน TAC ในอาหาร หรือเครื่องดื่มที่ละลายในน้ำ แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวไม่มีวิธีใดเลยที่สามารถเตรียมตัวอย่างให้เป็นแบบอัตโนมัติ จำเป็นต้องเจือจางตัวอย่างด้วยวิธีดั้งเดิมทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน

บทที่ 2

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้และการเตรียม

1.1. สารเคมี

Sodium tetraborate decahydrate (Sigma-aldrich, Germany) Caffeic acid (Fluka BioChem, Switzerland) Catechin (Sigma, Germany) Cobalt (II) chloride (Aldrich, Germany) Chromium (III) nitrate (Fluka, Switzerland) Cupper (II) sulfate (J.T. Baker, USA) Diaminoethanetetra-acetic acid-disodium salt (EDTA) (Fisher Scientific, UK) 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Aldrich, Germany) Gallic acid (Sigma, Germany) Hydrochloric acid (Merck, Germany) Hydrogen peroxide (Merck, Germany) 6-hydroxy-2, 5, 7-tetramethyl-chroman 2-carboxylic acid (Trolox) (Aldrich, Germany) Iron(III) chloride (Merck, Germany) Luminol sodium salt (Sigma, Germany) Methanol (Lab Scan, Thailand) Nitric acid (Merck, Germany) Quercetin (Sigma, Germany) Rutin trihydrate (Fluka BioChem, Switzerland) Sodium hydroxide (Merck, Germany) Sodium metabisulfite (Merck, Germany)

1.2. การเตรียมสารเคมี

1.2.1. สารละลายที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาการเรืองแสง

สารละลาย H_2O_2 เตรียมจาก H_2O_2 30% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สารละลาย luminol-Co(II)/EDTA ซึ่งประกอบด้วย Co^{2+} 0.5 mg mL⁻¹, EDTA 4 mg mL⁻¹ และ luminol 0.2 mg mL⁻¹ นั้นเตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium tetraborate เข้มข้น 0.05 โมลาร์ และปรับ pH ของสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA เป็น 10 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 100 mL ด้วยน้ำ

หมายเหตุ ในการเตรียมสารเคมีทุกประเภทสำหรับการทดลองนี้ได้อาศัยน้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลายโดยตลอด

1.2.2. สารละลายของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เคอร์ซีทีน , โทลอกซ์, คาเทชิน, กรดแกลลิก, กรดคาเฟอิก และ รุติน หนัก 0.1691, 0.1251, 0.1452, 0.0851, 0.0901 และ 0.3322 กรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรเป็น 5 mL ด้วยเมทานอล หลังจากนั้นเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนก่อนทำการวิเคราะห์

1.2.3. การเตรียมตัวอย่าง

1.2.3.1. กลุ่มน้ำคั้นแยกกากจากผลไม้

ผลไม้ไทยทั้ง 14 ชนิด ได้แก่ มะขามป้อม ฝรั่งสีขาว มะละกอ สับปะรด มังคุด มะเขือเทศราชินี ทับทิม ส้มเขียวหวาน ฝรั่งสีชมพู องุ่น มะนาว เสาวรส แอปเปิ้ลเขียว และแอปเปิ้ลฟูจิ ซึ่งจากตลาดสดท้องถิ่นหลังจากล้างทำความสะอาดแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นใช้เครื่องคั้นน้ำแยกกากในการแยกกากน้ำตัวอย่างผลไม้ทั้งหมด นำตัวอย่างที่ได้ไปกรองผ่าน syringe filter ขนาดรู 0.25 μm แล้วนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

1.2.3.2. กลุ่มสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

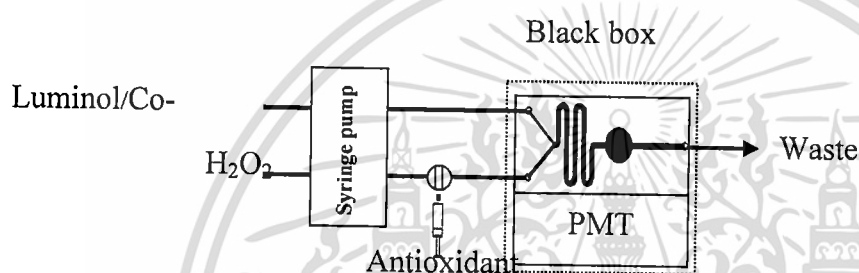
วิธีการสกัดจะพัฒนาจากวิธีของ Silva et al (Silva, Gomes et al. 2006). ผักสดทั้ง 13 ชนิด จะถูกทำให้แห้งโดยการอบที่ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อให้ได้น้ำหนักที่คงที่ หลังจากนั้นบดให้เป็นผงและชั่งน้ำหนัก (2.5 กรัม) สกัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำและละลายในไขมันออกด้วยเฮกเซน (3x25 mL) และเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (ALC Centrifuge 4218, Milano, Italy) ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เติม 2% โซเดียมเมทาไบซัลไฟต์ 10 mL ลงในส่วนที่ไม่ละลาย (pulp) และนำไปสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ (80:20 v/v) 3 ครั้ง (3x25 mL) นำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วย syringe filter ขนาดรู 0.25 μm ก่อนนำไปวิเคราะห์ TAC

1.2.3.3. กลุ่มเครื่องดื่ม

เครื่องดื่มทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ เครื่องดื่มสมุนไพรไทย น้ำแอปเปิ้ลหมัก กาแฟสดอะราบิก้า ชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม กาแฟสำเร็จรูปผสมกาแฟสด ชาเขียวแบบซอง, พ룬และเบอร์รี่สกัดเข้มข้น ตัวอย่างทั้งหมดถูกเจือจางด้วยน้ำและกรองด้วย syringe filter ขนาดรู 0.25 μm ก่อนนำไปวิเคราะห์

2. การติดตั้งระบบและวิธีการทดลอง

ระบบที่ใช้ในการทดลองแสดงในรูปที่ 2 ประกอบด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้ syringe pump ชนิด 2 channel สำหรับผลักดันสารละลาย H_2O_2 และสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA เข้าไปในระบบ injection valve และ photomultiplier tube (PMT) ซึ่งจะมีไมโครชิปติดอยู่และบรรจุภายในกล่องทึบแสงที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันแสงรบกวนจากภายนอก วิธีการทดลองเริ่มจากการบรรจุสารละลาย H_2O_2 และสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA ใน syringe จากนั้นผลักดันสารละลายทั้ง 2 ชนิดเข้าไปผสมกันภายในไมโครชิปด้วยอัตราเร็วคงที่ สารละลายจะทำปฏิกิริยากันในร่องของไมโครชิปและให้แสงในช่วง 425 นาโนเมตร เมื่อทำการฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในระบบ ความเข้มแสงที่วัดได้จะลดลงแปรผันตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ



รูปที่ 2 การติดตั้งระบบสำหรับการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) (PMT คือ Photomultiplier tube)

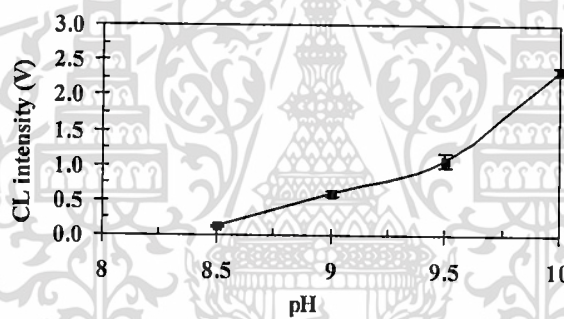
บทที่ 3

ผลการทดลองและการวิจารณ์

3.1 การทดสอบการทำงานของระบบและหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

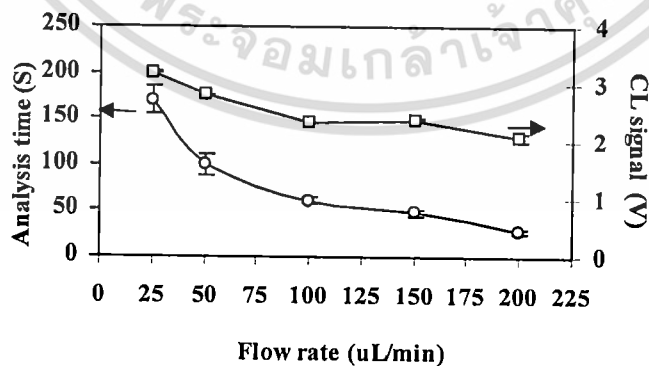
ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยระบบที่สร้างขึ้นต้องทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ระบบวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ โดยประสิทธิภาพในการวิเคราะห์จะพิจารณาจากลักษณะต่างๆ ได้แก่ สัญญาณการเรืองแสง เวลาและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ pH ของสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA (รูปที่ 1) อัตราการไหลของสารละลาย (รูปที่ 2) ความเข้มข้นของ Co^{2+} และความเข้มข้นของ luminol

1. pH ของสารละลาย Luminol-Co(II)/EDTA บัฟเฟอร์



รูปที่ 1 อิทธิพลของ pH ต่อสัญญาณการเรืองแสง

2. อัตราเร็วในการไหลของสารละลาย



รูปที่ 2 อิทธิพลของอัตราการไหลของสารละลายต่อเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และสัญญาณการเรืองแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจาก pH และอัตราในการไหลของสารละลายแล้ว ได้ทำการทดสอบพารามิเตอร์อื่นๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1 ซึ่งได้ใช้เป็นสภาวะในการทดสอบ TAC ต่อไปในงานนี้

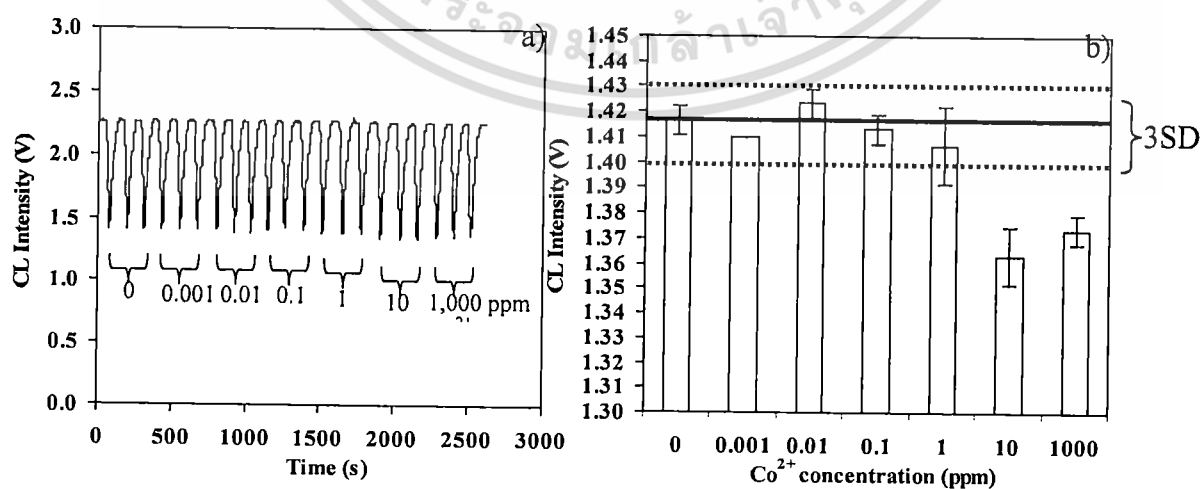
ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
บัฟเฟอร์	Sodium tetraborate 0.05 M pH
	10.0
Flow rate ($\mu\text{l min}^{-1}$)	150
Luminol (mg mL^{-1})	0.2
H_2O_2 (โมลาร์)	0.1
Co(II) (mg mL^{-1})	0.5
EDTA (mg mL^{-1})	4

3.2 การศึกษาการรบกวนจากโลหะหนัก

จากรายงานการวิจัยของ Parejo และคณะ (Parejo, Petrakis et al. 2000) พบว่า นอกจาก Co^{2+} แล้วยังมีไอออนของโลหะอื่น ๆ ที่สามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเรืองแสงระหว่าง luminol และ OH^\cdot ได้ เช่น Cu^{2+} , Fe^{2+} และ Cr^{3+} ในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาระดับการรบกวนของไอออนโลหะที่มีโอกาสที่จะรบกวนการวิเคราะห์ในปฏิกิริยานี้

การประเมินระดับความเข้มข้นของไอออนของโลหะที่รบกวนสามารถทำได้โดยการเติมไอออนโลหะหนักที่ศึกษาลงในสารมาตรฐานโทลอกซ์เข้มข้น $10 \mu\text{M}$ ดังรูปที่ 3 แล้วพิจารณาค่าสัญญาณที่ได้ โดยถ้าสัญญาณเมื่อมีไอออนโลหะหนักมีค่าแตกต่างไปจากสัญญาณสารละลาย โทลอกซ์มากกว่า 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จะถือว่ารบกวนการวิเคราะห์



(—สัญญาณของ $10 \mu\text{M}$ โทลอกซ์, ---ขีดจำกัดต่ำสุดของโลหะหนัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 a) อิทธิพลของ Co^{2+} ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อสัญญาณการเรืองแสงของ โทลอกซ์

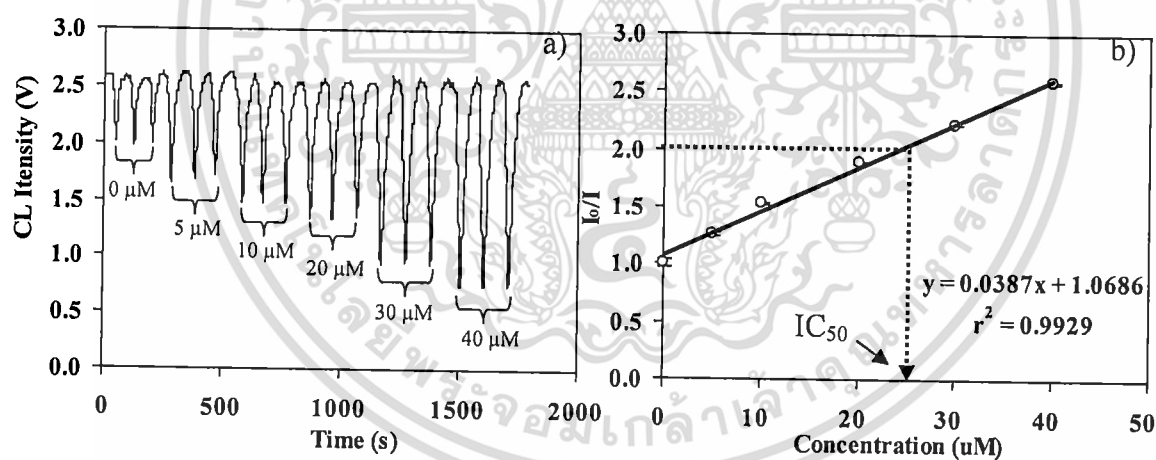
ซึ่งจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของโลหะหนักที่มากที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่รบกวนคือ Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} และ Fe^{3+} เป็นดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} ในตัวอย่างและขีดจำกัดต่ำสุดของความเข้มข้นของธาตุโลหะ

ไอออนโลหะหนัก	ช่วงความเข้มข้นในตัวอย่าง (ppm)	ระดับการรบกวน (ppm)
Fe^{3+}	0.031-0.058	0.10
Cu^{2+}	0.009-0.064	0.10
Cr^{3+}	0.016-0.024	0.10
Co^{2+}	0.040-0.043	1.00

3.3 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน

การรายงานความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดหรือ TAC โดยจะรายงานในรูปแบบของค่า IC_{50} หรือปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการลดแสงลง 50%



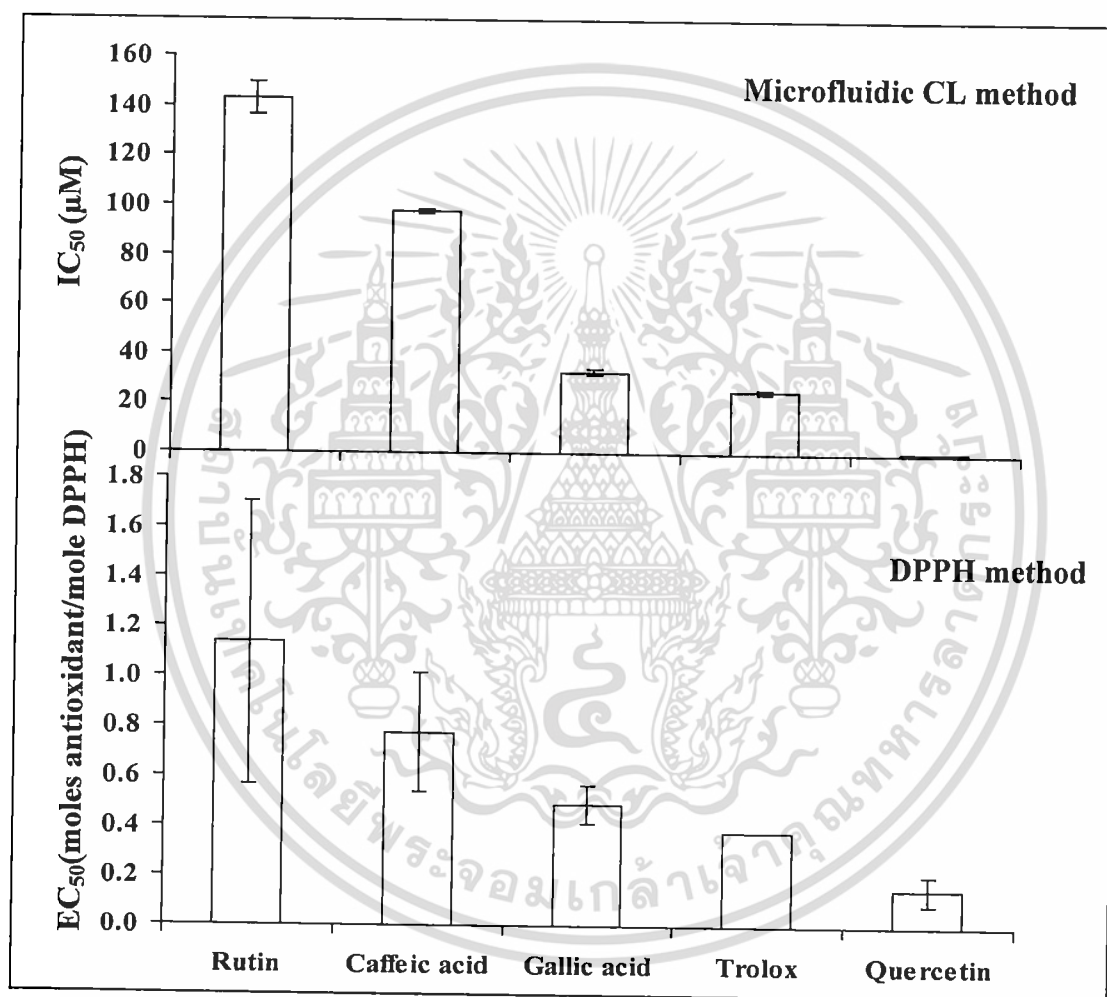
รูปที่ 4 สัญญาณ (a) และกราฟมาตรฐาน (b) ที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐาน โทลอกซ์ ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30 และ 40 μm ตามลำดับ

รูปที่ 4 a) แสดงถึงสัญญาณที่ได้จากระบบไมโครฟลูอิดิกของสารมาตรฐาน โทลอกซ์ (Error! Reference source not found.) กราฟเส้นตรงจะถูกพลอตระหว่างอัตราส่วนของความเข้มแสงก่อน (I_0) และหลังมีสารต้านอนุมูลอิสระ (I) จากรูปที่ 4 b) จะได้สมการเส้นตรง $y=0.0387\pm 1.0686$ ซึ่งจะสามารถหาค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการลดแสงลง 50% หรือค่า IC_{50} โดยการแทนที่ y ด้วย 2 จะได้ค่า IC_{50} ของ โทลอกซ์ เป็น 24.07 μM ซึ่งสามารถฐานตัวอื่นก็จะคำนวณในทำนองเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทดสอบระบบปฏิบัติการบนชิปเปรียบเทียบกับเทคนิคพีพีเอช

ได้ทำการทดสอบระบบวิเคราะห์ TAC ที่ได้พัฒนาขึ้น (Error! Reference source not found.) โดยได้ใช้เพื่อทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานซึ่งพบว่าลำดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นดังนี้คือ เคอร์ซีทิน > โทลอกซ์ > กรดแกลลิก > กรดคาเฟอิก > รุติน โดยลำดับที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองโดยเทคนิคพีพีเอช แสดงผลดังรูปที่ 5 โดยวิธีพีพีเอชจะทำตามงานวิจัยของ Parejo และคณะ (Parejo, Codina et al., 2000)



รูปที่ 5 ลำดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 สรุป analytical features ของระบบที่พัฒนาขึ้นเพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

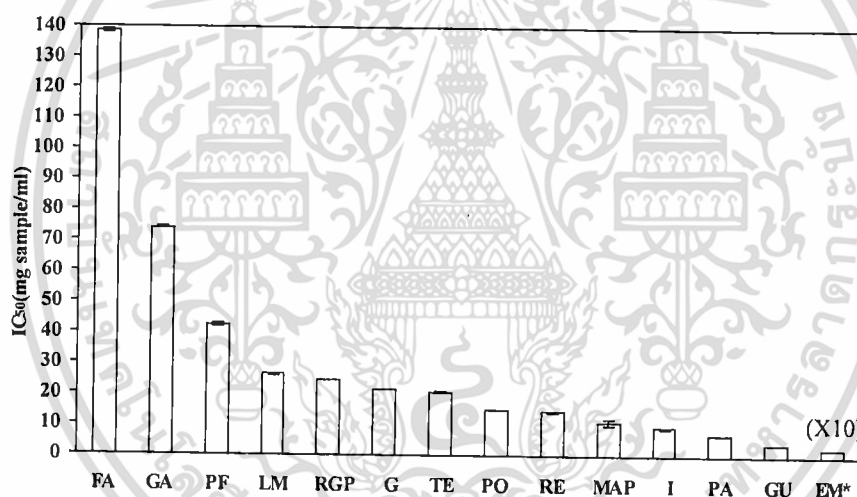
Antioxidants	เคอร์ซีทีน	โทลอกซ์	คาร์เทชิน	กรดแกลลิก	กรดคาเฟอิก	รูติน
IC ₅₀ (μM)	0.43±0.02	25.04±1.00	26.30±1.79	32.80±0.01	97.71±0.80	142.93±6.32
^a LOD (μM)	0.036	0.038	0.053	0.038	0.038	0.056
Slope	2.4173	0.0381	0.0388	0.0295	0.0105	0.0070
Linear range (μM)	0.2-1.0	5-30	10-30	10-60	10-200	20-200
Correlation coefficient (r ²)	0.999	0.997	0.995	0.998	0.999	0.995
^b %RSD	0.80	0.73	0.89	0.76	0.71	1.00

^a Limit of Detection = 3 SD ของสัญญาณการเรืองแสงจากความเข้มข้นต่ำสุด (n=10)

^b Reproducibility ของสัญญาณการเรืองแสงจากความเข้มข้นต่ำสุด (n=10)

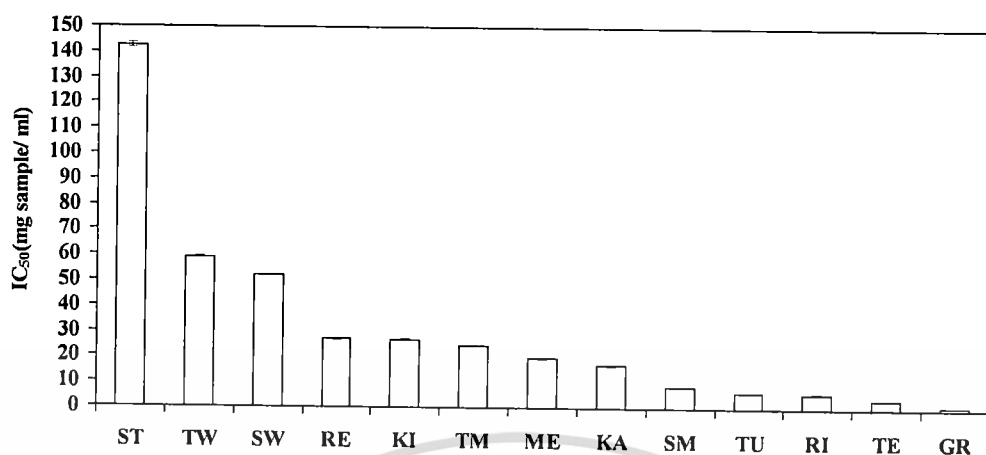
3.5 การวิเคราะห์ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม

1. กลุ่มน้ำคั้นแยกกาก



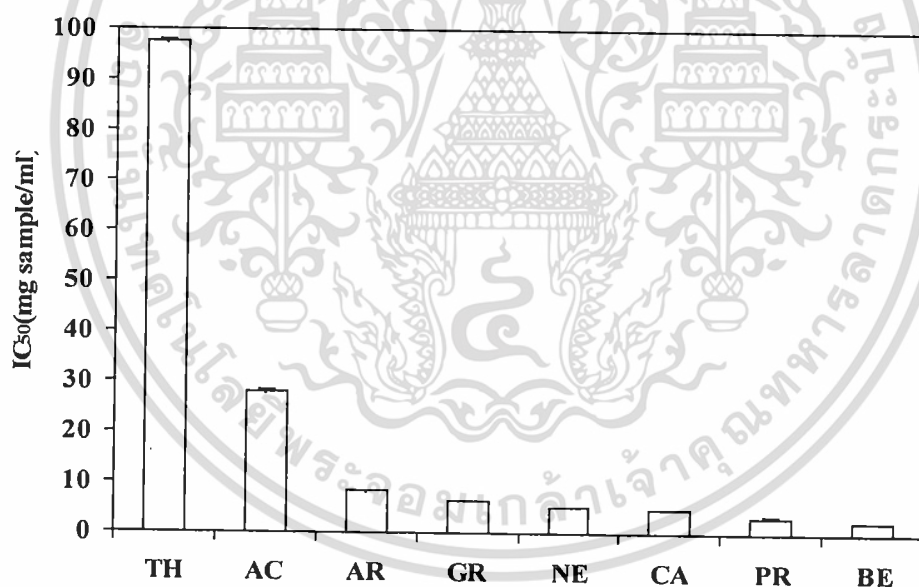
รูปที่ 6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของน้ำคั้นผลไม้แยกกาก (mean + SD, n=3) FA; แอปเปิ้ลฟูจิ, GA; แอปเปิ้ลเขียว, PF; เสาวรส, LM; มะนาว, RG; องุ่น, PG; ฝรั่งสีชมพู, TE; ส้มเขียวหวาน, PO; ทับทิม, RE; มะเขือเทศราชินี, MA; มังคุด, PI; สับปะรด, PA; มะละกอ, GU; ฝรั่ง, EM; มะขามป้อม. (*ค่า IC₅₀ ของมะขามป้อมถูกคูณด้วย 10 เพื่อให้เห็นความแตกต่าง)

2. กลุ่มสารสกัดจากผักพื้นบ้าน



รูปที่ 7 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน (mean + SD, n=3) ST; ถั่วฝักยาว, TW; ผักบุ้ง, SW; โหระพา, RE; ผักอีหาล้า, KI; สะระแหน่, TM; ผักกระโดน, ME; ผักเม็ก, KA; คენห่า, SM; ผักแพ้ว, TU; ขมิ้น, RI; ผักชะแยง, TE; ผักติ้ว, GR; ชาเขียว

3. กลุ่มเครื่องดื่ม



รูปที่ 8 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของเครื่องดื่ม (mean + SD, n=3) TH; เครื่องดื่มสมุนไพรไทย, AC; น้ำแอปเปิ้ลหมัก, AR; กาแฟสดอะราบิก้า, GR; ชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม, NE; กาแฟสำเร็จรูปผสมกาแฟสด, CA; ชาเขียวแบบซอง, PR; พรุณสกัดเข้มข้น, BE; เบอรรี่สกัดเข้มข้น

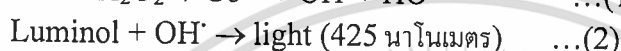
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อภิปรายและวิจารณ์ผล

1. การทดสอบการทำงานของระบบและหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

1.1 pH ของสารละลาย Luminol-Co(II)/EDTA บัฟเฟอร์

pH ของสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA เป็นพารามิเตอร์อันดับแรกในการศึกษาเนื่องจากการเรืองแสงของ luminol จะขึ้นกับค่า pH ของสารละลายโดยจะเรืองแสงได้ดีในสภาวะการทดลองที่เป็นเบส ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังสมการที่ 1 และ 2 (Parejo, Codina et al., 2000)



ในการศึกษานี้ใช้บัฟเฟอร์ชนิด sodium tetraborate เป็นตัวควบคุม pH ของสารละลาย ทำการทดลองโดยการป้อนสารละลาย H_2O_2 และสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA เข้าไปอย่างต่อเนื่องที่อัตราการไหลคงที่เท่ากับ $100 \mu\text{l}/\text{min}$ โดยไม่ฉีดสารละลายใดๆ เข้าไปในระบบ เพื่อดูค่าสัญญาณการเรืองแสงเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 1) พบว่าที่ pH มีค่า 8.5, 9.0, 9.5 และ 10.0 จะให้ค่าที่วัดได้เท่ากับ 0.12 ± 0.01 , 0.59 ± 0.03 , 1.07 ± 0.11 และ 2.35 ± 0.06 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อ pH สูงขึ้นความเข้มแสงที่วัดได้ก็มีค่ามากขึ้นด้วย ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมที่ pH มากกว่า 10.0 พบว่าเป็นช่วง pH ที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากเกิดการสลายตัวของ H_2O_2 เป็นก๊าซ O_2 เข้าไปรบกวนการวิเคราะห์ นอกจากนี้ Co^{2+} ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอาจตกตะกอนจนเกิดการรบกวนได้ ดังนั้นจึงเลือกที่ pH 10.0 สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ TAC ในขั้นตอนนี้ต่อไป เนื่องจากให้ค่าสัญญาณการเรืองแสงที่สูงเหมาะสำหรับการติดตามลักษณะสัญญาณที่มีการลดลง (negative signal) จากค่าสัญญาณการเรืองแสงเดิมเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ

1.2 อัตราเร็วในการไหลของสารละลาย

ผลการทดลองในรูปที่ 2 อัตราการเร็วในการไหลของสารละลายจะส่งผลต่อพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าสัญญาณการเรืองแสงเวลา และปริมาณสารเคมีที่ใช้ โดยเมื่ออัตราเร็วในการไหลต่ำพบว่า ค่าสัญญาณการเรืองแสงที่ได้จะสูง และเมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการไหลมากขึ้นความเข้มแสงจะค่อยๆ ลดลง เนื่องมาจากประสิทธิภาพในการผสมกันของสารที่แตกต่างกัน โดยเมื่ออัตราเร็วในการไหลสูงจะทำให้สารละลายผสมกันได้ไม่ดีพอ และจะทำให้ปริมาณของสารเคมีที่ใช้ต่อตัวอย่างมากเกินความจำเป็น ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราการไหลที่ 150 ไมโครลิตรต่อนาที เพราะให้ค่าสัญญาณการเรืองแสงที่สูงพอ และใช้สารเคมีที่ไม่มากเกินไป คือ สารละลาย H_2O_2 และสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA อย่างละ 50 ไมโครลิตรต่อการฉีดตัวอย่าง 1 ครั้ง นอกจากนี้ยังสามารถทำการวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 40 วินาทีสำหรับการวิเคราะห์ 1 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาการรบกวนจากโลหะหนัก

จากผลการทดลองพบว่าโลหะหนักที่เลือกมาทำการศึกษาทั้ง 4 ชนิดจะรบกวนระบบวิเคราะห์ที่ปริมาณค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับปริมาณที่มีอยู่จริงในตัวอย่างที่สนใจศึกษา คือมีโลหะหนักไม่เกิน 2 ppb จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES ดังนั้นในการประยุกต์ระบบที่พัฒนาขึ้นจึงไม่มีผลรบกวนจากโลหะหนักเหล่านี้

3. การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานและเปรียบเทียบกับเทคนิคดีพีพีเอช

จากการทดลองพบว่าแนวโน้มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของสารมาตรฐานทุกตัวมีทิศทางไปในแนวเดียวกันกับการทดลองโดยใช้วิธีดีพีพีเอช และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Parejo et al ซึ่งรายงานค่า IC_{50} ของ เคอร์ซีทินน้อยกว่าโทลอกซ์ ทั้งจากการทดลองด้วยวิธีดีพีพีเอช และปฏิกิริยาการเรืองแสง (Parejo, Codina et al. 2001) Ozyurt และคณะ (Ozyurt, Demirata et al. 2007) ที่ใช้เทคนิค ABTS และ CUPRAC ประเมิน TAC ของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดซึ่งได้ลำดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เหมือนกัน ซึ่งผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าระบบที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีเดิมคือวิธีดีพีพีเอช และยังให้ผลการทดลองที่แม่นยำกว่า ซึ่งจากรูปที่ 5 จะแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน (จำนวนการวิเคราะห์เท่ากับ 3) มากกว่าเทคนิคดีพีพีเอช

4. การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม

การวิเคราะห์ทำได้โดยการเจือจางสารตัวอย่างแล้วฉีดเข้าสู่ระบบผ่านทาง injection valve สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจะไปจับกับ OH^{\cdot} ทำให้ความเข้มแสงเริ่มต้นของระบบลดลงแปรผันตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง จากผลการทดสอบพบว่ากลุ่มน้ำคั้นแยกกากจากผลไม้ทั้ง 14 ชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูล OH^{\cdot} เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังแสดงในรูปที่ 6 ค่า TAC ที่พบว่าสูงในน้ำคั้นแยกกากจากผลฝรั่งขาวเป็นผลการทดลองที่สอดคล้องกับผลการทดลองของ Leong และคณะ (Leong & Shui, 2001) ที่ได้จากวิธี ABTS และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lim และคณะ (Lim, Lim et al. 2007) ที่ได้จากวิธี ดีพีพีเอช ด้วย นอกจากนี้ Garcia และ Leong (Garcia-Alonso, de Pascual-Teresa et al. 2004) ทำการหา TAC จากผลไม้เมืองร้อนได้แก่ กล้วย มะละกอ ชมพูและแตงโม ซึ่งก็ได้รายงานเช่นกันว่าผลฝรั่งมีต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าผลมะละกอซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ค่า IC_{50} ที่ต่ำอันแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงของมะขามป้อมนั้นสอดคล้องกับการทดลองของกับงานวิจัยของ X-Liu และคณะ (Liu, Cui et al. 2008) ซึ่งรายงานว่ามีปริมาณสารประกอบที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้ได้พิมพ์ใบเสนอราคาแล้ว กรุณาอย่าแก้ไขหรือเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิดฟีนอลิกที่สูงและหลายชนิดโดยทำการทดสอบสารสกัดที่ได้จาก มะขามป้อม พบว่าสารเหล่านี้สามารถต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดีเช่น tannins, geraniin, iso-corilagin, quercetin, kaempferol, lignans, favonoids และ alkaloids เป็นต้น อย่างไรก็ตามมะขามป้อมมีรสชาติที่ขมและ ฝาดทำให้ยังไม่เป็นที่นิยมนำมาทำเป็นเครื่องดื่ม ซึ่งหากมีกระบวนการในการผลิตที่สามารถเพิ่มรสชาติให้ น้ำมะขามป้อมมีรสชาติที่น่าจะพัฒนาเพื่อเป็นเครื่องดื่มเสริมสุขภาพจากไทยได้ ส่วนกลุ่มสารสกัดจากผัก พืชบ้านนั้นนอกจากชาเขียวซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีแล้วสารสกัดจากผัก พืชบ้านของไทยหรือผักตี๋มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีมากสอดคล้องกับงานวิจัยของ Maisuthisakul และคณะ (Maisuthisakul, Pongsawatmanit et al. 2006) ว่าในผักตี๋มีสารต้านอนุมูลอิสระ หลายชนิดเช่น Chlorogenic acid และ citric acid เป็นต้น ส่วนในกลุ่มของเครื่องดื่มนั้นพบว่าเบอร์รี่สกัด เข้มข้นสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

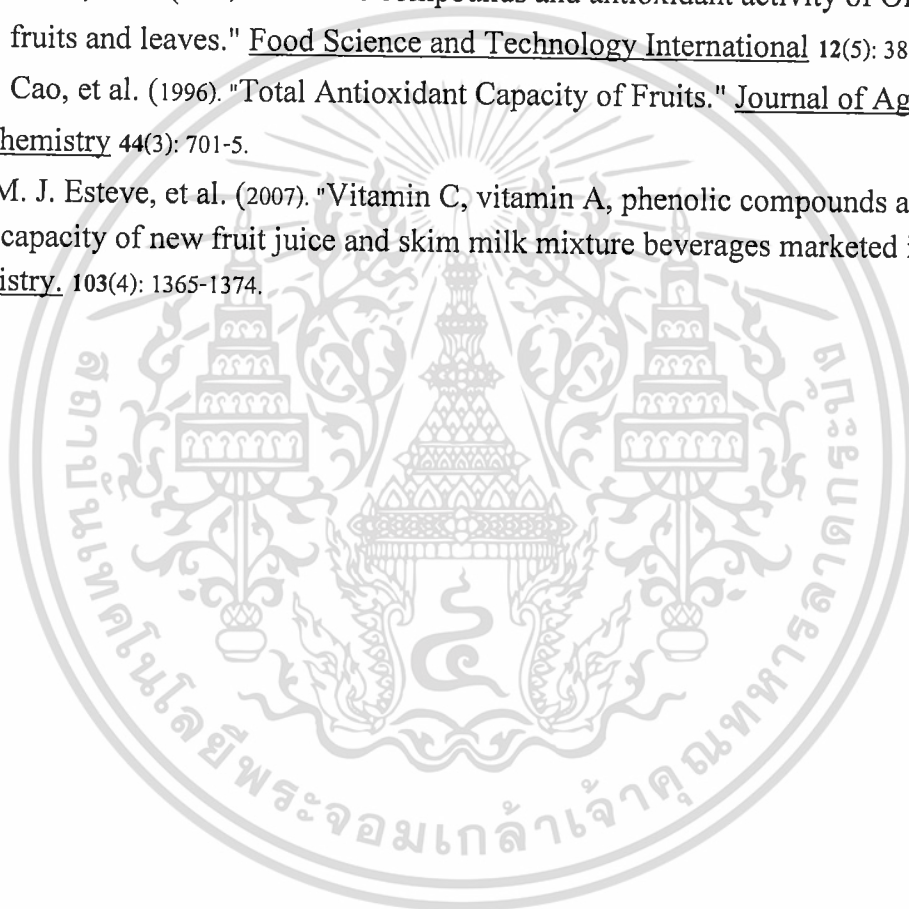
สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมโดยเทคนิคไมโครฟลูออริติคควบคู่กับปฏิกิริยาการเรืองแสงของ luminol และ OH^{\cdot} พบว่า pH ที่เหมาะสมของสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA คือ pH 10.0 เพราะ luminol เกิดการเรืองแสงมากที่สุดโดยที่ H_2O_2 ยังไม่สลายตัวและไม่เกิดการตกตะกอนของ Co^{2+} อัตราการไหลของสารละลายที่เหมาะสมคือ 150 ไมโครลิตรต่อนาที ซึ่งอัตราเร็วในการไหลนี้จะใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยและให้จำนวนตัวอย่างการวิเคราะห์ต่อชั่วโมงสูง รวมทั้งสามารถลดปริมาณการใช้สารเคมีลงได้โดยการวิเคราะห์ 1 ครั้งจะใช้ปริมาณสารตัวอย่างและปริมาณสารเคมีเพียง 50 ไมโครลิตรและ 100 ไมโครลิตรตามลำดับ การวิเคราะห์การรบกวนจากโลหะหนักพบว่าปริมาณของโลหะหนักที่ปรากฏในตัวอย่างน้ำคั้นผลไม้แยกกาก (วิเคราะห์โดยเทคนิค ICP-OES) ไม่รบกวนการวิเคราะห์ และจากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของระบบ พบว่าสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีสารต้านอนุมูลอิสระปรากฏในความเข้มข้นต่ำๆ ได้ในระดับนาโนโมลาร์ และมีความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง จากการวิจัยได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีใหม่เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมหรือ TAC จากน้ำคั้นแยกกากสารสกัดจากผักพื้นบ้าน และเครื่องดื่ม โดยใช้ปฏิกิริยาการเรืองแสงระหว่าง luminol กับ OH^{\cdot} วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาเป็นวิธีที่รวดเร็ว ให้จำนวนตัวอย่างการวิเคราะห์ต่อชั่วโมงสูง การวิเคราะห์เป็นแบบอัตโนมัติ สะดวกและเหมาะสมกับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่มีสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในน้ำ ผลการทดลองพบว่าในกลุ่มน้ำคั้นแยกกากจากผลไม้มะขามป้อมมี TAC สูงที่สุดในบรรดาน้ำคั้นผลไม้แยกกากที่นำมาเทียบ และกลุ่มสารสกัดจากผักพื้นบ้านพบว่าตัวสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด สุดท้ายคือกลุ่มเครื่องดื่มซึ่งเบอร์รี่สกัดเข้มข้นสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

บรรณานุกรม

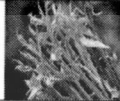








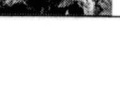
- กระทรวงสาธารณสุข, กองโภชนาการ. กรมอนามัย. (2007). "องค์ความรู้เรื่องปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้เพื่อส่งเสริมสุขภาพ (วิตามินซี วิตามินอี และ เบต้าแคโรทีน) ในผลไม้." from <http://nutrition.anamai.moph.go.th/temp/main/view.php?group=3&id=117>.
- ตระกูลทิวากร, เกศศิณี. (2547). "ผักพื้นบ้าน ผลกำไรจากท้องถิ่น." from <http://www.ku.ac.th/e-magazine/october47/agri/plant.html>.
- วัชรคุปต์, โอภา. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ RADICAL SCAVENGING AGENT. กรุงเทพฯ, นิวไทยมิตรการพิมพ์.
- Amatatongchai, M., O. Hofmann, et al. (2007). "A microfluidic system for evaluation of antioxidant capacity based on a peroxyoxalate chemiluminescence assay." Analytical and Bioanalytical Chemistry 387(1): 277-285.
- Garcia-Alonso, M., S. de Pascual-Teresa, et al. (2004). "Evaluation of the antioxidant properties of fruits." Food Chemistry 84(1): 13-18.
- Giokas, D. L., A. G. Vlessidis, et al. (2007). "On-line selective detection of antioxidants free-radical scavenging activity based on Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence by flow injection analysis." Analytica Chimica Acta 589(1): 59-65.
- Ivekovic, D., S. Milardovic, et al. (2005). "Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation." Analyst 130(5): 708-714.
- Lim, Y. Y., T. T. Lim, et al. (2007). "Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study." Food Chemistry 103(3): 1003-1008.
- Liu, X., C. Cui, et al. (2008). "Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities." Food Chemistry 109(4): 909-915.
- Magalhaes, L. M., M. A. Segundo, et al. (2006). "Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay." Analytica Chimica Acta 558(1-2): 310-318.
- Magalhaes, L. M., M. A. Segundo, et al. (2008). "Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties." Analytica Chimica Acta 613(1): 1-19.
- Maisuthisakul, P., R. Pongsawatmanit, et al. (2006). "Antioxidant Properties of Teaw (*Cratogeomys formosum* Dyer) Extract in Soybean Oil and Emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(7): 2719-2725.
- Mittler, R. (2002). "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance." Trends in Plant Science 7(9): 405-410.
- Ozyurt, D., B. Demirata, et al. (2007). "Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement." Talanta 71(3): 1155-1165.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Parejo, I., C. Codina, et al. (2001). "Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH. (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay." Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 44(3): 507-512.
- Parejo, I., C. Petrakis, et al. (2000). "A transition metal enhanced luminol chemiluminescence in the presence of a chelator." Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 43(3): 183-190.
- Pihl, J., M. Karlsson, et al. (2005). "Microfluidic technologies in drug discovery." Drug Discovery Today 10(20): 1377-1383.
- Silva, S., L. Gomes, et al. (2006). "Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves." Food Science and Technology International 12(5): 385-395.
- Wang, H., G. Cao, et al. (1996). "Total Antioxidant Capacity of Fruits." Journal of Agricultural and Food Chemistry 44(3): 701-5.
- Zulueta, A., M. J. Esteve, et al. (2007). "Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain." Food Chemistry. 103(4): 1365-1374.



ภาคผนวก (Appendix)

ตารางที่ 4 ชื่อทั่วไป ชื่อวิทยาศาสตร์และรูปภาพของตัวอย่างกลุ่มสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

ตัวอย่าง	ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์	รูปภาพ
ST	ถั่วฝักยาว	<i>Vigna sinensis</i> Savi ex Hassk.	
TW	ผักบุ้ง	<i>Ipomoea aquatica</i> Foisk.	
SW	โหระพา	<i>Ocimum basilicum</i> Linn.	
RE	Red-bead tree	<i>Adrathera paronina</i> Linn.	
KI	สะระแหน่	<i>Mentha cordifolia</i> Opizex Fresen.	
TM	Tummy wood	<i>Careya sphaerica</i> Roxb.	
ME	ผักเม็ก	<i>Syzygium gratum</i> (Wright)S.N.	
KA	คะน้า	<i>Brassica alboglabra</i> Bailey.	
SM	Smartweed, Laksa plant, Vietnamese mint	<i>Polygonum odoratum</i> Lour.	
TU	ขมิ้น	<i>Curcuma longa</i> L.	
TE	ผักติ้ว	<i>Cratoxylum formosum</i> Dyer	
GR	ชาเขียว	<i>Camellia sinensis</i> .	

ที่มา: <http://www.forest.go.th>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ชื่อทั่วไป ชื่อวิทยาศาสตร์และรูปภาพของตัวอย่างกลุ่มน้ำคั้นแยกจากจากผลไม้

ที่มา: <http://www.ku.ac.th/AgrInfo/fruit/product/index.html>

ตัวอย่าง	ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์	รูปภาพ
FA	แอปเปิ้ลฟูจิ	<i>Malus domestica</i>	
GA	แอปเปิ้ลเขียว	<i>Aphis pomi.</i>	
PF	เสาวรส	<i>Passionflora edulis</i>	
LM	มะนาว	<i>Citrus aurantifolia</i> Swing	
RG	องุ่นแดงไร้เมล็ด	<i>Vitis vinifera</i>	
PG	ฝรั่งสีชมพู	<i>Psidium guajava</i> L.	
TE	ส้มเขียวหวาน	<i>Citrus reticulata</i> Blanco.	
PO	ทับทิม	<i>Punica granatum</i> L.	
RE	มะเขือเทศราชินี	<i>Solanum lycopersicum</i> <i>cerasiforme.</i>	
MA	มังคุด	<i>Garcinia mangostana</i> L.	
PI	ดื่บประด	<i>Ananas comosus</i> Merr.	
PA	มะละกอ	<i>Carica papaya</i> L.	
GU	ฝรั่งสีขาว	<i>Psidium guajava</i> L.	
EM	มะขามป้อม	<i>Phyllanthus Emblica</i> Linn.	

ที่มา: <http://www.ku.ac.th/AgrInfo/fruit/product/index.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ชื่อและรายละเอียดของตัวอย่างกลุ่มตัวอย่างเครื่องดื่ม

ตัวอย่าง	ชื่อ	ส่วนประกอบ
TH	เครื่องดื่มสมุนไพรไทย	น้ำดอกกระดังงา, น้ำดอกมะลิ, น้ำดอกกุหลาบ, น้ำไม้จันทน์เทศ, จันทน์ชะมด, จันทน์แดง, ฟาง, พืมหาเนย, ดอกคำฝอย
AC	น้ำแอปเปิ้ลหมัก	30.00 % น้ำทับทิมเข้มข้น, 6% น้ำแอปเปิ้ลหมัก 0.02 % สารสกัดจากเมล็ดองุ่น
AR	กาแฟสดอะราบิก้า	กาแฟสดอะราบิก้าคั่ว 100%
GR	ชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม	น้ำชาเขียว 35%, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 600 ppm
NE	กาแฟสำเร็จรูปผสมกาแฟสด	กาแฟสำเร็จรูปผสมกาแฟสด
CA	ชาเขียวแบบซอง	100% ใบชาเขียวแท้
PR	พรุณสกัดเข้มข้น	พรุณสกัดเข้มข้น 86.4 %, อินนูลิน 3.5% อะคาเซีย กัม 3.5%, โอลิโกฟรุกโตส 0.5% วิตามินซี 0.1%
BE	เบอร์รี่สกัดเข้มข้น	เบอร์รี่สกัดเข้มข้น 81.5%, วิตามินซี 0.1% วิตามินอี 0.03%, วิตามินเอ 0.01%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้