

การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิคเชิงภาพ กับวิธีไมโครเพลสตีฟี่พีเอช

Comparison of Analytical Method for Antioxidant Activity between an Image Processing Technique and Microplate-DPPH assay

สุวรรณา วรรัตน์, วันชัย อินทรพิทักษ์ และวฐ พรหมพิทยารัตน์*

Suwanna Vorarat, Wanchai Intharapithak and Watoo Phrompittayarat*

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26130

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

*Email: watooop@yahoo.com, watooop@nu.ac.th,

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิธี رنگเลขนีออนโดยใช้กระดาษด้วยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพโดยใช้หลักการแยกสารบนตัวกลางกระดาษจากนั้นทำให้สารเกิดปฏิกิริยากับ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) บนตัวกลางกระดาษ แล้วสแกนภาพและแปลผลด้วยโปรแกรม Adobe photoshop CS2 และเปรียบเทียบกับวิธี DPPH-Microplate assay เพื่อได้มาซึ่งวิธีวิเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ผลการเทียบวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาโดยใช้สารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) พบว่ามีความเป็นเส้นตรง ความถูกต้องแม่นยำ และมีความสามารถในการตรวจวัดสารได้เป็นไปตามข้อกำหนด International Conference of Harmonization (ICH) guideline [9] แสดงค่าความเป็นเส้นตรง $Y = 8266.6x - 133.01$ ที่ช่วงความเข้มข้นที่ 75-175 µg/ml มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($r^2 = 0.9962$) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOQ) คือ 0.009 และ 0.03 µg/spot ตามลำดับ การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ซ้ำในช่วงเวลาเดียวกันและวิเคราะห์ต่างวันเวลาเดียวกันมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) คือ 2.29 ถึง 5.53% และ 2.95 ถึง 4.19% ตามลำดับ ความแม่นยำของวิธีให้ค่าร้อยละการคืนย้อนกลับของสารอยู่ในช่วง 101.50 ถึง 104.67% และผลค่า IC_{50} ของวิธีเทคนิคเชิงภาพมีค่าเท่ากับ 102.27 ± 2.97 µg/ml คำนวณจากโปรแกรม Graphpad prism 5 มีค่าสหสัมพันธ์ของวิธีการที่พัฒนามกับวิธีมาตรฐาน DPPH scavenging assay-microplate, $r^2 = 0.9892$ วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดหาปริมาณสารได้เป็นไปตามมาตรฐานกำหนดให้ค่ามีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ เป็นวิธีการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ต้นทุนต่ำ ปลอดภัย สะดวกกับการทดสอบในภาคสนาม ข้อจำกัดของวิธีคือการควบคุมขนาดของการจุดสารบนกระดาษขนาดและขอบเขตมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา อีกทั้งสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีสี เนื่องจากไปรบกวนการอ่านค่าฟลักเชลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ ดีฟฟีพีเอช เอสเอสซี เปเปอร์โครมาโตกราฟี เทคนิควิเคราะห์เชิงภาพ

Abstract

To develop and validate method of paper chromatography coupled with DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging assay (PC-DPPH, documented scanner and Adobe photoshop CS2 program were processed by means of an image processing program and compare with microplate assay for the purpose of quantitative determination and qualitative determination analytical method to test the antioxidant activity of health product. Validation methods were performed including linearity, % recovery, precision and sensitivity based on International Conference of Harmonization (ICH) guideline. Results of method validation used ascorbic acid as

a standard substance. Linear is good regression line $y = 8266.6x - 133.01$ at range concentration 75-175 $\mu\text{g/ml}$ and $r^2 = 0.9962$. Limit of detection (LOD) and Limit of quantitation (LOQ) were 0.009 and 0.03 $\mu\text{g/spot}$, respectively. The intra-day and inter-day precision values were 2.29-5.53% and 2.95-4.19%, respectively. The accuracy was 101.50-104.67 %. The IC_{50} of the development method was $102.27 \pm 2.97 \mu\text{g/ml}$ which calculated from computation of Graphpad prism 5. PC-DPPH test was useful for Consumer Protection Surveillance and products were available in the market and were claimed to have antioxidant properties. This is also for quality control of the product itself. The substances were environmentally friendly, low cost, simple and easy to test in the field. Specification of developed method to test spot and scope affect to reaction of DPPH. Also inappropriate to pigment sample affect to means of an image processing program.

Keywords: Antioxidant; DPPH assay; Paper chromatography; Image processing program

บทนำ

การเกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นกลไกการเกิดขึ้นทางธรรมชาติของสารที่มีการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นในบริเวณรอบข้างของโมเลกุลหรืออะตอม ทำให้เกิดความเสถียรต่ำและมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารอื่นที่อยู่บริเวณรอบๆ ของสาร โดยที่โมเลกุลข้างเคียงจะสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) [1] ซึ่งเป็นปัจจัยเอื้อต่อการเกิดการดำเนินงานที่ผิดปกติของเซลล์ และลุกลามจนเกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคข้ออักเสบ โรคสมองเสื่อม เป็นต้น [1, 2] ปัจจุบันมีการศึกษา ค้นคว้าวิจัยเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน สมุนไพร ผัก ผลไม้ หรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ในการบริโภค หรือใช้ประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระ วิธีการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใช้หลักการเปลี่ยนแปลงสีของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl:DPPH นั้นมีหลายวิธี เช่น การทดสอบด้วย Thin Layer Chromatography: TLC [4-6] High Performance Liquid Chromatography:HPLC [7], Online-Coupling- LC-MS-MS หรือ Microplate assay [1, 3] วิธีมาตรฐานและนิยมคือ วิธี DPPH Microplate assay ซึ่งมีข้อจำกัดคือ เป็นการวิเคราะห์เชิงสารผสม (Total contents) ไม่สามารถแยกชนิดของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และวิธีอื่นๆ ข้างต้นมีข้อจำกัด ได้แก่ ราคาของเครื่องมือสูง ความชำนาญการ ทำให้ต้นทุนในการ

ทดสอบสูง ทางคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography: PC) [8] ที่แยกสารโดยตัวพาที่เป็นตัวทำละลายไปบนผิวภาคของแข็งที่เป็นกระดาษพร้อมกับการวิเคราะห์ผลด้วยการใช้เทคนิคเชิงภาพผ่านฟริโปรแกรมประยุกต์ Adobe Photoshop CS2 เพื่ออ่านค่าเป็นตัวเลข พร้อมทั้งทำการตรวจสอบวิธีการวัด (Method validation) ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

Ascorbic acid Gallic acid Lutin Ellagic acid Quercetin dehydrate (Sigma-Aldrich, Germany) เมทานอล เอทานอล อะซีโตน ไตรคลอโรเอเทน (Merck, Germany) Deionization water 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany) Microplate reader (Anthos Zenyth 200rt, Austria) เครื่องคอมพิวเตอร์ พร้อมเครื่องสแกน กระดาษเซลลูโลส (Canson watercolour paper, France) กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, English) กระดาษวาดเขียน กระดาษปอนด์ (DHA Siamwalla, Thailand)

วิธีการดำเนินการวิจัย (Methods)

การศึกษาความเข้มข้นสาร DPPH ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 0.75 0.5 0.25 และ 0.125 มิลลิโมล และ Ascorbic acid ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบในกระดาศขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 3 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น แผ่นที่หนึ่งจุ่มลงในสารละลาย พักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอให้แห้ง จากนั้นจุ่มในหลุมสารละลาย DPPH ในแต่ละความเข้มข้น และแผ่นที่สองจุ่มในสารละลาย Ascorbic acid ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง สังเกตความเข้มของสีม่วงที่เกิดขึ้นที่สามารถมองเห็นสีม่วงบนกระดาศได้ด้วยตาเปล่า พร้อมทั้งสังเกตภาพความเข้มสีที่เป็นตัวเลขเปรียบเทียบและบันทึกผล

การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของวัฏภาคหนึ่ง (Stationary phase)

ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของกระดาศชนิดต่างๆ (กระดาศปอนด์ กระดาศวาดเขียน กระดาศกรองเบอร์ 1 และกระดาศเซลลูโลส) ที่ขนาดกว้างและยาว 3 และ 5 เซนติเมตร ตามลำดับ จากนั้นจุดสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปบนกระดาศจุดละ 2 ไมโครลิตร รอให้แห้ง จากนั้นนำแผ่นกระดาศแต่ละชนิดมาทำการใส่ลงในแท่งแก้วที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่แต่ละชนิดที่อ้อมตัวอยู่ เพื่อศึกษาคุณสมบัติการแยกสารบนกระดาศแต่ละชนิด

การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายในวัฏภาค

เคลื่อนที่(Mobile phase)

การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแต่ละองค์ประกอบในวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน ไตรล และน้ำกลั่น นำมาผสมตามอัตราส่วนดังนี้ เมทานอล: น้ำ (10: 0) เมทานอล: น้ำ (9:1) เมทานอล: น้ำ (8:2) เมทานอล: น้ำ (7:3) อะซิโตน ไตรล: น้ำ (7:3) และเอทานอล: น้ำ (7:3) แล้วนำมาใช้ในการเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบค่าการนำพาสารเคลื่อนที่บนวัฏภาคหนึ่ง (Rf value)

การเตรียมสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Stock solution) Ascorbic acid ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซัง Ascorbic acid 25 มิลลิกรัมใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรจนครบ ด้วย 50% เมทานอล

สารละลายมาตรฐาน (Working standard) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10 ถึง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 75 ถึง 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมตัวอย่าง(น้ำส้ม เครื่องดื่ม น้ำมันมะรุม) บีบผลไม้สดให้ได้ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ละลายใน 50 % เมทานอล 900 ไมโครลิตร

การอ่านและแปลผลด้วยเทคนิคเชิงภาพ

นำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษที่ผ่านการทดสอบและแห้ง นำมาวิเคราะห์ข้อมูลเชิงภาพด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 โดยนำมาสแกนและบันทึกเป็นไฟล์ภาพบันทึกลงคอมพิวเตอร์เป็นไฟล์ภาพ (.JPEG) ใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 เปิดไฟล์ภาพที่จะแปลผล เลือกแถบเครื่องมือ magic wand เพื่อให้มีการ converse จากสีจางเป็นสีเข้ม บริเวณพื้นที่ที่มีสีของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับสาร DPPH เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีดำ แล้วโปรแกรมจะแปรผลของความเข้มสีและขนาดบริเวณที่เป็นจุดเป็นค่าตัวเลข นำค่าพิกเซลที่อ่านได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับความเข้มข้นของสาร

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

เตรียมสารมาตรฐานในการทดสอบคือ Ascorbic acid Gallic acid Lutin Ellagic acid และ Quercetin dehydrate ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน 50% เมทานอล นำจุดสารละ 5 ไมโครลิตร บนกระดาศ PC แล้วใส่ลงในแท่งแก้วที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่อ้อมตัว เมื่อกระบวนการแยกเสร็จ นำแผ่นกระดาศ PC ขึ้นมารอให้แห้ง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลาย DPPH แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำกระดาศ PC ไปสแกนภาพ และวัดค่า Rf

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารมาตรฐานแอสคอร์บิก แอซิด ในช่วงความเข้มข้น 5 ความเข้มข้นประกอบด้วย 75 100 125 150 และ 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แปลผลโดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 นำค่าที่ได้จาก

โปรแกรมสร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าพิกเซลที่วัดจากการใช้เทคนิคเชิงภาพ กับ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r^2)

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัดสาร (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณของสาร (Limit of quantitation, LOQ)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.025 0.050 0.075 0.100 0.125 0.150 และ 0.200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารไปจุดบน PC จุดละ 5 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงในแท่งแก้วที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่อิมตัว เมื่อกระบวนการแยกเสร็จ นำแผ่นกระดาษ PC ขึ้นมารอให้แห้ง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลาย DPPH แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง วัดความเข้มสีโดยการสแกน แปลผลในหน่วยของค่าพิกเซลที่ได้ เพื่อเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ด้วยตาเปล่าและความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ได้ และวิเคราะห์วิธีการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัดสาร (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการหาปริมาณได้ถูกต้อง (LOQ)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เตรียมสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นของ Standard curve ที่ใช้ในการศึกษา ใส่ลงในตัวอย่างน้ำส้ม โดยที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายในตัวอย่างน้ำส้มมีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 90 110 และ 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา % recovery

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

เตรียมตัวอย่างสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 100 125 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทดสอบความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ทดสอบตัวอย่างในวันเดียวกัน (Intra-assay) และระหว่างวัน (Inter-assay) เป็นเวลา 3 วัน คำนวณหาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (Relative standard deviation, %RSD)

DPPH-scavenging assay ด้วยเครื่อง Microplate reader

ปิเปตสารมาตรฐาน Ascorbic acid หรือสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ในแต่ละความเข้มข้น ใน 96-well plate ในความเข้มข้นต่างๆ โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นใส่สาร DPPH ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิโมล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมตัวอย่าง โดยใช้ Negative control เป็นเมทานอล 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร เขย่าและนำไปบ่มที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณหาค่า %Inhibition สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี PC กับวิธี DPPH scavenging microplate assay

วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยวิธี PC ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธี DPPH scavenging microplate assay โดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) จากการแปลผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 5

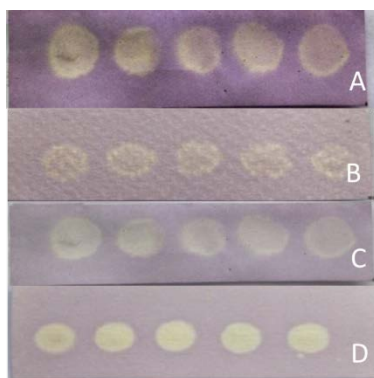
ผลการทดลอง

ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ที่เหมาะสม

ผลการเปรียบเทียบการติดสีม่วงของสารละลาย DPPH บนกระดาษ ในการทดสอบเตรียมความเข้มข้นที่ 0.125 ถึง 1 มิลลิโมล ของสารละลาย DPPH พบว่าความเข้มข้นที่น้อยกว่า 0.50 มิลลิโมล มีการติดสีจาง ในระยะเวลาที่กำหนด (3-5 นาที) เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่สูงกว่าที่ 0.75 และ 1 มิลลิโมล พบว่าค่าความเข้มข้นที่ 0.75 มิลลิโมล มีสีที่เข้มและเด่นชัดไม่ต่างจากความเข้มข้นที่สูงกว่า เพื่อการประหยัดสาร DPPH แต่ให้ความเข้มสีที่ไม่ต่างกัน ฉะนั้นความเข้มข้นของสาร DPPH ที่เหมาะสม คือ 0.75 มิลลิโมล

ผลการศึกษาวัฏภาคนิ่ง (Stationary phase) ที่เหมาะสม

จากการเปรียบเทียบคุณสมบัติกายภาพของการดูดซับของสาร โดยที่กระดาษแต่ละชนิดมีความต่างกันที่ความแข็ง-อ่อนของกระดาษ และเนื้อกระดาษมีความละเอียด-ความหยาบ เนื่องจากร้อยละของชนิดและความบริสุทธิ์เซลลูโลสต่างกันในแต่ละชนิด โดยการศึกษาขนาดของจุด และขอบเขตของการเกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยาระหว่างสารมาตรฐานกับสาร DPPH พบว่ากระดาษเซลลูโลสให้คุณสมบัติที่ดีในการดูดซับสารคือ เมื่อจุดสารลงบนกระดาษเซลลูโลส มีความสามารถในการดูดซับสารได้ดีและแห้งไว ความคงตัวในวัฏภาคเคลื่อนที่พบว่ากระดาษที่มีค่าส่วนประกอบเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีคุณสมบัติในการดูดซับสารละลาย DPPH ได้เข้มข้นกว่า มีขอบวงของจุดมีความชัดเจนมากกว่า และวงจุดที่ได้องเล็กลงทำให้การวิเคราะห์ผลมีความแม่นยำมากขึ้น ผลตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการเกิดสีของ A- กระดาษกรองเบอร์ 1 B- กระดาษปอนด์ C- กระดาษวาดเขียนและ D- กระดาษเซลลูโลส และขอบเขตของ Spot ของสารเกิดปฏิกิริยาของ DPPH และ Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

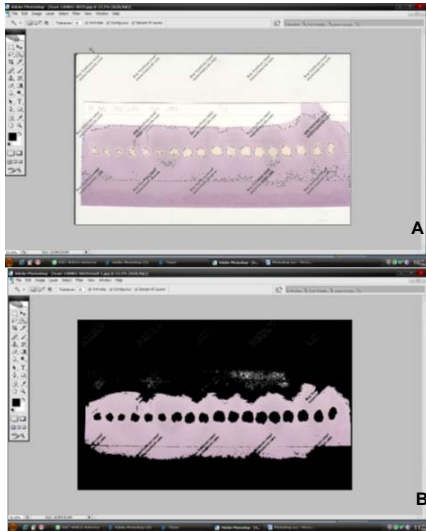
การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) และความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

จากการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลาย ในวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยอาศัยทฤษฎี

ของความมีขั้วของสาร คุณสมบัติในการแยกและความปลอดภัยมาใช้ในการเลือก เนื่องจากสารมาตรฐานและสารที่ทดสอบเป็นสารที่มีความมีขั้วสูง จึงได้ทำการเลือกเมทานอลที่เป็นสาร semipolar ($P' = 5.1$) แทนตัวทำละลายอื่นได้แก่ อะซิโตนไนไตรล์ ที่มีความเป็นพิษสูงกว่า นอกจากนี้เอทานอล แม้จะมีความเป็นพิษน้อยกว่าแต่คุณสมบัติการแยกสารไม่ดีเท่าเมทานอล ผสมกับน้ำที่เป็นสารที่มีความมีขั้วสูง ($P' = 10.2$) ในอัตราส่วน ดังนี้คือ ปริมาณเมทานอล 100 % และลดลงเป็น 90 80 และ 70 % ตามลำดับ เพื่อหาค่าที่ระยะทางของสารเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ผลการทดสอบพบว่า อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำ 10:0 9:1 8:2 7:3 ค่า Rf values ของ Ascorbic acid มีดังนี้ 0.1 0.3 0.4 และ 0.5 ตามลำดับ เมื่อลดปริมาณเมทานอลและเพิ่มปริมาณน้ำในวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ความสามารถในการนำพาสารมาตรฐาน Ascorbic acid เคลื่อนที่ไปได้ดี แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในปริมาณสูงขึ้น น้ำจะถูกดูดซับบนกระดาษที่เป็นเซลลูโลสทำให้เกิดจากฟองตัว และทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนผ่านกระดาษได้ไม่ดีและทำให้เกิดการแยกสารได้ผลไม่ดี อัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายเมทานอลต่อน้ำคือ 70:30 แต่เมื่อทดสอบกับตัวทำละลายอื่น ได้แก่ อะซิโตนไนไตรล์ และเอทานอล ให้ค่า Ascorbic acid ดังนี้ 0.0 และ 0.2 ตามลำดับ

ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

การศึกษาความเป็นเส้นตรงของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Ascorbic acid กับค่าความตอบสนองในการอ่านอนุมูลอิสระที่แปรผลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 มีค่าเป็นค่าพิกเซล นามาสรางกราฟความสัมพันธ์ ที่มีค่าความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.375-0.875 ไมโครกรัมต่อจุดสาร (75-175 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร 5 ไมโครกรัมต่อ spot) ได้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยมีสมการ $y = 8266.6x - 133.01$ และมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ที่ $r^2 = 0.9962$ แสดงว่ามีความสัมพันธ์เป็นกันเชิงบวกระหว่างค่าความเข้มข้นของ Ascorbic acid กับค่าความตอบสนองในการอ่านอนุมูลอิสระที่แปรผลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 มีค่าเป็นค่าพิกเซล ตามรูปที่ 2



รูปที่ 2 PC โครมาโตแกรมของสาร Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ภาพโครมาโตแกรมปกติ (A) และ ภาพโครมาโตแกรมที่มีการ converse สีเป็น White-Black (B)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

จากผลการทดสอบสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในตัวอย่างพืชและผลไม้โดยเปรียบเทียบของค่า Rf ของสาร Ascorbic acid เมื่อทดสอบในวัฏภาคเคลื่อนที่อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำ คือ 70:30 กับสารชนิด Rutin Gallic acid และ Quercetin ได้ตามตารางที่ 1 พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้ความสามารถแยกสารดังกล่าวออกจากกันได้

ตารางที่ 1 แสดงค่า Rf ของสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

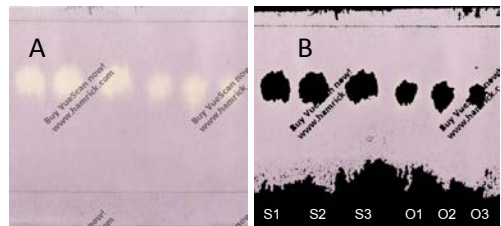
สาร	ค่า Rf
Ascorbic acid	0.56
Rutin	0.33
Gallic acid	0.44
Quercetin	0.22

การทดสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยการคำนวณหาร้อยละการคืนย้อนกลับ (% Recovery) จากการเติมตัวอย่างในสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ช่วงความเข้มข้น 90-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า % Recovery อยู่ระหว่าง 101.50-104.67% ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถยอมรับได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำของวิธี

เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาบนกระดาษกับวิธี DPPH scavenging assay- Microplate

ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ของวิธีมาตรฐานสเปกโตรโฟโตเมตรี (DPPH assay – microplate) และวิธีเทคนิคเชิงภาพที่พัฒนา (PC-DPPH assay) โดยทำการวิเคราะห์เครื่องดื่มที่มีส่วนผสม Ascorbic acid ได้ค่า 13.86 ± 0.23 และ 16.24 ± 0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับตามรูปที่ 3 เป็นโครมาโตแกรมที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเทคนิคเชิงภาพ



รูปที่ 3 PC โครมาโตแกรมของสาร Ascorbic acid (S)

ความเข้มข้น 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (n=3) และตัวอย่างตัวอย่างน้ำส้ม (n=3) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ภาพโครมาโตแกรมปกติ (A) และ ภาพโครมาโตแกรมที่มีการ converse สีเป็น White-Black (B)

แสดงว่าการวิเคราะห์หาปริมาณได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบช่วงของความเข้มข้นต่างๆ ของ Ascorbic acid ในช่วงเดียวกันโดยใช้ค่าความเข้มข้นที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของวิธีการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์สเปกโตรโฟโตเมตรีมีค่าเท่ากับ 10.17 ± 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลของวิธีเทคนิคเชิงภาพมีค่าเท่ากับ 102.27 ± 2.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณ

ด้วยโปรแกรม Graphpad prism แสดงว่าวิธีสเปคโตรโฟโตเมตริกมีค่า IC₅₀ น้อยกว่า มีความไวต่อการทดสอบมากกว่า หรือ การวัดปฏิกิริยาของสาร DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระดีกว่าการใช้ PC หรือเนื่องมาจากข้อจำกัดในการวิเคราะห์ คือ คุณสมบัติของกระดาษที่ใช้เป็นตัวกลางในการดูดซับสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้น มีความสามารถในการดูดซับสารที่จำกัด และเมื่อทำปฏิกิริยากับสาร DPPH จึงทำให้ค่าความเข้มสีที่แปลผลด้วยโปรแกรม Adobe photoshop CS2 ออกมาเป็นค่าพิกเซลคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระจนระดับที่ความสามารถของกระดาษดูดซับได้

สรุปและเสนอแนะ

วิธีที่ได้พัฒนาขึ้น (PC-DPPH assay) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่สามารถหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้หลักการการแยกสารด้วยกระดาษเซลลูโลส เก็บข้อมูลด้วยการสแกนภาพ และแปลผลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่ ผ่านกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อเป็นวิธีที่ความถูกต้องและแม่นยำของวิธีการทดสอบตามข้อกำหนดตามเกณฑ์การยอมรับของ International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use และ FDA guideline ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้ เป็นวิธีทางเลือกที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สะดวก ง่าย ประหยัด ปลอดภัยแก่ผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม

ข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการปฏิบัติการจุดสารลงบนกระดาษขนาดของจุดสารและขอบเขตมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาและมีผลต่อการอ่านค่าพิกเซล อีกทั้งวิธียังไม่เหมาะต่อการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระที่มีสี เนื่องจากไปรบกวนการอ่านค่าพิกเซลด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2

เอกสารอ้างอิง

- [1] โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจู, จันทนา บุญยะรัตน์, มาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: 2549. พี.เอส.พรินท์; พิมพ์ครั้งที่ 1.
- [2] Cadenzas, E., Packer, L. *Handbook of antioxidants*, Dekker: New York, 1996.
- [3] Saga, B; Kedare, R; Singh, P. *J Food Sci Technol*. 2011; 48: 412-422.
- [4] ปณิตา พัฒนาคิน. รงคเลขผิวนาง (Thin Layer Chromatography) การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : 2550. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1
- [5] Peiwu, L. Hopia, A. Jani, S. Yrjönen, T., Vuorela, H. TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology. [สืบค้นเมื่อ 14 มีนาคม 2557]. เข้าถึงได้จาก URL: <http://www.regional.org.au>.
- [6] ลาวลย์ ศรีพงษ์, ปณิตา ไยภักดี, อุทัย โสชนะพันธุ์. การตรวจวัดปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันด้วยวิธีรงคเลขผิวนางโดยใช้เทคนิคเชิงภาพ. 2546. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- [7] Kowalska, I; Ciesla, L; Oniszczyk, T; Waksmundzka-Hajnos, M; Oleszek, W; Stochmal, A. *J of Liq Chromatogr & relat Technol*. 2013; 36, 2387-2389.
- [8] Yan, R., Cao Y., Yang, B., *Molecules*. **2014**; 19: 4409-4417.
- [9] ICH Guideline. [เข้าถึงเมื่อ 2557 ม.ค. 24]. เข้าใจได้จาก http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1Step4/Q2_R1_Guideline.pdf