



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติสำหรับประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้ม
กวนไม้

**A Prototype of Automated Tool for Assessment of Anti-oxidant Capacity of
Wood Vinegar**

นายณัฐวุฒิ เชิงชั้น

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติสำหรับประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้ม
กวนไม้

**A Prototype of Automated Tool for Assessment of Anti-oxidant Capacity of
Wood Vinegar**

นายณัฐวุฒิ เชิงชั้น

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติสำหรับประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ
น้ำส้มควันไม้

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 280,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 ถึง 30 กันยายน 2555

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ นายณัฐวุฒิ เชิงชั้น

สาขาวิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
ทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาหลักการสำหรับประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เทคนิค Sequential Injection Chromatography, SIC ร่วมกับการตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี และได้พัฒนาหัวไฟฟ้าอ้างอิงแบบระนาบเพื่อใช้ร่วมในการตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี จากการทดสอบหัวไฟฟ้าอ้างอิงแบบระนาบที่พัฒนาขึ้น สามารถที่จะนำไปใช้เป็นหัวไฟฟ้าอ้างอิงในการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีได้ แต่ ยังให้สัญญาณในการตรวจวัดที่ไม่คง และยุ่งยากในการเตรียม จึงได้เปลี่ยนมาใช้ในการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เทคนิคทางแสงแทนหลักการของวิธีคือ จะทำการแยกสารต้านอนุมูลอิสระสามชนิดได้แก่ กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินจอล ขึ้นแรกจะศึกษาโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง ร่วมกับคอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง(Chromolith® HPLC column) สภาวะการทดลองที่เหมาะสมคือ ใช้สารละลายเมทานอล(ความเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร) ที่มีกรดอะซิติก ร้อยละ 2 โดยปริมาตรเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร ซึ่งใช้เป็นสภาวะการทดลองเบื้องต้นสำหรับเทคนิค SIC จากนั้นหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของเทคนิค SIC ซึ่งได้เป็น เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมทานอล(ความเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยปริมาตร) ที่มีกรดอะซิติก ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 264 นาโนเมตร จากการทดลองศึกษาความเป็นเส้นตรง ได้ค่า r^2 ในช่วง 0.9974 – 0.9989 จากนั้นนำไปใช้วิเคราะห์กับตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ ผลที่ได้ยังไม่พบสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างชนิดเดียวกันด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นได้ออกแบบชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติขึ้น เพื่อใช้สำหรับประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มควันไม้ และจะได้พัฒนาชุดต้นแบบเพื่อต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ : น้ำส้มควันไม้, สารต้านอนุมูลอิสระ, Sequential Injection Chromatography, คอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง

Research Title: A Prototype of Automated Tool for Assessment of Anti-oxidant Capacity of Wood Vinegar
Researcher: Mr.Nathawut Choengchan
Faculty: Science **Department:** Chemisrtry

ABSTRACT

Sequential Injection Chromatography (SIC) system was developed as prototype of automated tool for assessment of anti-oxidant capacity with electrochemical determination. And Planar Reference Electrode (PRE) was developed for electrochemical determination. The fabricated PRE was characterized. The results show that the PRE is capable for applying as reference electrode. But the PRE has unstable response and complicated fabrication. Hence UV-visible spectrophotometry was employed. A determination principle is separation and determination of anti-oxidants (gallic acid, vanillic acid and syringol). Firstly, high performance liquid chromatography (HPLC) with monolithic column (Chromolith® HPLC column) was used. The optimal condition is methanol (10%) with acetitic acid(2%) was exploited as mobile phase, flow rate was fixed at 1.0 ml min^{-1} and monitored at 264 nm. This condition was used for preliminary study for SIC. The optimal condition of SIC is methanol (5%) with acetitic acid (2%) was exploited as mobile phase, flow rate was fixed at 1.0 ml min^{-1} and monitored at 264 nm. The SIC, good linearity ranges were achieved for all studied anti-oxidants (r^2 between 0.9974 – 0.9989). The SIC was applied to analysis of anti-oxidant in wood vinegar. The anti-oxidant was not found in sample, which is consistent with results on the same samples by HPLC. Then, prototype of automated tool designed for assessment of anti-oxidant capacity and will be developing for a commercial.

Keywords : wood vinegar, anti-oxidant, Sequential Injection Chromatography and monolithic column

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานวิจัยตามโครงการนี้ สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์เป็นอย่างดี เนื่องด้วยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ในโอกาสเดียวกัน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ที่สนับสนุนและให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี

นายณัฐวุฒิ เจริญชัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญภาพ.....	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	6
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม.....	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	10
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	10
3.2 การดำเนินการวิจัย.....	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	15
4.1 การทดสอบการใช้ได้ของ Planar reference electrode ที่สร้างขึ้น.....	15
4.2 พัฒนาหลักการประเมินฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ.....	23
4.2 ศึกษาการนำไปใช้กับตัวอย่างน้ำส้มควันไม้.....	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	33
5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย.....	33
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง.....	36
ภาคผนวก.....	37
ภาคผนวก ก.....	37
ภาคผนวก ข.....	40
ประวัตินักวิจัย.....	41

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 1.....	20
4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 2.....	21
4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 3.....	23

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 ระบบซีควานเซียมอินเจกชัน (SIA).....	7
3.1 Planar reference electrode (ขั้วโลหะนิกเกิล).....	11
3.2 Planar reference electrode (ขั้วสายไฟ).....	12
4.1 Cyclic voltammograms ของ Glassy Carbon Electrode เมื่อใช้ Commercial Reference Electrode (Ag/AgCl) และ PREs เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ก. ลักษณะ Cyclic voltammogram ของ PRE ที่ผ่านการทดสอบ; ข. ลักษณะ Cyclic voltammogram ของ PRE ที่ไม่ผ่านการทดสอบ.....	15
4.2 การตอบสนองต่อไอออนคลอไรด์ ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 10^{-5} M ถึง 10^{-1} M.....	16
4.3 การตอบสนองต่อไอออนไฮโดเจนฟอสเฟต ในสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดเจนฟอสเฟตในช่วงความเข้มข้น 10^{-5} M ถึง 10^{-1} M.....	16
4.4 การตอบสนองต่อไอออนไนเตรต ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรตในช่วงความเข้มข้น 10^{-5} M ถึง 10^{-1} M.....	17
4.5 การตอบสนองต่อไอออนโบรไมด์ ในสารละลายโพแทสเซียมโบรไมด์ไรต์ในช่วงความเข้มข้น 10^{-5} M ถึง 10^{-1} M.....	17
4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างผลต่างค่าศักย์ไฟฟ้ากับไอออนลบชนิดต่างๆ.....	18
4.7 แผ่นซิลเวอร์แช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน.....	18
4.8 แผ่นซิลเวอร์แช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์.....	19
4.9 แผ่นซิลเวอร์แช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	19
4.10 รูปถ่าย EDX แสดงตำแหน่งที่จะวิเคราะห์บนแผ่นซิลเวอร์ 3 ตำแหน่ง.....	20
4.11 แสดง Spectrum ณ ตำแหน่งที่ 1.....	20
4.12 แสดง Spectrum ณ ตำแหน่งที่ 2.....	21
4.13 แสดง Spectrum ณ ตำแหน่งที่ 3.....	22
4.14 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซลินิกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 75 โดยปริมาตร.....	23
4.15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซลินิกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร.....	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.16 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิก ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 25 โดยปริมาตร.....	24
4.17 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิก ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร.....	24
4.18 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิก และสารละลายมาตรฐาน เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแต่ละชนิด เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร.....	25
4.19 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิก และสารละลายมาตรฐาน เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแต่ละชนิด จากเทคนิค SIC โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC	26
4.20 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิก และสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร.....	27
4.21 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิก เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์อะซิติก พีเอช 3.6.....	28
4.22 กราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก.....	29
4.23 กราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระกรควานิลลิก.....	29
4.24 กราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระไซลินิก.....	30
4.25 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระลง ไป.....	31
4.26 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระ กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิก ลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละชนิด เป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	31
4.27 โครมาโทแกรมจากเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานของ สารต้านอนุมูลอิสระลงไป.....	22

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.28 โครมาโทแกรมจากเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานของ สารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลีนจอล ลงไป ความเข้มข้นสุดท้าย ของแต่ละชนิดเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	32
5.1 ชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติสำหรับการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ.....	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

1.1.1 น้ำส้มควันไม้คืออะไร

น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar หรือ Pyroligneous acid) เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการเผาถ่านไม้ กล่าวคือในกรรมวิธีการผลิตถ่านไม้จะต้องเผาฝืน ในระหว่างเผาและกำหนดให้อุณหภูมิของเตาเผาเท่ากับ 300 ถึง 400 องศาเซลเซียส จะได้ควันสีขาวปนเหลือง กลิ่นฉุนจัด หากต่อท่อนำควันนี้แล้วทำให้เกิดการควบแน่นจะได้ของเหลวสีเหลือง เมื่อนำมากรองและตกตะกอน จะได้ของเหลวที่ใสขึ้นของเหลวนี้คือ น้ำส้มควันไม้ นั่นเอง โดยน้ำส้มควันไม้มี 2 ประเภท คือ น้ำส้มควันไม้ดิบ และ น้ำส้มควันไม้กลั่น [1] น้ำส้มควันไม้ดิบ จะได้จากการนำของเหลวที่กลั่นได้จากการเผาถ่านตั้งทิ้งไว้ 90 วันให้อุณหภูมิต่างๆที่แขวนลอยอยู่ ตกตะกอนแล้วนำไปกรอง ส่วนน้ำส้มควันไม้กลั่นจะนำน้ำส้มควันไม้ดิบมากลั่นต่อที่ 70 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ประโยชน์

1.1.2 การใช้ประโยชน์จากน้ำส้มควันไม้: เปรียบเทียบในต่างประเทศกับในไทย

ในต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น ได้มีนักวิจัยพบว่า สารสกัดจากน้ำส้มควันไม้ที่ได้จากการเผาไม้ไผ่สามารถออกฤทธิ์ต้านการแพ้ (Anti-allergy) ได้ และกลุ่มนักวิจัยดังกล่าว ได้จัดสิทธิบัตรกรรมวิธีการเตรียมน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่เรียบร้อยแล้ว [2] หรือ ในบางประเทศอาจนำสารสกัดจากน้ำส้มควันไม้ไปผลิตเป็นอาหารเสริม นอกจากนี้ ยังมีรายงานการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอางอีกด้วย [3]

สำหรับในประเทศไทย เกษตรกรนิยมนำน้ำส้มควันไม้ (ที่ยังไม่ได้ผ่านการสกัด) ซึ่งเตรียมเองด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่น ไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เช่น นำไปใช้ฉีดพ่นใบเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช หรือ รดโคนต้นไม้เพื่อป้องกันและกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจเป็นสาเหตุของโรครากและโคนเน่า [3] นอกจากนี้ ยังนำมาใช้ภายในครัวเรือน เช่น นำมารักษาแผลสด เป็นต้น ถึงแม้ว่าการนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าว จะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่ค่อยมีการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ น้ำส้มควันไม้แต่อย่างใด (หากเทียบกับต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังไม่ค่อยมีการศึกษาวิจัยถึงประโยชน์ของน้ำส้มควันไม้อย่างลึกซึ้งจริงจัง การนำไปใช้ประโยชน์จึงยังไม่ค่อยแพร่หลาย

1.1.3 ทำไมต้องประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควันไม้

ในน้ำส้มควันไม้ นอกจากจะประกอบด้วยกรดอะซิติกซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังอุดมไปด้วยสารประกอบจำพวกฟีนอล (Phenolic compounds) เป็นจำนวนมาก ซึ่งสารประกอบฟีนอลนี้เองที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง และป้องกันการเกิดรอยเหี่ยว

ย่นได้ ดังนั้น หากมีผลการศึกษาเพื่อยืนยันถึงฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของน้ำส้มควันไม้ ก็น่าจะเป็นการกระตุ้นให้มีการนำน้ำส้มควันไม้ไปใช้ประโยชน์ได้ในวงกว้างมากกว่าแค่เพียงนำไปใช้ทดแทนยาฆ่าแมลงหรือยาปราบศัตรูพืช กล่าวคือ อาจนำสารสกัดจากน้ำส้มควันไม้ไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริมหรือเครื่องสำอางค์ เท่ากับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำส้มควันไม้ได้อีกทางหนึ่ง และหากได้รับการส่งเสริมอย่างต่อเนื่อง อาจทำให้สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศได้ด้วย

1.1.4 ทำไม่ต้องใช้วิธีอัตโนมัติเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ในการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนั้น มักจะรายงานฤทธิ์หรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในรูปของตัวเลขที่เรียกว่า 'IC 50' [4] ซึ่งหมายถึง ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้สัญญาณของอนุมูลอิสระ ลดลง 50 % จากสัญญาณเริ่มต้น ขั้นตอนการหาค่า IC 50 นี้ มี 2 ขั้นตอน คือ

1) ขั้นตอนการเจือจาง โดยเจือจางสารสกัดที่ต้องการหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในหลายๆอัตราส่วน

2) ขั้นตอนการตรวจวัด นำสารสกัดที่เจือจางแล้วในแต่ละอัตราส่วนไปทำปฏิกิริยากับสารที่ใช้เป็นตัวแทนอนุมูลอิสระ แล้วติดตามสัญญาณที่เปลี่ยนไป

จะต้องทำขั้นที่ 1 และ 2 นี้ ซ้ำกันไปเรื่อยๆ จนกว่าจะได้อัตราส่วนของสารสกัดเจือจางที่ทำให้สัญญาณลดลงเหลือครึ่งหนึ่งของสัญญาณเริ่มต้น ซึ่งหากเจือจางด้วยวิธีเดิมคือใช้ปิเปต จะมีข้อเสียคือ ใช้เวลาในการทดสอบนานกว่าจะรู้ผล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หากมีสารสกัดที่อยากทดสอบเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังต้องใช้สารเคมีในปริมาณมาก

ดังนั้น หากมีเครื่องมืออัตโนมัติเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้เกิดข้อดีกว่าแบบเดิม ถ้าออกแบบให้เครื่องมือนั้น สามารถเจือจางแล้วตรวจวัดได้ในทันทีอย่างต่อเนื่องกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้หากใช้อุปกรณ์ที่เปรียบเสมือนแขนกล สามารถดูดและนำส่งสารละลายปริมาตรน้อย (ระดับไมโครลิตร) ให้ไปทำปฏิกิริยาในท่อขนาดเล็กได้อย่างอัตโนมัติ อุปกรณ์นี้จะถูกควบคุมการทำงานได้ด้วยคอมพิวเตอร์ จึงทำให้เจือจางได้ในอัตราส่วนที่แม่นยำ และสะดวก นอกจากนี้ ยังสามารถเจือจางแล้วตรวจวัดได้ในทันที ทำให้ใช้เวลาในการทดสอบเร็วกว่ามากเมื่อเทียบกับการใช้ปิเปต และเนื่องจากเครื่องมือนี้จะนำไปใช้ร่วมกับเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยหลักการไหลของของเหลวที่เรียกว่า Sequential injection analysis (SIA, [5]) จึงทำให้ได้ผลทดสอบที่แม่นยำกว่าการใช้ปิเปตเนื่องจากสามารถกำหนดเวลาที่สารจะถูกตรวจวัดได้คงที่เท่าๆกันทุกครั้งโดยการควบคุมอัตราการไหลของของเหลว (หากเป็นการใช้ปิเปตอาจมีความคลาดเคลื่อนจากการจับเวลา)

1.1.5 หลักการตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี: ทางเลือกใหม่ในการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

หลักการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า โดยทั่วไปหลักการนี้จะมีข้อดี คือ มีความไวในการวิเคราะห์ (Sensitivity) สูง สามารถวิเคราะห์สารที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำได้ (เช่น สารสกัดจากน้ำส้มควันไม้) ในโครงการนี้ จึงมีแนวคิดที่จะใช้หลักการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าในการทดสอบฤทธิ์การต้าน

อนุมูลอิสระ ซึ่งหลักการที่ใช้คือ แอมเพอโรเมทรี (Amperometry) [6] ซึ่งจะให้ศักย์ไฟฟ้าจากภายนอกแก่ อนุมูลอิสระ แล้วเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้าขนาดเล็ก ได้กระแสไฟฟ้าซึ่งเป็นตัวแปรที่สามารถติดตามได้ หากในสารตัวอย่างมีสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระนี้ก็จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ทำให้เหลือปริมาณอนุมูลอิสระที่จะเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วน้อยลง ก็จะเกิดกระแสลดลงตามไปด้วย วิธีนี้มีข้อดีที่สำคัญ คือ มีความไวในการวิเคราะห์สูง เพราะใช้ขั้วไฟฟ้าขนาดเล็ก มีพื้นที่ผิวมาก สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วได้มาก เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติจะมีปริมาณเล็กน้อย หากใช้ขั้วไฟฟ้าที่ใช้กันโดยทั่วไปซึ่งมีขนาดที่ใหญ่ จะทำให้สิ้นเปลืองวัตถุดิบในการวิเคราะห์ ในปัจจุบันขั้วไฟฟ้าทำงาน ได้มีการพัฒนาให้มีขนาดเล็กแล้ว งานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบขั้วไฟฟ้าอ้างอิงให้มีขนาดเล็กและเป็นแบบระนาบ (Planar Reference Electrode (PRE)) เพื่อให้สมดุลกับขั้วไฟฟ้าทำงาน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสร้าง ‘องค์ความรู้ใหม่’ สำหรับประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เทคนิค SIA ร่วมกับการตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี

1.2.2 เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดสร้างเป็น ‘ชุดเครื่องมือต้นแบบ’ โดยเป็นเครื่องมืออัตโนมัติที่สามารถเจือจางตัวอย่างแล้วตรวจวัดได้ทันทีต่อเนื่องกัน

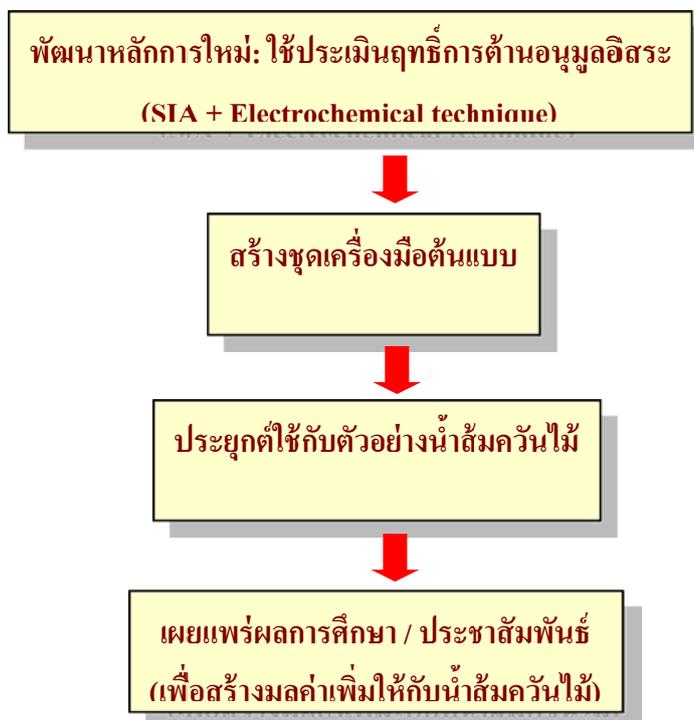
1.2.3 เพื่อนำชุดเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นไป ‘ประยุกต์ใช้จริง’ สำหรับประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในโครงการนี้ จะเริ่มจาก ‘พัฒนาหลักการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแบบใหม่’ ซึ่งจะอาศัยหลักการวิเคราะห์ที่ใช้การไหลของของเหลวภายในท่อขนาดเล็ก ที่มีชื่อว่า Sequential injection analysis, SIA [5] ที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างสะดวก รวดเร็ว เพราะสามารถเจือจางตัวอย่างและนำส่งสารตัวอย่างที่เจือจางแล้วนั้นไปตรวจวัดได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งในส่วนของ การตรวจวัดนี้ จะใช้ ‘หลักการทางไฟฟ้าเคมี’ เพื่อเพิ่มความไวในการวิเคราะห์

จากนั้นจะนำหลักการใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้ ไปสร้างเป็น ‘ชุดเครื่องมือต้นแบบ’ เพื่อประเมินฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อได้ ‘ทดสอบและหาคุณลักษณะเด่นของเครื่องมือ (Analytical characteristics)’ เรียบร้อยแล้ว ก็จะนำไปใช้ ‘ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้’ เพื่อทดสอบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากน้อยเพียงใด จากนั้นจึง ‘เผยแพร่ผลการวิจัย’ เพื่อกระตุ้นให้มีการนำน้ำส้มควันไม้ไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ เช่น นำไปเติมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม หรือ เครื่องสำอางต่อไป

สรุปขอบเขตของโครงการวิจัยนี้ ได้วางแผนดังต่อไปนี้



1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

- 1.4.1 สืบค้นเอกสารอ้างอิงและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- 1.4.2 พัฒนาหลักการใหม่ เพื่อใช้ในการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เทคนิค SIA ร่วมกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า
- 1.4.3 นำหลักการที่ได้มาสร้างเป็นชุดเครื่องมือต้นแบบ
- 1.4.4 หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของชุดเครื่องมือต้นแบบ
- 1.4.5 ประเมินคุณลักษณะเด่นของชุดเครื่องมือต้นแบบ โดยการหา Analytical performances
- 1.4.6 ประยุกต์ชุดเครื่องมือต้นแบบที่พัฒนาขึ้น เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้
- 1.4.7 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้น กับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธีทางสถิติคือ Paired t-test [19] ในการเปรียบเทียบ
- 1.4.8 เตรียมเผยแพร่ผลงานวิจัยแบบสมบูรณ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ผลงานตีพิมพ์ ในวารสารวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1.5.2 สิทธิบัตร ที่มีข้อถือสิทธิครอบคลุมถึงการสร้างชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติเพื่อประเมิน
ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1.5.3 หน่วยงานที่ต้องการให้นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากโครงการนี้ มุ่งหวังให้ตระหนักถึงคุณประโยชน์ของน้ำส้มควันไม้ มากกว่าเป็นเพียงยาปราบศัตรูพืชหรือยาฆ่าแมลง คือต้องการให้นำน้ำส้มควันไม้ไปต่อยอดสร้างเป็นมูลค่าเพิ่ม เช่น นำไปเติมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม หรือ ในเครื่องสำอางค์ ดังนั้นหน่วยงานที่ต้องการให้นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้แก่

1.5.3.1 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อเผยแพร่ข้อมูลจากการวิจัยให้กับภาคประชาชนและเกษตรกร จะได้กระตุ้นให้มีการผลิตน้ำส้มควันไม้มากขึ้น

1.5.3.2 กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม เพื่อเผยแพร่และชี้แนะให้ภาคอุตสาหกรรมเล็งเห็นถึงประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มควันไม้ เพื่อจะได้นำน้ำส้มควันไม้ไปเป็นวัตถุดิบ นำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวคิด และทฤษฎี

2.1.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบใดๆก็ตาม ที่มีจำนวนอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จึงว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย เซลล์ต่างๆ จะถูกทำลาย โดยอนุมูลอิสระเกิดจาก 2 แหล่ง คือ (1) ภายในร่างกาย เช่น เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ และ (2) ภายนอกร่างกาย จากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสี ultraviolet หรือจากมลพิษ เช่น คาร์บอนหรี ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ โดยปกติร่างกายจะรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม โดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่ถ้าเสียสมดุลโดยมีปริมาณของอนุมูลอิสระมากกว่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์อันเป็นที่มาของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง แก่ก่อนวัย และโรคอื่นๆอีกมาก

2.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

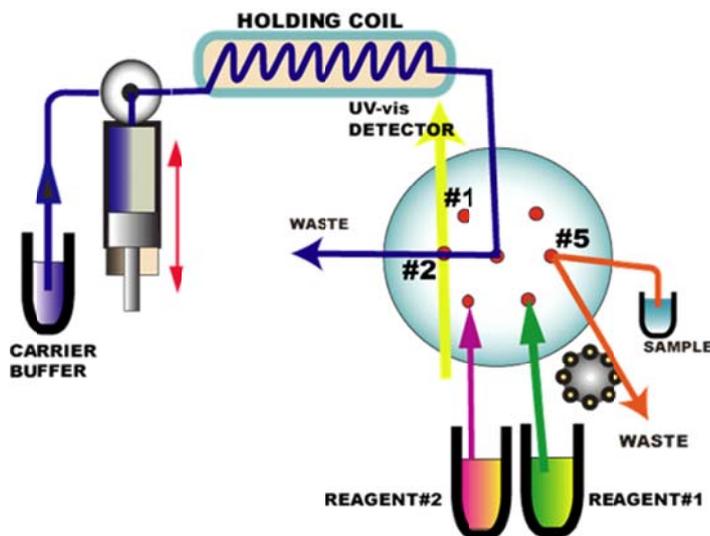
สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารต้านออกซิเดชัน คือ โมเลกุลของสารที่สามารถป้องกัน หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.1.2.1 สารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิ (Primary antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้สามารถยับยั้งปฏิกิริยาถูกโอซของอนุมูลอิสระ โดยการให้ออกซิเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ แล้วทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดความคงตัว หรือไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุมูลอิสระต่อไปอีก

2.1.2.2 สารต้านออกซิเดชันทุติยภูมิ (Secondary antioxidant) หรือสารต้านออกซิเดชันที่เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic antioxidant) สารต้านออกซิเดชันกลุ่มนี้จะไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระ แต่จะช่วยการทำงานของสารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิในลักษณะต่างๆ

2.1.3 หลักการวิเคราะห์แบบฉีดวนเชื่อมอินเจกชัน (Sequential Injection Analysis, SIA)

ในปี ค.ศ. 1990 Ruzicka และ Marshall [5] ได้พัฒนาระบบวิเคราะห์ที่ชื่อว่า Sequential injection analysis, SIA) ซึ่งเป็นระบบที่มีการดูดสารที่ต้องการวิเคราะห์และรีเอเจนต์เข้ามาเป็นลำดับตามลำดับการเกิดปฏิกิริยา สารตัวอย่างและสารเคมีจะถูกดูดเข้ามาในปริมาตรที่น้อยมากจึงไม่สิ้นเปลืองและลดการผลิตของเสีย ระบบ SIA แสดงดังรูปที่ 1



ภาพที่ 1.1 ระบบซีควนเชียลอินเจกชัน(SIA)

ที่มา : <http://www.flowinjection.com/method2.html>

ส่วนประกอบของระบบซีควนเชียลอินเจกชัน

- 1) หน่วยของการขับเคลื่อน (Propulsion unit) คือส่วนของปั๊ม ปั๊มที่ใช้มักเป็นปั๊มกำลังขับเคลื่อนสูง เพื่อเป็นตัวขับเคลื่อนรีเอเจนต์และตัวอย่างเข้าสู่ตัวตรวจวัด เช่น Syringe pump
- 2) ระบบของการฉีด (Multiposition valve) คือ ส่วนที่ดูดสารเคมี และ/หรือ สารตัวอย่างเข้าไปเก็บไว้ที่ holding coil มีลักษณะเป็น multiport valve สามารถมี port ได้มากถึง 10 port
- 3) Holding coil คือ เป็นส่วนที่ดูดสารเคมี และ/หรือ ตัวอย่างมาเก็บไว้ (ส่วนที่ 1 ถึง 3 นี้ เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเจือจางตัวอย่าง)
- 4) Flow through cell คือส่วนที่เป็นระบบท่อที่ใช้ลำเลียงรีเอเจนต์และตัวอย่างเข้าสู่ตัวตรวจวัด ในโครงการนี้ จะบรรจุขั้วไฟฟ้าไว้ใน Flow through cell นี้

2.1.4 เทคนิค แอมเพอโรเมทรี

แอมเพอโรเมทรี (Amperometry) [6] เป็นเทคนิควิธีที่จะควบคุมศักย์ไฟฟ้าให้คงที่แก่ขั้วไฟฟ้าขนาดเล็ก ที่เพียงพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารตัวอย่างที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าได้ แล้ววัดค่ากระแสที่เกิดขึ้น ที่ค่าต่าง ๆ ของความเข้มข้นของสารตัวอย่างนั้น เทคนิคแอมเพอโรเมทรี ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง โดยการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน หรือการเติมสารมาตรฐาน

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในด้านต่างๆ เช่น ทางเภสัชศาสตร์ โภชนาการ และทางสรีรศาสตร์ สารอนุมูลอิสระประกอบด้วย 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical ($\bullet OH$) และ hydrogen

peroxide (H₂O₂) เป็นต้น และกลุ่ม reactive nitrogen species (RNS) คือ nitric oxide(NO•) และ peroxyxynitrite (ONOO⁻) [7] วิธีทั่วไปในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมีหลากหลายวิธี อาทิ

(1) การใช้สารประกอบ ABTS [2,2-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)] ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ABTS•⁺ ในการวิเคราะห์จะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ลดลง เช่น ในกลุ่มงานของ M. Tarnawski และคณะ ได้ศึกษาการแยกกรดฟีนอลิกชนิดต่างๆ ในสารสกัดถ่านหินจากพืชโดยใช้เทคนิค HPLC และตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [8] E. Verzelloni และคณะ ได้ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของกรดฟีนอลิก และ flavonoid ในไวน์แดง และน้ำส้มบัลซามิก [9] ซึ่งวิธีนี้ทำได้ง่าย การวิเคราะห์ทำได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ ABTS ต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูล ABTS•⁺ ซึ่งทำให้การวิเคราะห์มีความยุ่งยาก

(2) การใช้สารประกอบ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่ง DPPH เป็น อนุมูลอิสระที่สามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ โดยมีนักวิจัยได้ใช้ DPPH เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เช่น H. Kelebek และคณะ ได้ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มและไวน์ส้ม [10] J. Salta และคณะ ได้เปรียบเทียบหาสารประกอบฟีนอลิกในสาเกสายพันธุ์ต่างๆ และประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [11] การวิเคราะห์จะคล้ายกับ ABTS•⁺ แต่อนุมูล DPPH ไม่ไวต่อปฏิกิริยา เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าความเป็นจริง

(3) การใช้ Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูล โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe(III)-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมของเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชั่นได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe(II)-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน A. Y. Loo และคณะ ได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบต่างๆ ในน้ำส้มควันไม้ โดยใช้วิธี DPPH และ FRAP ซึ่งให้ผลที่คล้ายกัน [12,13]

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น Z. Chen และคณะ ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้ Capillary electrophoresis ร่วมกับ Amperometric detector ในการแยกและตรวจวัด flavones และกรดฟีนอลิก ในใบละหุ่ง ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องทำให้สารเกิดอนุพันธ์ อีกทั้งยังใช้ตัวทำละลายและสารเคมีน้อย [14] O. Makhotkina และ P. A. Kilmartin ได้ใช้เทคนิค Cyclic voltammetry ในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มพอลิฟีนอลในไวน์ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าเกลตสซีคาร์บอน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ให้ผลที่ดี มีความเป็นเส้นตรงสูง [15] J. Piljac-Zegarac และคณะ ทำการเปรียบเทียบการใช้เทคนิค Cyclic voltammetry กับเทคนิคแบบเดิม (ABTS, DPPH, FRAP) ในการตรวจวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในชาผลไม้ ซึ่งเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีสามารถตรวจวัดได้เร็วและให้ผลที่ดี [16]

อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวข้างต้นยังเป็นแบบไม่อัตโนมัติ ซึ่งไม่เหมาะหากจะใช้งานที่มีจำนวนตัวอย่างมากมาย หรืองานประจำ ดังนั้นจึงมีการสนใจในเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยหลักการไหลของของเหลวภายในท่อขนาดเล็ก ซึ่งเป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ได้สะดวก อัตโนมัติ และรวดเร็ว เช่น M.J. Reis Lima และคณะ ได้พัฒนาระบบ Sequential injection analysis (SIA) ในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ABTS ซึ่งให้ผลที่ดีในการวิเคราะห์ซ้ำ [17] W. Thongchai และคณะ ได้ใช้เทคนิค Flow injection analysis (FIA) [5] ในการตรวจวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด โดยใช้ DPPH [18] เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยการทำให้เกิดปฏิกิริยาในระบบที่มีการไหล จากข้อจำกัดของวิธีที่ใช้ ABTS และ DPPH งานวิจัยนี้จึงสนใจในการพัฒนาระบบการไหลวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า คือ แอมเพอโนเมทรี ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ เพราะเทคนิคนี้จะให้ความไวในการวิเคราะห์สูง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

- 3.1.1.1 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) – Sigma, USA
- 3.1.1.2 สารละลายมาตรฐานกรดวานิลลิก (Vanillic acid) – Fluka, Switzerland
- 3.1.1.3 สารละลายมาตรฐานไซลินิกอล (Syringol) – Sigma, USA
- 3.1.1.4 สารละลายเมทานอล เกรด HPLC- Carlo Erba, Italy
- 3.1.1.5 กรดอะซิติก
- 3.1.1.6 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)
- 3.1.1.7 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DiPotassiumhydrogenphosphate)
- 3.1.1.8 โพแทสเซียมโบรไมด์ (Potassium bromide)
- 3.1.1.10 โพแทสเซียมไนเตรต (Potassium Nitrate)
- 3.1.1.10 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide)
- 3.1.1.11 โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (Potassium Hexacyanoferrate)

3.1.2 อุปกรณ์เครื่องตรวจวัด

- 3.1.2.1 ขวดวัดปริมาตร
- 3.1.2.2 บีกเกอร์
- 3.1.2.3 ปิเปต
- 3.1.2.4 หลอดหยด
- 3.1.2.5 เครื่องกรองสุญญากาศ
- 3.1.2.6 เครื่องให้คลื่นความถี่สูง (Sonicator)
- 3.1.2.7 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) - UV-Visible spectrophotometer (Water 486)
- 3.1.2.8 Syringe pump (HAMILTON, PSD4)
- 3.1.2.9 8-port Multi-selection valve (HAMILTON, Serial MVP)
- 3.1.2.10 Revers phase C-18 packed column (KYA TECH Corporation, HiQ sil C18HS)
- 3.1.2.11 Revers phase C-18 Monolithic column (Merck, Chromolith®HPLC column)

3.2 การดำเนินการวิจัย

3.2.1 การสร้าง Planar reference electrode (PRE)

ผู้วิจัยได้ร่วมมือกับศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ในการพัฒนา Reference electrode เพื่อใช้เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงขนาดเล็ก โดยสร้างชั้นฟิล์มซิลิกอนไดออกไซด์ขึ้นบนแผ่นซิลิกอนแล้วใช้เทคโนโลยีการกัดด้วยพลาสมาอย่างลึก เพื่อสร้างช่องบนแผ่นซิลิกอนซึ่งจะใช้บรรจุสารละลายที่เป็นสะพานเกลือ แล้วจึงนำแผ่นเงิน ที่ต่อขั้วโลหะมาปิดทับ Reference electrode ที่พัฒนา

3.2.1.1 การเตรียม Planar reference electrode (PRE)

หลังจากได้แผ่นซิลิกอนที่ผ่านกระบวนการสร้างชั้นฟิล์มซิลิกอนไดออกไซด์และการกัดด้วยพลาสมาอย่างลึกแล้ว ต่อไปจะเป็นการบรรจุสารละลายที่ใช้เป็นสะพานเกลือ และปิดทับด้วยแผ่นเงินที่ต่อขั้วไฟฟ้าแล้ว สุดท้ายจะเป็นการเคลือบ Epoxy resin บน Planar reference electrode เหลือไว้เฉพาะบริเวณที่เป็นเมมเบรนให้สัมผัสกับสารละลายได้ ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

- 1) แผ่นซิลิกอนที่ผ่านกระบวนการสร้างชั้นฟิล์มซิลิกอนไดออกไซด์และการกัดด้วยพลาสมาอย่างลึกแล้ว นำมาบรรจุสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้ syringe ฉีด
- 2) นำแผ่นซิลิกอนที่ฉาบด้วยฟิล์มเงินบาง มาต่อกับขั้วโลหะนิกเกิลหรือสายไฟด้วยวิธีการบัดกรี
- 3) นำแผ่นเงินที่บัดกรีติดขั้วโลหะนิกเกิลหรือสายไฟเรียบร้อยแล้ว มาปิดทับช่องบนแผ่นซิลิกอน
- 4) ทา Epoxy resin ให้ทั่ว ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ทั้งด้านหน้า และด้านหลัง ยกเว้นบริเวณเมมเบรน ที่จะให้สัมผัสกับสารละลาย



ภาพที่ 3.1 Planar reference electrode (ขั้วโลหะนิกเกิล)



ภาพที่ 3.2 Planar reference electrode (ขั้วสายไฟ)

3.2.1.2 การทดสอบการใช้ได้ของ Planar reference electrode ที่สร้างขึ้นด้วย Cyclic Voltammetry

เป็นการทดสอบการใช้งานของ PRE ที่เตรียมขึ้น ซึ่งทดสอบร่วมกับ Glassy Carbon Electrode (Working Electrode) และทำการเปรียบเทียบกับ Commercial Reference Electrode โดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry โดยเตรียมสารละลาย ดังนี้

1) สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์

ชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 18.640 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกริมาตร

2) สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย โพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งสารโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต 0.0830 กรัม ละลายด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกริมาตร

3.2.1.3 การทดสอบการตอบสนองต่อไอออนลบต่างๆ โดยเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี

1) สารละลายสต็อกโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1 M

ชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 7.45 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดบอกริมาตร

2) สารละลายสต็อกไดโพแทสเซียมไฮโดเจนฟอสเฟตในช่วงความเข้มข้น 1 M

ชั่งสารไดโพแทสเซียมไฮโดเจนฟอสเฟต 17.40 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดบอกริมาตร

3) สารละลายสต็อกโพแทสเซียมไนเตรตในช่วงความเข้มข้น 1 M

ชั่งสารโพแทสเซียมไนเตรต 10.10 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดบอกริมาตร

4) สารละลายสต็อกโพแทสเซียมโบรไมด์ในช่วงความเข้มข้น 1 M

5) ชั่งสารโพแทสเซียมโบรไมด์ 10.30 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค HPLC

3.2.2.1 ศึกษาอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1) สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 75, 50, 25, 10 โดยปริมาตร

ผสมสารละลายเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 และ 10 : 90 โดยปริมาตร กรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ และไล่อากาศด้วยเครื่องให้คลื่นเสียงความถี่สูง(Sonicator)

2) สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร

ผสมสารละลายเมทานอล กรดแกลซีลอะซิติก และน้ำในอัตราส่วน 10 : 2 : 88 โดยปริมาตร กรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ และไล่อากาศด้วยเครื่องให้คลื่นเสียงความถี่สูง(Sonicator)

3) สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายกรดแกลลิก 0.05 กรัม ในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ให้ปริมาตรเป็น 50.00 มิลลิลิตร

4) สารละลายมาตรฐานกรควานิลลิก เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายกรควานิลลิก 0.05 กรัม ในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ให้ปริมาตรเป็น 50.00 มิลลิลิตร

5) สารละลายมาตรฐานไซลีนจอล เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายไซลีนจอล 0.05 กรัม ในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ให้ปริมาตรเป็น 50.00 มิลลิลิตร

6) สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปีเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก สารละลายมาตรฐานกรควานิลลิก สารละลายมาตรฐานไซลีนจอล ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาอย่างละ 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ เป็นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค SIC

3.2.3.1 ศึกษาอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1) สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 0.1 โมลาร์

ปีเปตกรดแกลซีลอะซิติกมา 5.8 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2) สารละลายโซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 0.1 โมลาร์

ซึ่งโซเดียมอะซิเตทมา 6.80 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2) สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0

ตวงสารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 0.1 โมลาร์ มา 820 มิลลิลิตร และ สารละลาย โซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ มา 180 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3.2.3.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรง

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซลิโนล ในช่วง ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นมีปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร โดยเตรียมจากสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซลิโนลความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนถึงปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร

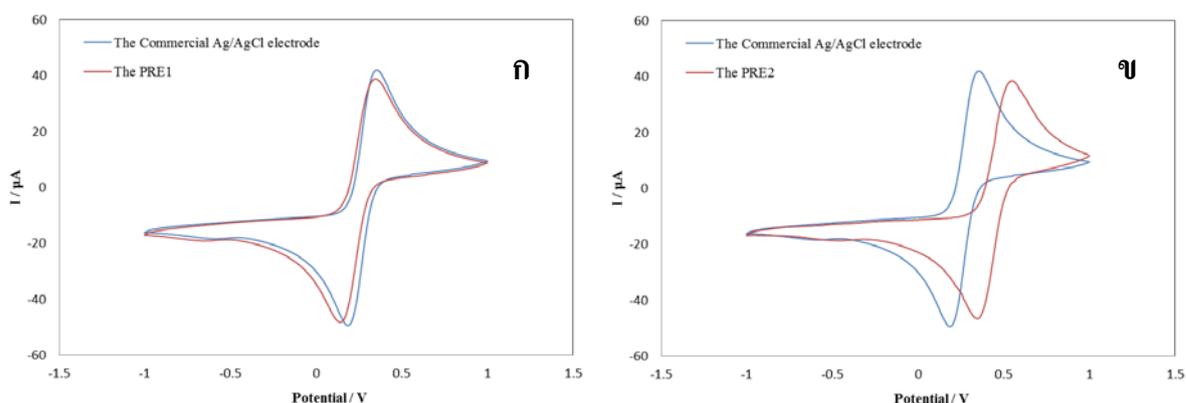
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การทดสอบการใช้ได้ของ Planar reference electrode ที่สร้างขึ้น

4.1.1 ทดสอบ Planar reference electrode เบื้องต้นด้วยเทคนิค Cyclic Voltammetry

ทดสอบการใช้งานของ Planar Reference Electrode (PRE) ที่เตรียมขึ้นในสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต ($K_3[Fe(CN)_6]$) ซึ่งทดสอบร่วมกับ Glassy Carbon Electrode (Working Electrode) และทำการเปรียบเทียบกับ Commercial Reference Electrode (Ag/AgCl) โดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry ในการทดสอบ เราจะให้ศักย์ไฟฟ้าไฟฟ้าในช่วง -1.0 ถึง 1.0 (ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการใช้งานของ Glassy Carbon Electrode) โดยมี step potential เท่ากับ 0.01V และ scan rate เท่ากับ 0.1V/s

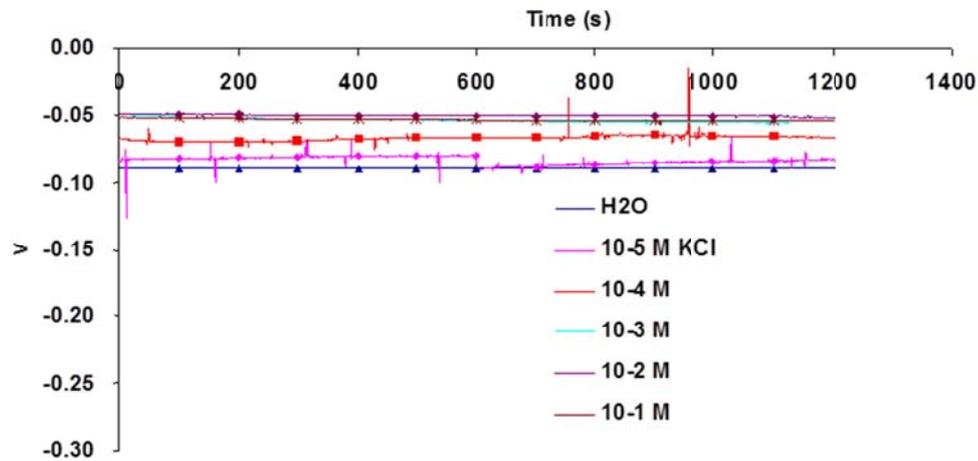


ภาพที่ 4.1 Cyclic voltammograms ของ Glassy Carbon Electrode เมื่อใช้ Commercial Reference Electrode (Ag/AgCl) และ PREs เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ก. ลักษณะ Cyclic voltammogram ของ PRE ที่ผ่านการทดสอบ; ข. ลักษณะ Cyclic voltammogram ของ PRE ที่ไม่ผ่านการทดสอบ

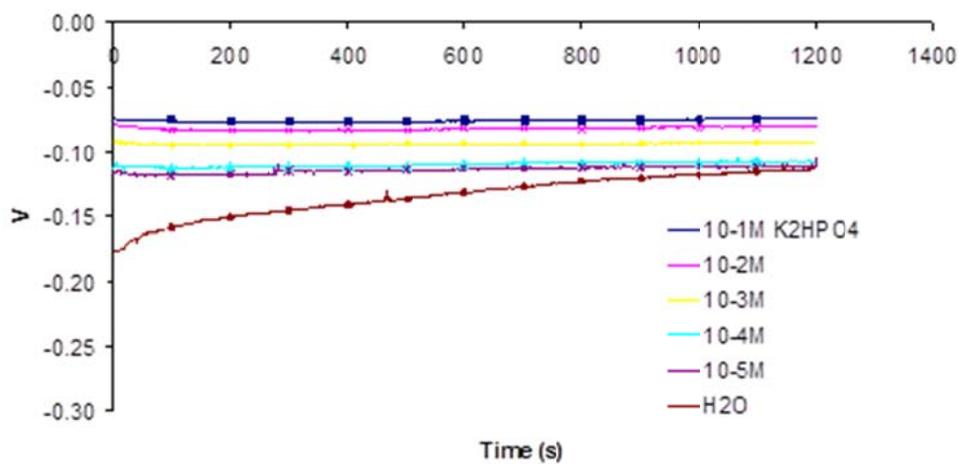
จากภาพที่ 4.1 Cyclic voltammogram ที่ได้เมื่อใช้ PRE เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ถ้ามีลักษณะคล้ายและซ้อนทับกับ Cyclic voltammogram เมื่อใช้ Commercial Reference Electrode (Ag/AgCl) ถือว่า PRE นั้นผ่านการทดสอบเบื้องต้น และจะนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Potentiometry ต่อไป

4.1.2 ศึกษาการทดสอบการตอบสนองต่อไอออนลบต่างๆ โดยเทคนิคโพเทนซิโอเมตรี

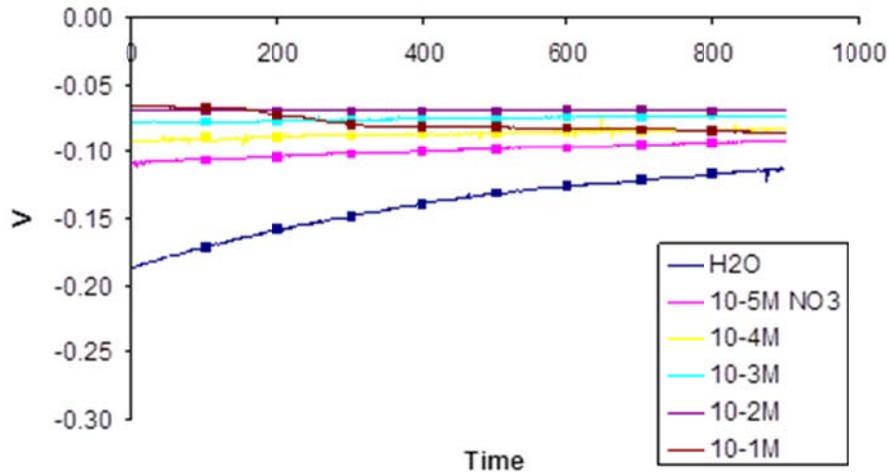
ทดสอบการตอบสนองต่อไอออนลบในสารละลายชนิดต่างๆ โดยใช้ Commercial Reference Electrode (Ag/AgCl) เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน และใช้ PRE เป็นขั้วอ้างอิง และทำการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า



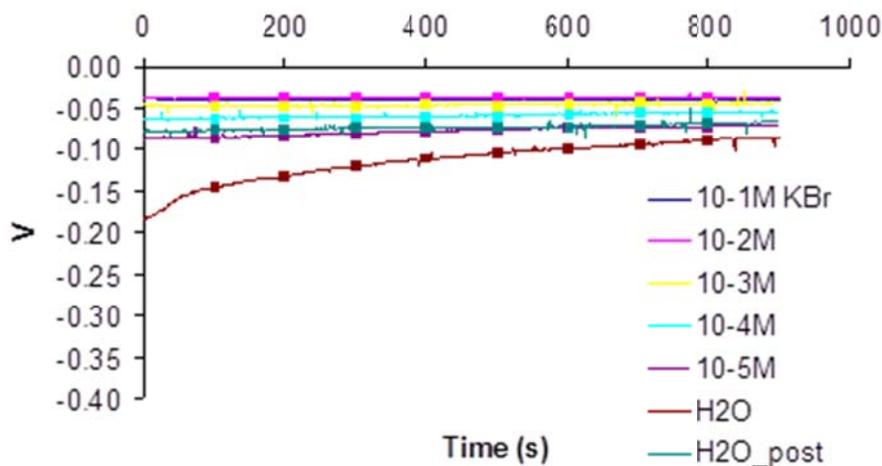
ภาพที่ 4.2 การตอบสนองต่อไอออนคลอไรด์ ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 10^{-5} M ถึง 10^{-1} M



ภาพที่ 4.3 การตอบสนองต่อไอออนไฮโดรเจนฟอสเฟต ในสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ในช่วงความเข้มข้น 10^{-5} M ถึง 10^{-1} M

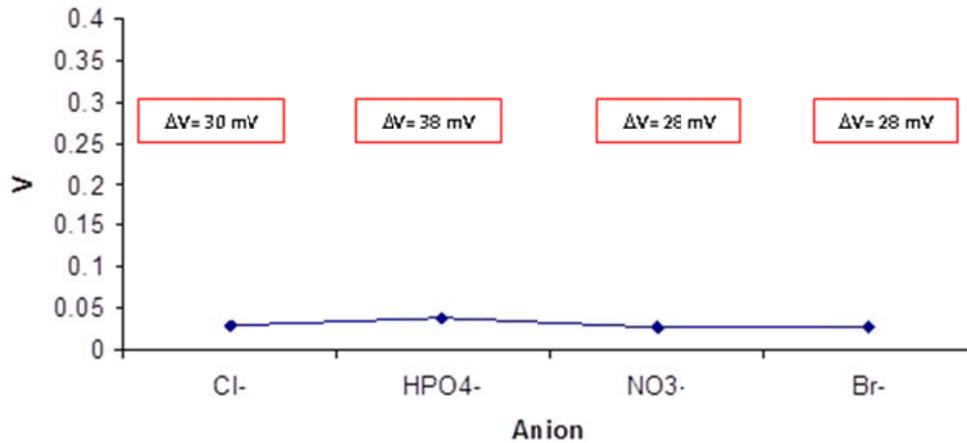


ภาพที่ 4.4 การการตอบสนองต่อไอออนไนเตรต ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรตในช่วงความเข้มข้น 10^{-1} M ถึง 10^{-5} M



ภาพที่ 4.5 การการตอบสนองต่อไอออนโบรไมด์ ในสารละลายโพแทสเซียมโบรไมด์ในช่วงความเข้มข้น 10^{-1} M ถึง 10^{-5} M

จากรูปที่ 4.2 – 4.5 เป็นการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าในสารละลายไอออนลบที่มีความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งให้ค่าค่อนข้างที่จะคงที่ไม่ว่าจะวัดในสารละลายใด จากนั้นหาค่าผลต่างของศักย์ไฟฟ้าของแต่ละสารละลายเทียบกับน้ำปราศจากไอออน โดยนำค่าศักย์มากที่สุดลบด้วยค่าศักย์ไฟฟ้าน้อยสุด จากนั้นนำไปพลอตกราฟเพื่อดูแนวโน้มต่อไป



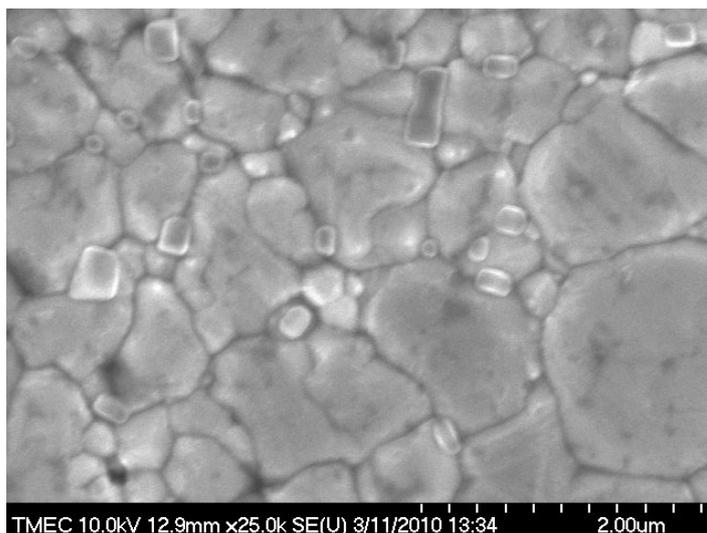
ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างผลต่างค่าศักย์ไฟฟ้ากับไอออนลบชนิดต่างๆ

จากรูปที่ 4.6 แสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ของค่าผลต่างศักย์ไฟฟ้าของสารละลายไอออนลบแต่ละชนิด จากกราฟจะเห็นว่า ค่าผลต่างในสารละลายไอออนลบแต่ละชนิดมีค่าที่ใกล้เคียง อาจจะกล่าวได้ว่า PRE ที่เตรียมขึ้นมานี้ไม่ตอบสนองต่อไอออนลบใดๆ ที่นำมาทดสอบ

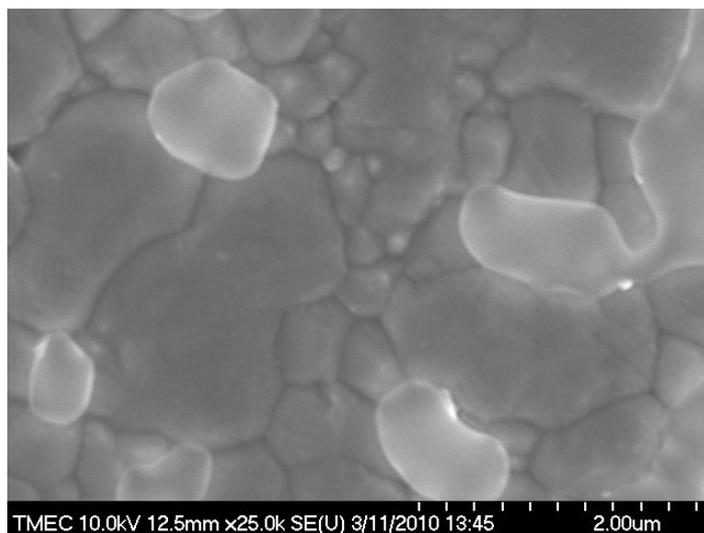
4.1.3 ศึกษาเกิดซิลเวอร์คลอไรด์บนแผ่นซิลเวอร์ โดยเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM) และ Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)



ภาพที่ 4.7 แผ่นซิลเวอร์แช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน

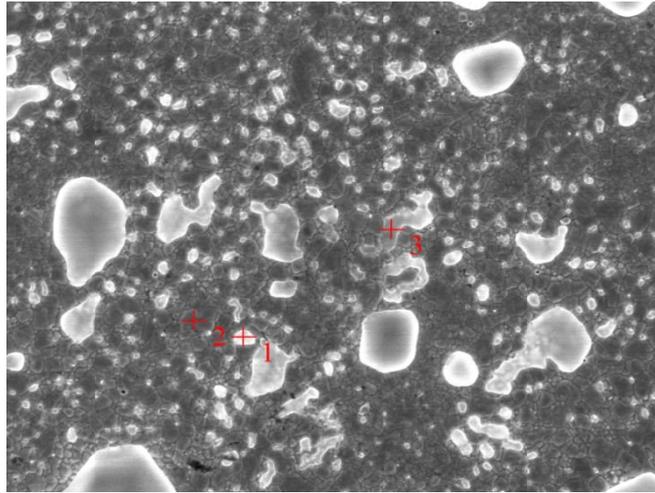


ภาพที่ 4.8 แผ่นซีลเวอร์แช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

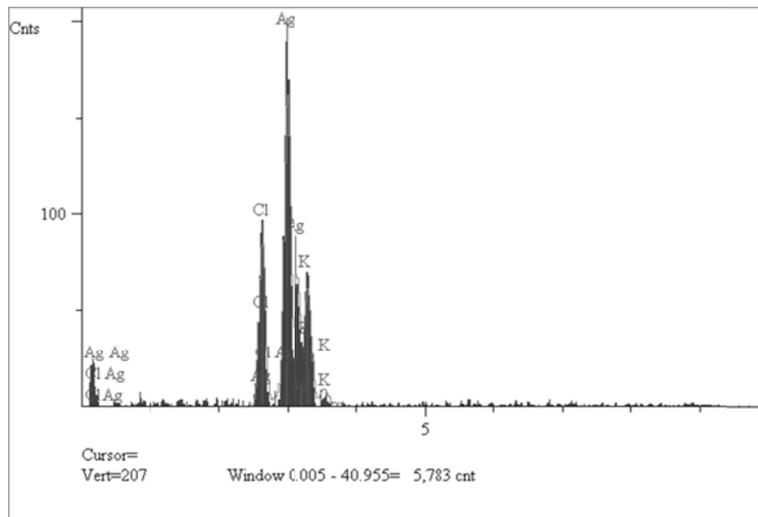


ภาพที่ 4.9 แผ่นซีลเวอร์แช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

จากภาพที่ 4.7 4.9 แสดงรูปถ่าย SEM พบว่าเมื่อแช่เก็บแผ่นซีลเวอร์เป็นเวลา 3 วัน จะยังไม่เป็นซีลเวอร์คอลลอยด์เกิดขึ้น เมื่อแช่เก็บเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีผลึกสีขาว ซึ่งน่าจะเป็นซีลเวอร์คอลลอยด์จะเกิดขึ้นเล็กน้อย และเมื่อแช่เก็บเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีซีลเวอร์คอลลอยด์เกิดมากขึ้น (ปริมาณซีลเวอร์คอลลอยด์เพิ่มขึ้นตามเวลาในการแช่) จากนั้นทำการยืนยันผลโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) ได้ผลดังนี้



ภาพที่ 4.10 รูปถ่าย EDX แสดงตำแหน่งที่จะวิเคราะห์บนแผ่นซิลเวอร์ 3 ตำแหน่ง

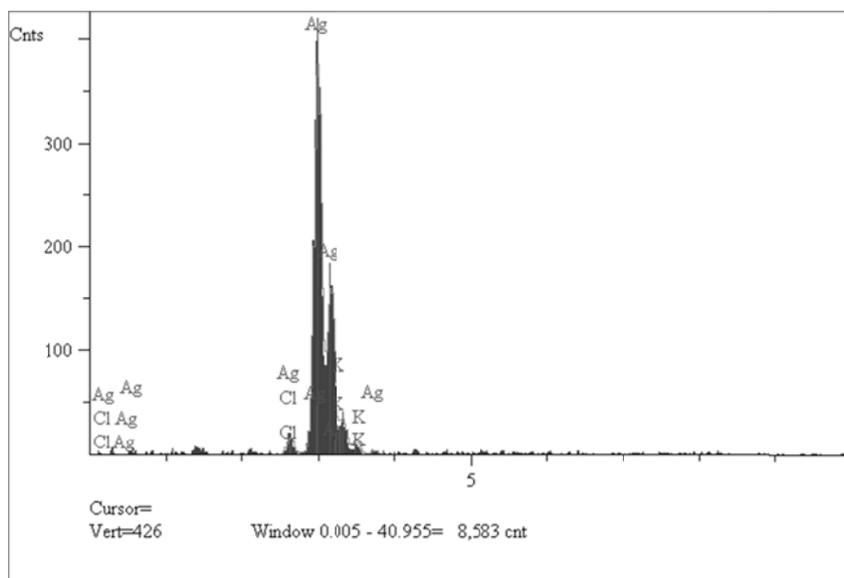


ภาพที่ 4.11 แสดง Spectrum ณ ตำแหน่งที่ 1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 1

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc	Units
Cl	Ka	82.27	5.473	10.314	wt.%
K	Ka	52.29	4.363	6.151	wt.%
Ag	La	178.07	8.052	83.535	wt.%
Total				100.000	wt.%

จากรูปที่ 4.11 แสดง **Spectrum** ที่ได้จากการทดสอบด้วย **EDX** พบว่ามีพีคของธาตุต่างๆ และมีพีคคลอไรด์เกิดขึ้น จากตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 1 พบว่ามีปริมาณคลอไรด์มากกว่าปริมาณโพแทสเซียม แสดงว่ามีซิลเวอร์คลอไรด์เกิดขึ้น

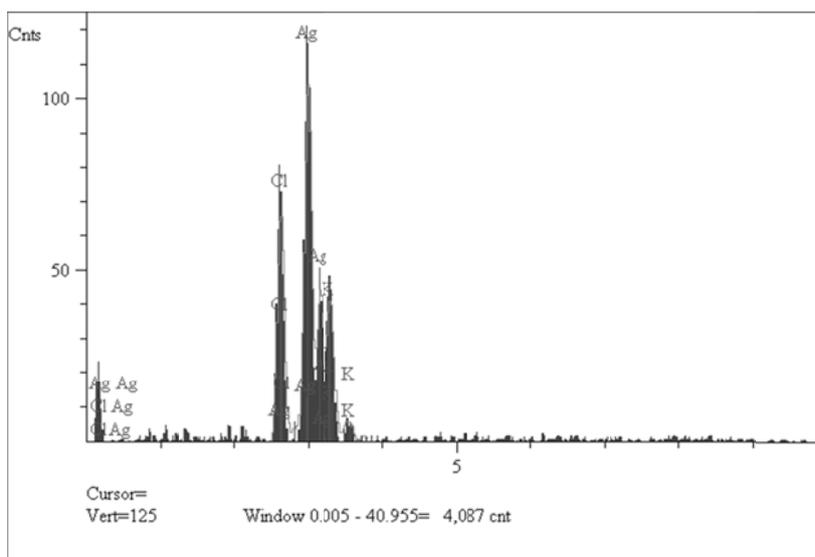


ภาพที่ 4.12 แสดง Spectrum ณ ตำแหน่งที่ 2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 2

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc	Units
Cl	Ka	0.00	0.000	0.000	wt.%
K	Ka	0.00	0.000	0.000	wt.%
Ag	La	284.40	8.440	100.000	wt.%
Total				100.000	wt.%

จากรูปที่ 4.12 แสดง **Spectrum** ที่ได้จากการทดสอบด้วย **EDX** พบว่ามีพีคของธาตุต่างๆ เกิดขึ้น มีพีคคลอไรด์ที่ต่ำมากและมีพีคซิลเวอร์สูงมาก จากตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 2 พบว่าไม่มีปริมาณคลอไรด์ ดังนั้น ณ ตำแหน่งนี้ไม่เกิดซิลเวอร์คลอไรด์



ภาพที่ 4.13 แสดง Spectrum ณ ตำแหน่งที่ 3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 3

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc	Units
Cl	Ka	96.22	7.205	12.058	wt.%
K	Ka	52.80	5.338	6.346	wt.%
Ag	La	169.81	9.572	81.596	wt.%
Total				100.000	wt.%

จากรูปที่ 4.13 แสดง Spectrum ที่ได้จากการทดสอบด้วย EDX พบว่า มีพีกของธาตุต่างๆ เกิดขึ้นและมีพีกคลอไรด์ที่สูง จากตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ EDX ณ ตำแหน่งที่ 3 พบว่ามีปริมาณคลอไรด์อยู่มาก ดังนั้น ณ ตำแหน่งนี้มีซิลเวอร์คลอไรด์เกิดขึ้นมาก

จากผลการวิเคราะห์ด้วย EDX พบว่ามีซิลเวอร์คลอไรด์เกิดขึ้นจริงที่แผ่นโลหะซิลเวอร์ระหว่างกระบวนการเตรียม PRE ซึ่งดูได้จากปริมาณคลอไรด์ ที่เกิดขึ้น ถ้าไม่มีซิลเวอร์คลอไรด์เกิดขึ้น ปริมาณคลอไรด์จะเท่ากับปริมาณโพแทสเซียม

เนื่องจากว่า PRE ที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้งนั้นยังให้ค่าในการวิเคราะห์ที่ยังไม่คงที่ มีความแปรปรวน และยุ่งยากในการเตรียม งานวิจัยนี้จึงได้เปลี่ยนมาใช้ในการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เทคนิคทางแสงแทน คือ UV-Visible spectrophotometry ซึ่งง่ายกว่า แต่อย่างไรก็ตาม จะได้พัฒนาการเตรียม PRE ต่อไป เพื่อให้ทนทาน และมีความเสถียรมากขึ้น

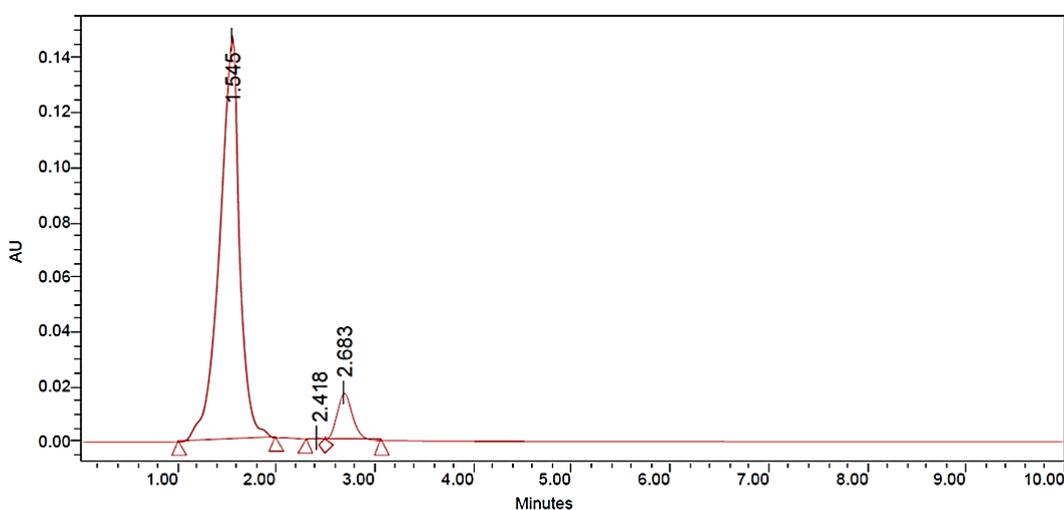
4.2 พัฒนาหลักการประเมินฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค HPLC

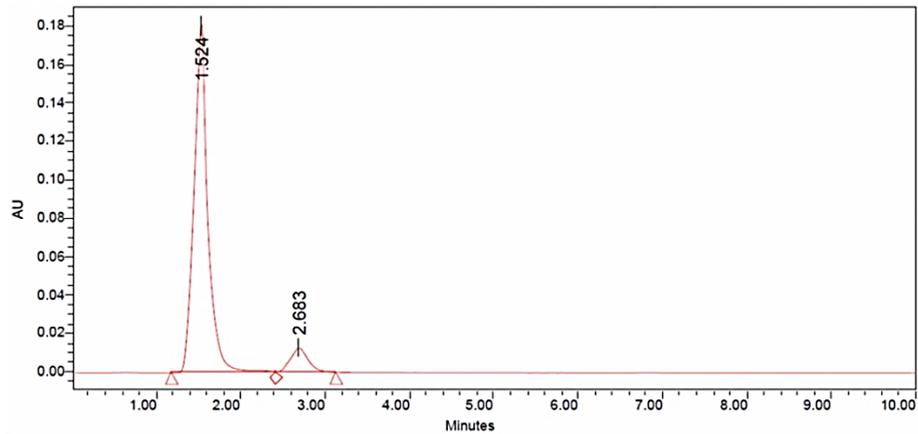
ส่วนแรกได้ทำการพัฒนาระบบในการแยกและตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกโดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง และใช้คอลัมน์แบบมอดอลิติก โดยระบบนี้จะต่อเข้ากับเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง

4.2.1.1 ศึกษาอัตราส่วนโดยปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

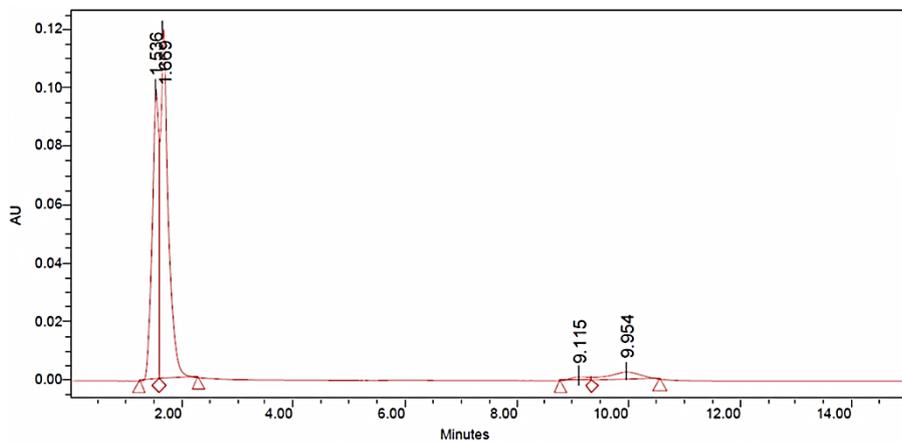
แยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10, 25, 50 และ 75 โดยปริมาตร และสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร แสดงผลดังภาพที่ 4.2 - 4.6



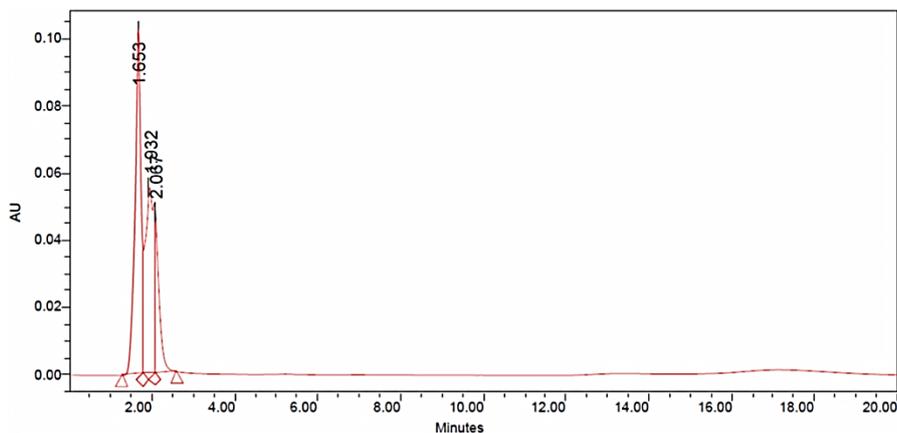
ภาพที่ 4.14 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 75 โดยปริมาตร



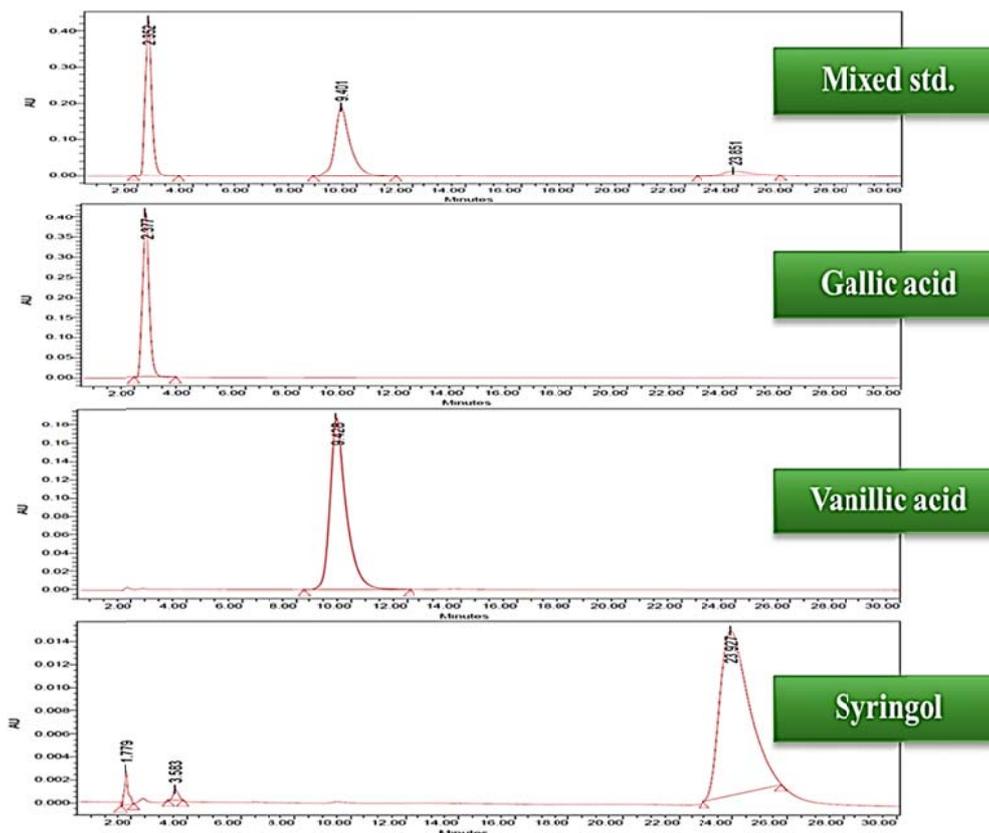
ภาพที่4.15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลิบจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ50โดยปริมาตร



ภาพที่4.16 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลิบจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ25โดยปริมาตร



ภาพที่4.17 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลิบจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ10โดยปริมาตร

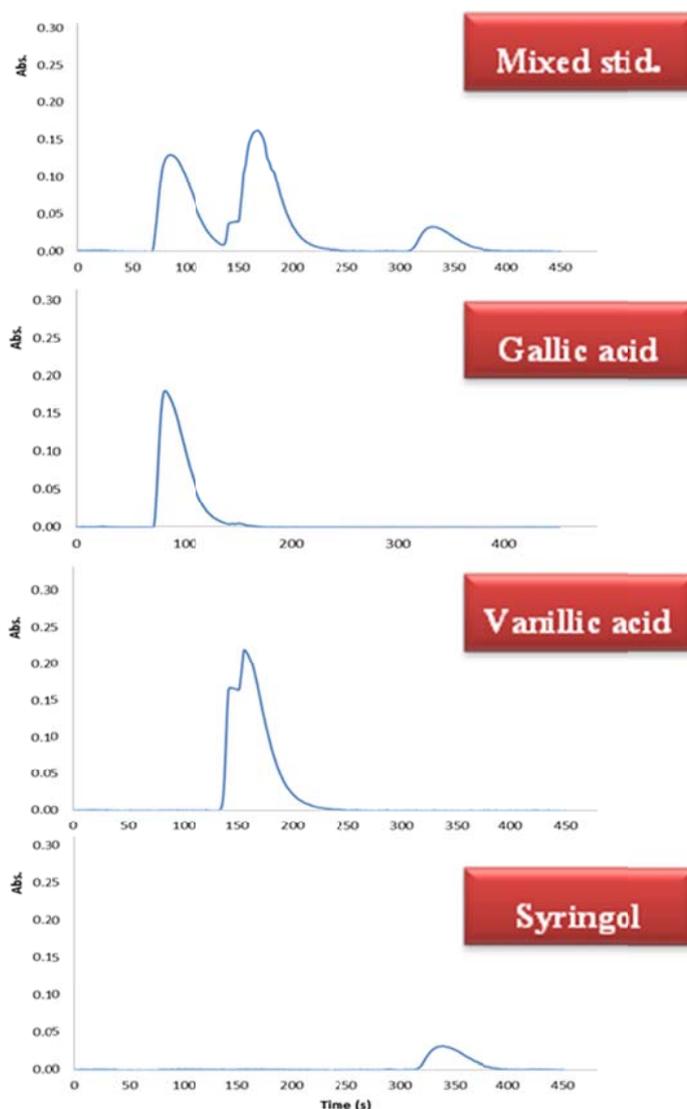


ภาพที่ 4.18 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซลินิก และสารละลายมาตรฐาน เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแต่ละชนิด เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร

จากผลการทดลอง เมื่อใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเพียงอย่างเดียว เมื่อเฟสเคลื่อนที่มีปริมาณความเข้มข้นของสารละลายเมทานอลลดลง จะทำให้สามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น แต่ก็ยังได้ผลที่ไม่ค่อยดีนัก จึงเปลี่ยนมาใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร พบว่าสามารถแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้ดี จึงสรุปสภาวะการทดลองที่เหมาะสมในการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้ดังนี้ เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมทานอล(ความเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร) ที่มีกรดอะซิติก ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 264 นาโนเมตร จากนั้นจะนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงนี้ มาใช้กับหลักการวิเคราะห์ที่ใช้การไหลของของเหลวภายในท่อขนาดเล็ก ที่มีชื่อว่า Sequential injection Chromatography, SIC ร่วมกับคอลัมน์แบบมอดูลติก แต่ยังคงตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดค่าดูดกลืนแสง

4.2.1.2 ทดสอบการแยกสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค SIC โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากเทคนิค HPLC

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมจากเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงแล้ว นำมาทดสอบเบื้องต้นในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค SIC



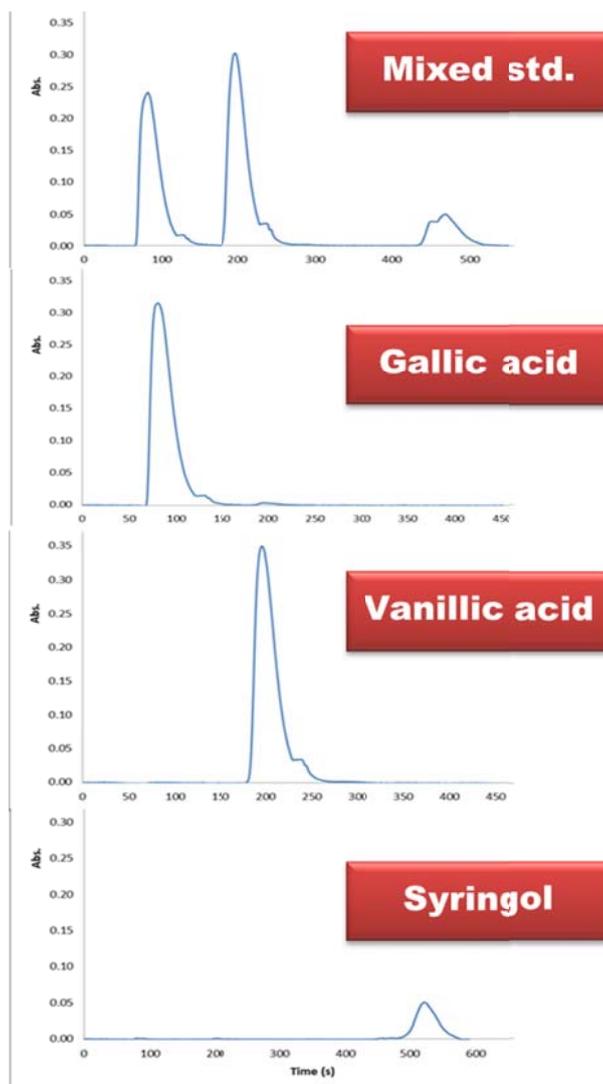
ภาพที่4.19 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิก และสารละลายมาตรฐาน เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแต่ละชนิด จากเทคนิค SIC โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC

จากภาพที่4.19 จะเห็นว่ากรดแกลลิก และกรควานิลลิกยังแยกจากกันได้ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระของเทคนิค SIC ต่อไป

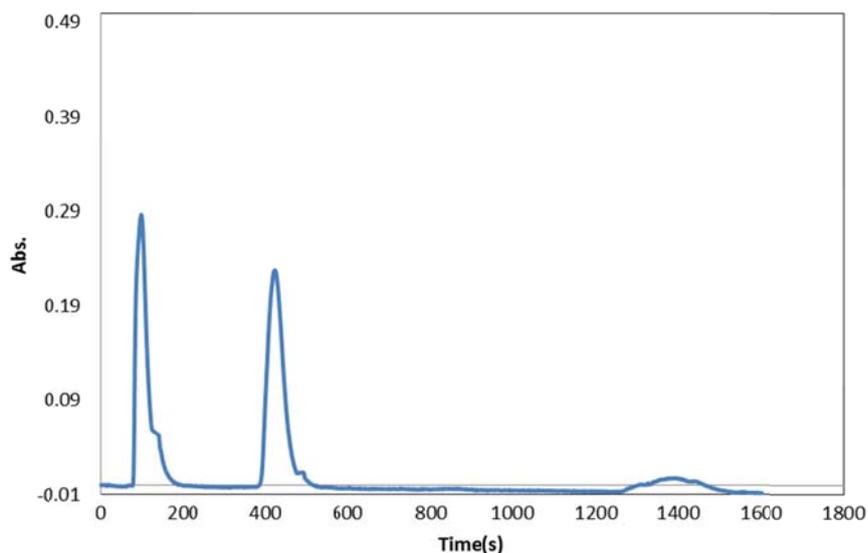
4.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค SIC

4.2.2.1 ศึกษาอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

แยกสารละลายมาตรฐานผสม โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ คือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร และสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท พีเอช 3.6 โดยใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร แสดงผลดังภาพที่ 4.8-4.9



ภาพที่ 4.20 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซลินิกอล และสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร

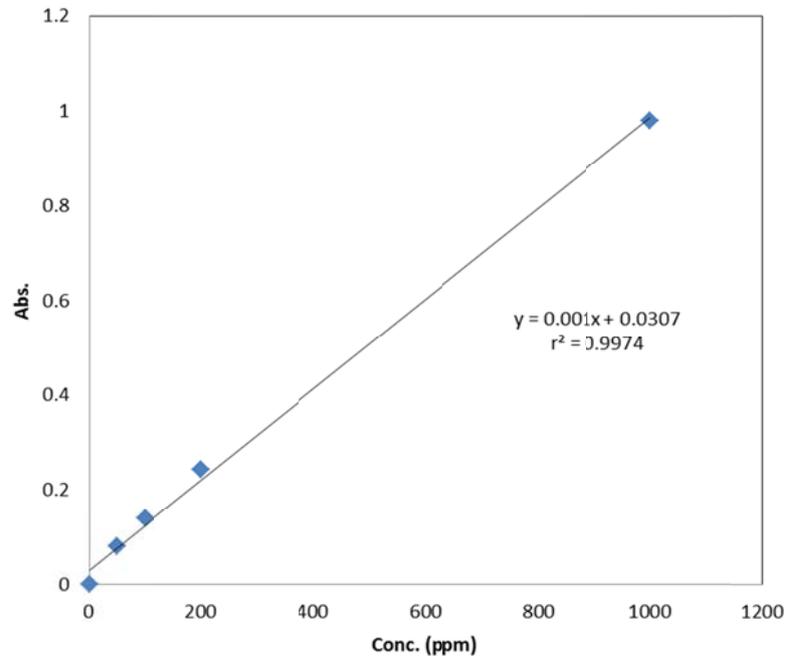


ภาพที่ 4.21 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซลีนจอล เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท พีเอช 3.6

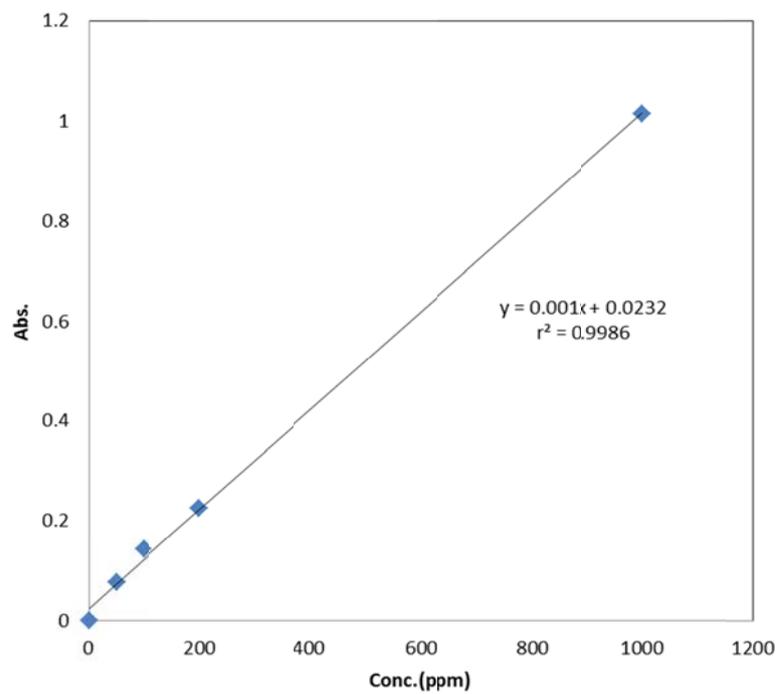
จากภาพที่ 4.20 – 4.21 จะเห็นว่า เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร สารต้านอนุมูลอิสระทั้งสามตัวสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถวิเคราะห์ได้เร็ว ใช้เวลาไม่เกิน 10 นาที แต่เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท พีเอช 3.6 สารต้านอนุมูลอิสระทั้งสามตัวสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่นานมากกว่า 20 นาที ดังนั้น ในส่วนของการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค SIC สภาพะการทดลองที่เหมาะสมในการแยกและวิเคราะห์เป็นดังนี้ เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมทานอล(ความเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยปริมาตร) ที่มีกรดอะซิติก ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 264 นาโนเมตร

4.2.2.2 ศึกษาความเป็นเส้นตรง

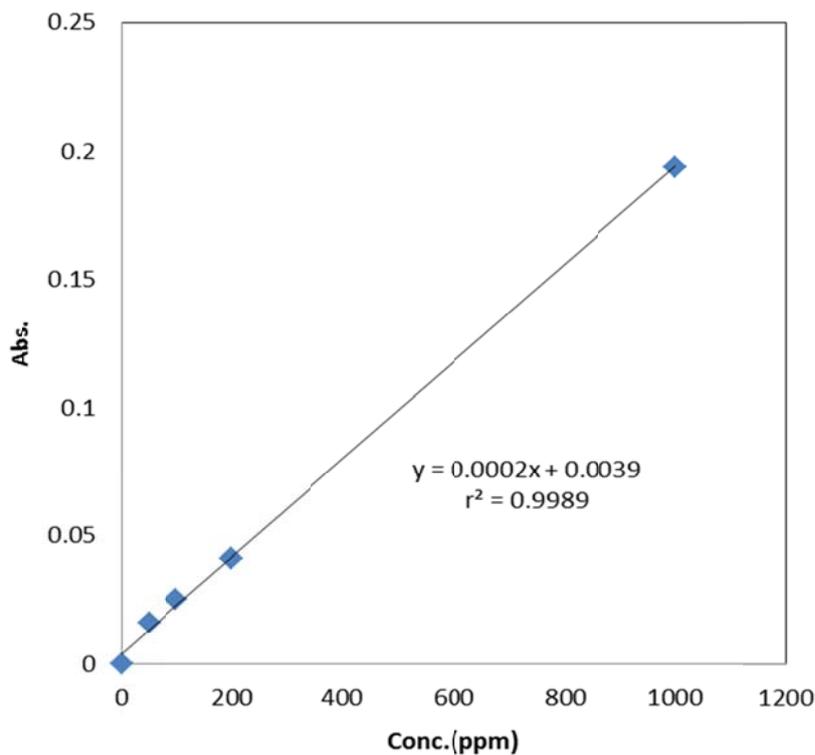
ศึกษาโดยแยกและตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานผสมของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซลีนจอล ที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 50, 100, 200 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.22 กราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก



ภาพที่ 4.23 กราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระควานิลลิก

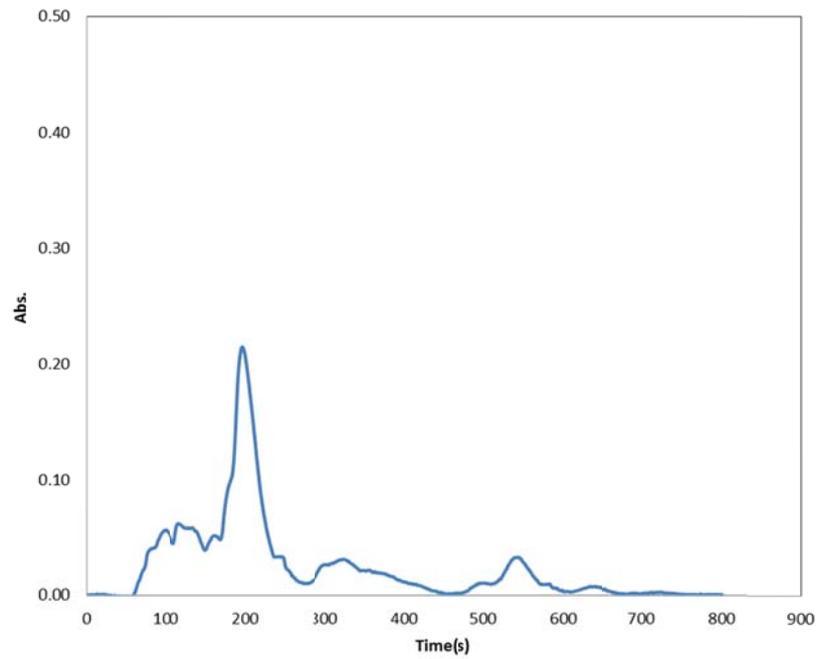


ภาพที่ 4.24 กราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระไซลิโนจอล

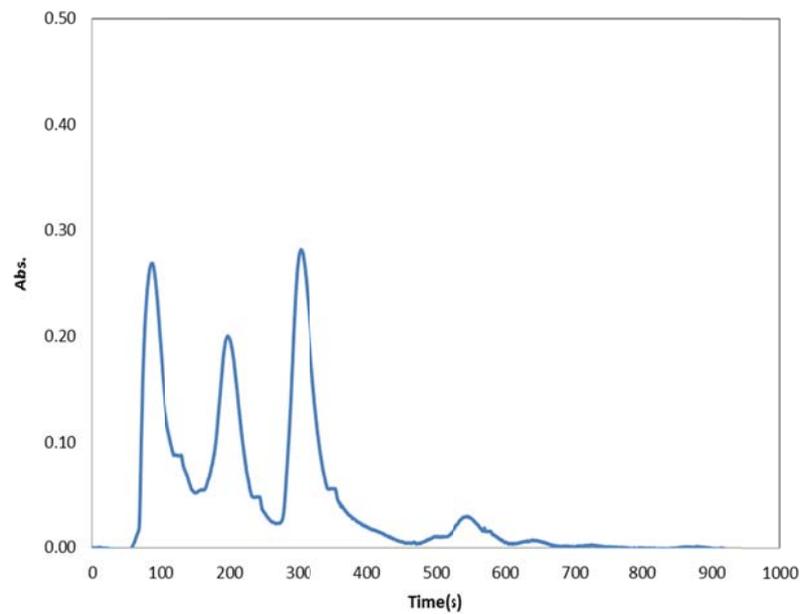
จากภาพที่ 4.22 – 4.24 พบว่าการแยกด้วยเทคนิค SIC ร่วมกับการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสง สารต้านอนุมูลอิสระทั้งสามชนิดมีแนวโน้มความเป็นเส้นตรงที่สูง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ใกล้เคียง 1

4.3 ศึกษาการนำไปใช้กับตัวอย่างน้ำส้มควันไม้

เมื่อพัฒนาหลักการได้แล้วจึงนำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำส้มควันไม้จริง ในการวิเคราะห์จะนำสภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่ได้มาใช้กับตัวอย่าง ศึกษาโดยแยกและตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ กับน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสามชนิดลงไป

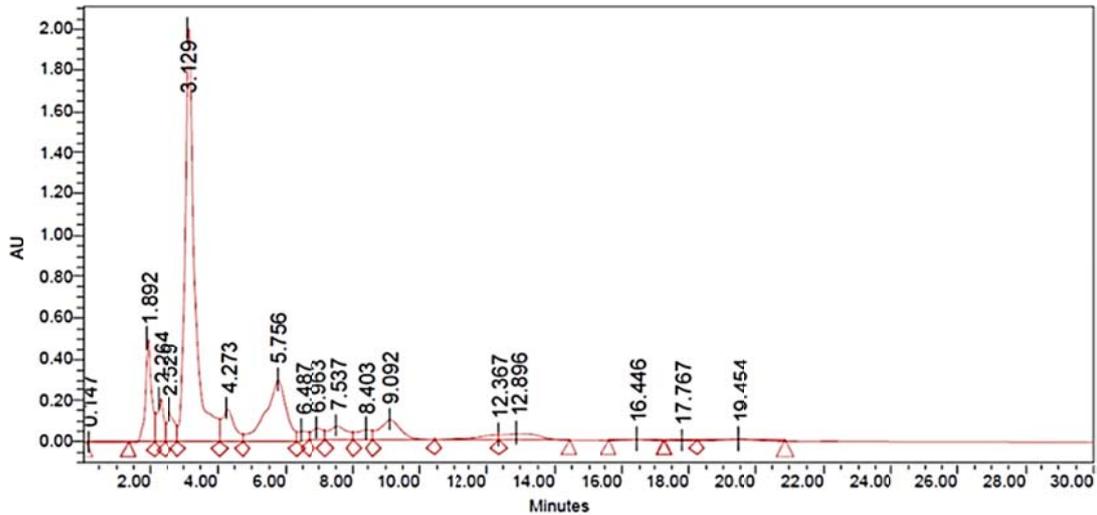


ภาพที่ 4.25 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระลงไป

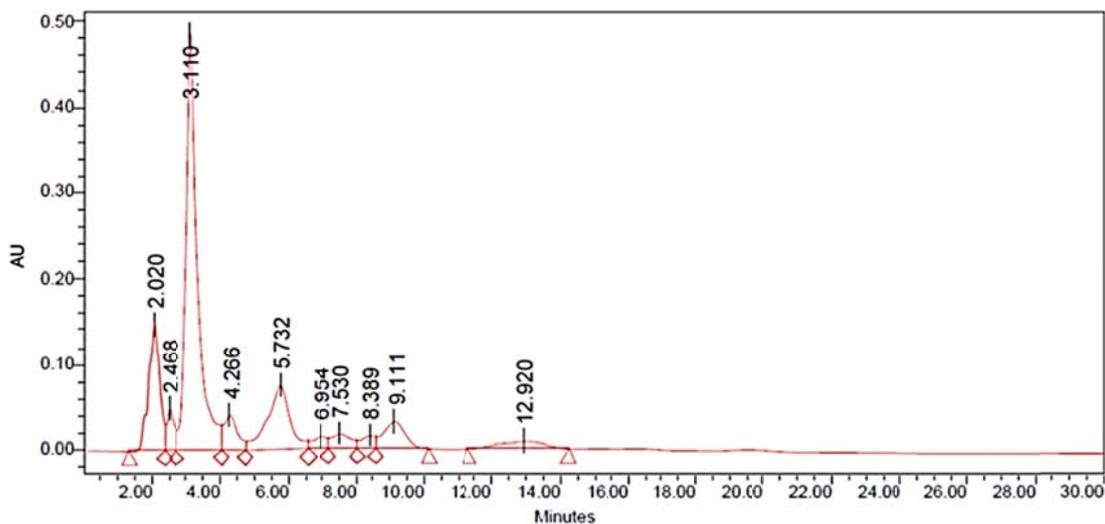


ภาพที่ 4.26 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระ กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิกอล ลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละชนิดเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากภาพที่ 4.25 – 4.26 เป็นการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควันไม้โดยใช้เทคนิค SIC จะเห็นว่ายังไม่พบสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างชนิดเดียวกันด้วยเทคนิค HPLC ดังภาพที่ 4.27 – 4.28



ภาพที่ 4.27 โครมาโทแกรมจากเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระลงไป



ภาพที่ 4.28 โครมาโทแกรมจากเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลิโนจอล ลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละชนิดเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาหลักการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแบบใหม่โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ที่ใช้การไหลของของเหลวภายในท่อขนาดเล็ก ร่วมกับคอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง ซึ่งมีชื่อเรียกว่า Sequential Injection Chromatography, SIC และตรวจวัดโดยอาศัยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี คือ แอมเพอโรเมทรี (Amperometry)

ส่วนแรกได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าอ้างอิงแบบระนาบขนาดเล็ก Planar Reference Electrode, PRE โดยที่ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ได้ผลิตแผ่นซิลิกอนเวเฟอร์ขึ้นมา จากนั้นใช้เทคโนโลยีการกัดด้วยพลาสมาอย่างลึก เพื่อสร้างช่องบนแผ่นซิลิกอนซึ่งจะใช้บรรจุสารละลายที่เป็นสะพานเกลือ และสร้างชั้นฟิล์มซิลิกอนไดออกไซด์ขึ้นบนแผ่นซิลิกอน เพื่อใช้เป็นชั้นเมมเบรนในการแลกเปลี่ยนไอออน จากนั้นบรรจุสารที่ใช้เป็นสะพานเกลือ (สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์) และปิดทับด้วยแผ่นเงิน (แผ่นซิลิกอนเวเฟอร์ ที่ทำการฉาบชั้นเงินบางไว้) ที่ต่อขั้วไฟฟ้าแล้ว สุดท้ายจะเป็นการเคลือบ Epoxy บน Planar reference electrode (PRE) เหลือไว้เฉพาะบริเวณที่เป็นเมมเบรนให้สัมผัสกับสารละลายได้

จากการทดสอบการใช้ได้ของ PRE ในขั้นตอนการทดสอบโดยใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry ผล Cyclic Voltammogram ที่ได้ของ PRE มีลักษณะที่คล้ายกับ Cyclic Voltammogram ของ Commercial Reference Electrode (Ag/AgCl) อาจมี shift ไปข้างเล็กน้อย สามารถที่จะนำไปทดสอบด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

ในส่วนของการทดสอบด้วยเทคนิค Potentiometry ทำการทดสอบในสารละลายไอออนลบชนิดต่างๆ ซึ่งผลที่ได้คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดในสารละลายแต่ละชนิดค่อนข้างคงที่ จากนั้นหาผลต่างของค่าศักย์ไฟฟ้าที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับน้ำปราศจากไอออน ซึ่งส่วนใหญ่มีการตอบสนองไม่เกิน 30 mV (ค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าเท่ากับ 59 mV/pH) จึงถือว่าไม่ตอบสนองต่อไอออนลบนั้นๆ จากนั้นได้ทดสอบการส่องแผ่นซิลเวอร์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) และ Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) เพื่อเป็นการยืนยันว่ามีซิลเวอร์คลอไรด์เกิดขึ้นจริงในระหว่างกระบวนการเตรียม PRE และเพื่อทดสอบดูว่าใช้ระยะเวลาานเท่าใดในการเกิดซิลเวอร์คลอไรด์ ผลที่ได้ปรากฏว่าบนแผ่นซิลเวอร์มีซิลเวอร์คลอไรด์เกิดขึ้น และเมื่อแช่เก็บเป็นเวลา 2 สัปดาห์จะเกิดซิลเวอร์คลอไรด์ปริมาณมากที่สุด

จากการทดสอบทั้งหมดอาจสรุปได้ว่า ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงแบบระนาบที่เตรียมขึ้น สามารถที่จะนำไปใช้เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงในการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีได้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงแบบ

ระนาบในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ยังให้สัญญาณในการตรวจวัดที่ไม่คง มีความแปรปรวน และยุ่งยากในการเตรียม งานวิจัยนี้จึงได้เปลี่ยนมาใช้การประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เทคนิคทางแสงแทน คือ UV-Visible spectrophotometry ซึ่งมีความง่ายกว่า

ในส่วนของการพัฒนาหลักการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จะอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง และใช้คอลัมน์แบบมอดอลิติก โดยระบบนี้จะต่อเข้ากับเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัด พบว่าสภาวะการทดลองที่เหมาะสมในการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระเป็นดังนี้ เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมทานอล (ความเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร) ที่มีกรดอะซิติก ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 264 นาโนเมตร จากนั้นจะนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงนี้ มาทดสอบเบื้องต้นในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค SIC พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระยังแยกจากกันได้ไม่สมบูรณ์ จึงได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัดของเทคนิค SIC จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัด พบว่าสภาวะการทดลองที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัดเป็นดังนี้ เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมทานอล (ความเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยปริมาตร) ที่มีกรดอะซิติก ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 264 นาโนเมตร จากนั้นศึกษาความเป็นเส้นตรงโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้มาแยกและตรวจวัดสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลินิกอล ซึ่งได้สมการเชิงเส้นคือ กรดแกลลิก ($Abs. = 1.0 \times 10^{-3} [\text{กรดแกลลิก}] + 3.07 \times 10^{-2}$) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9974, กรควานิลลิก ($Abs. = 1.0 \times 10^{-3} [\text{กรควานิลลิก}] + 2.32 \times 10^{-2}$) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9986 และ ไซลินิกอล ($Abs. = 2.0 \times 10^{-5} [\text{ไซลินิกอล}] + 3.90 \times 10^{-3}$) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9989 จากผลที่ได้แสดงว่าหลักการที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงได้

จากนั้นนำหลักการที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควินไม้ พบว่าการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควินไม้ด้วยเทคนิค SIC ยังไม่พบสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างชนิดเดียวกันด้วยเทคนิค HPLC

เมื่อพัฒนาหลักการในการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแล้ว จากนั้นได้ออกแบบชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติขึ้นมาดังแสดงในภาพที่ 5.1 ซึ่งจะได้พัฒนาชุดต้นแบบเพื่อต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป



ภาพที่ 5.1 ชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติสำหรับการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

5.1 ข้อเสนอแนะ

5.1.1 ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มควินไม้ ควรมีการกรองตัวอย่างให้สะอาด เพื่อป้องกันการอุดตันของคอลัมน์

5.1.2 เมื่อวิเคราะห์แต่ละครั้งเสร็จแล้ว ควรล้างคอลัมน์ให้สะอาด เพื่อยืดอายุการใช้งาน

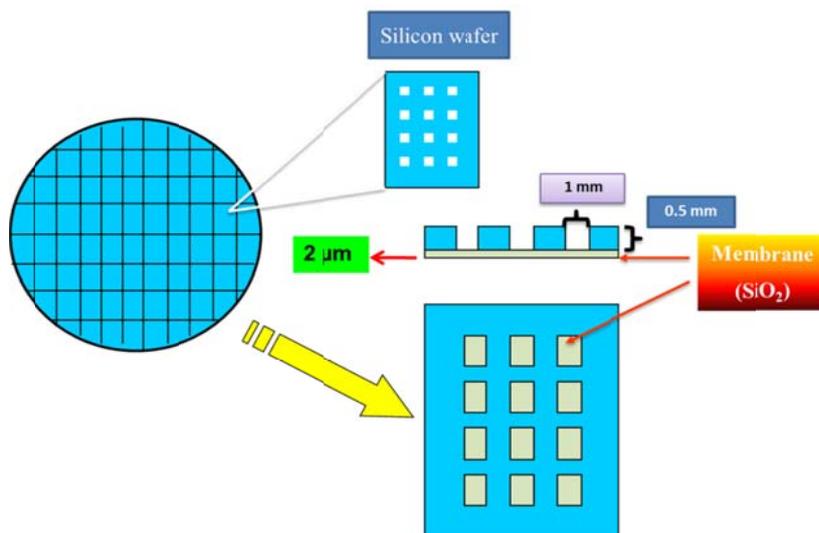
เอกสารอ้างอิง

- [1] http://www.chuansin.com/wood_vinegar
- [2] E. Imamura, Y. Watanabe, US Patent, No. US 7,214,393 B2
- [3] ผศ. ดร. นิคม แหลมศักดิ์, เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร: การพัฒนาการผลิตและการใช้ประโยชน์น้ำส้มไม้, ศูนย์วิจัยป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- [4] สิทธิรัตน์ พานิช และ ผศ. ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา, รายงานผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำผักและผลไม้ไทย, ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล
- [5] <http://www.flowinjection.com>
- [6] รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล , เอกสารประกอบการสอนวิชาเคมีวิเคราะห์ 2, สาขาวิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- [7] L. M. Magalhaes, M. Santos, et al. *Talanta*. 77 (2009): 1559-1566
- [8] M. Tarnawski, K. Depta, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41 (2006): 182-188
- [9] E. Verzelloni, D. Tagliazucchi and Angela Conte. *Food Chemistry*. 150 (2007): 564-571
- [10] H. Kelebek, S. Selli, A. Canbas and T. Cabaroglu. *Microchemical Journal*. 91 (2009): 187-192
- [11] J. Salta, A. Martins, et al. *Journal of functional food*. 2 (2010): 153-157
- [12] A.Y. Loo, K. Jain and I. Darah. *Food Chemistry*. 104 (2007): 300-307
- [13] A.Y. Loo, K. Jain and I. Darah. *Food Chemistry*. 107 (2008): 1151-1160
- [14] Z. Chen, J. Zhang and G. Chen. *Journal of Chromatography B*. 863 (2008): 101-106
- [15] O. Makhotkina and P. A. Kilmartin. *Analytica Chimica Acta*. 668 (2010) 155-165
- [16] J. piljac-Zegarac, L. Valek, et al. *Food Chemistry*. 121 (2010): 820-825
- [17] M.J. Reis Lima, Ildik’o V. T’oth and Antonio O.S.S. Rangel. *Talanta*. 68 (2005): 207-213
- [18] W. Thongchai, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath. *Food Chemistry*. 112 (2009): 494-499
- [19] J. N. Miller and J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th edn., 2000, Pearson Education Limited, Essex, England

ภาคผนวก ก

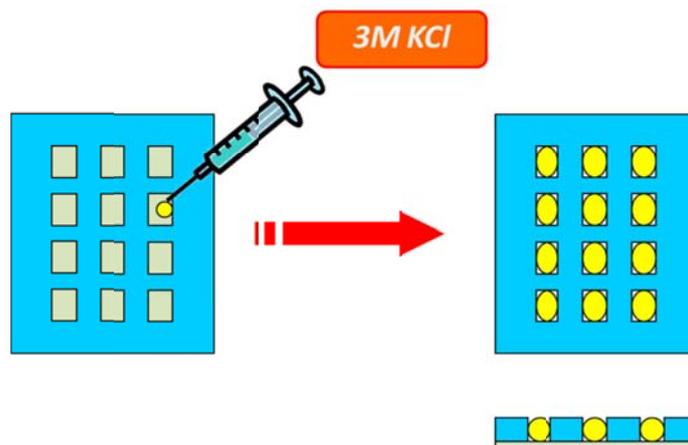
ก.1 ขั้นตอนการสร้างขั้วไฟฟ้าอ้างอิงแบบระนาบ

- 1) สร้างชั้นฟิล์มซิลิกอนไดออกไซด์และการกัดด้วยพลาสมาอย่างลึกบนแผ่นซิลิกอน



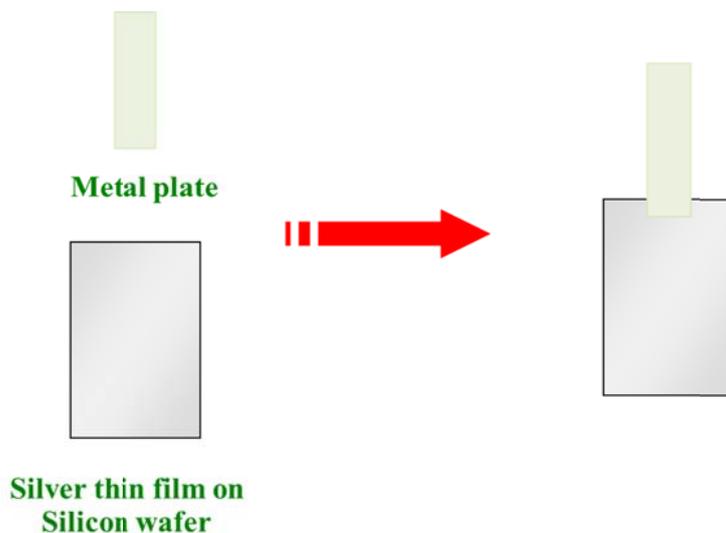
ภาพที่ ก.1 ลักษณะของแผ่นซิลิกอนที่พร้อมนำไปสร้าง Planar reference electrode

- 2) บรรจุสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 3 M โดยใช้ syringe ฉีด



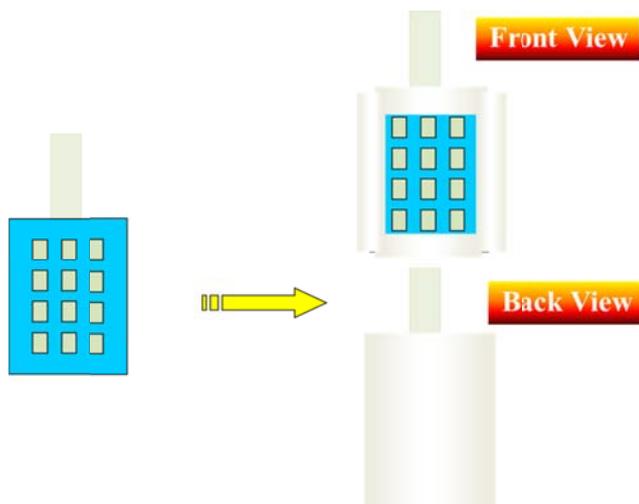
ภาพที่ ก.2 แสดงการหยดสารละลาย KCl ลงบนแผ่นซิลิกอน

3) นำแผ่นซิลิกอนที่ฉาบด้วยฟิล์มเงินบาง มาต่อขั้วโลหะ निकเกิดด้วยวิธีการบัดกรี

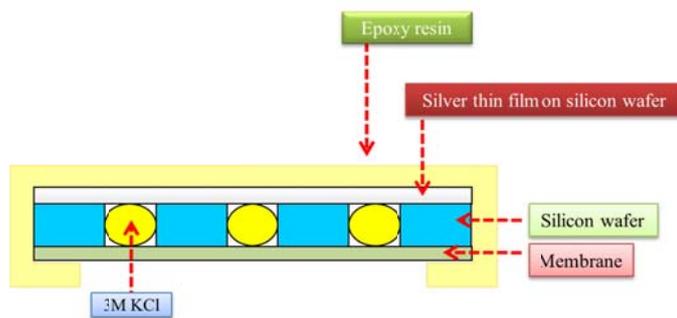


ภาพที่ ก.3 แสดงการเชื่อมติดขั้วโลหะบนแผ่นซิลิกอนที่ฉาบด้วยฟิล์มเงินบาง

4) นำแผ่นเงินที่บัดกรีติดขั้วโลหะเรียบร้อยแล้ว มาปิดทับช่องบนแผ่นซิลิกอน และทา Epoxy ให้ทั่ว ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ทั้งด้านหน้า และด้านหลัง ยกเว้นบริเวณเมมเบรน ที่จะให้สัมผัสกับสารละลาย



ภาพที่ ก.4 แสดงการทา Epoxy บนขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ทั้งด้านหน้า และด้านหลัง



ภาพที่ ก.5 ภาพตัดขวางแสดงส่วนประกอบของ Planar reference electrode

ภาคผนวก ข



ชุดเครื่องมือต้นแบบสำหรับแยกและวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้

ดร.ณัฐภูมิ เข็มชัน และ อ.อภินันท์ เมธวีธรธรวิบูลย์
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
E-mail : a.mathawee@live.com

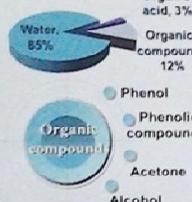
น้ำส้มควันไม้ คืออะไร...?

น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar หรือ Pyroligneous acid) เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการเผาไหม้ในเตาเผาภายใต้ภาวะจำกัดอากาศ ซึ่งทำให้เกิดการสลายตัวของเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ออกจากเนื้อไม้ในรูปของควันไม้แล้วเกิดการควบแน่นเป็นน้ำส้มควันไม้ ซึ่งมีปฏิกิริยาเคมีที่ซับซ้อนนำไปใช้เป็นอย่างแพร่หลาย และใช้ทางพฤกษศาสตร์ทำน้ำส้มควันไม้



การประเมินมูลค่าให้น้ำส้มควันไม้

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารพิษชนิดที่พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้รับความสนใจมาก เนื่องจากมีสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบมากในน้ำส้มควันไม้ ได้แก่ กรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซริงจิก และไซโอดินจอล หากมีวิธีที่สามารถแยกองค์ประกอบต่างๆ และนำไปใช้ในงานค้าความเหมาะสม จะช่วยให้สามารถนำน้ำส้มควันไม้ไปใช้งานได้อย่างคุ้มค่ามากขึ้น



Water, 85%

Organic compound, 12%

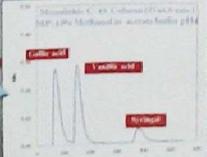
- Phenol
- Phenolic compounds
- Acetone
- Alcohol

สารประกอบฟีนอลิกที่

- Gallic acid** 3%
การกลั่นตัวด้วยวิธีสามตัว มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างเมลานินและต้านอนุมูลอิสระ
- Vanillic acid**
กรดวานิลลิก มีถิ่นกำเนิดในจีนและแอฟริกา หรืออาจผลิตได้โดยสังเคราะห์
- Syringol**
ไซริงจิก ไซริงจิกมีถิ่นกำเนิดในจีนและแอฟริกา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิก





Chromatogram of Phenolic compound



Prototype

Specification

- ใช้วางมือ (ทำได้อัตโนมัติ)
- เวลาที่ใช้แยก < 10 นาที (เร็วกว่า HPLC)
- ราคาไม่แพง เหมาะกับ SMEs
- ประยุกต์ใช้กับการแยกสารอื่นๆ ได้