

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ ศึกษาและพัฒนากระบวนการที่รู้ผลเร็วสำหรับหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิส (Flow Injection Analysis) ที่ตรวจวัด ด้วยเทคนิค แอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้เป็นระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ สามารถวัดปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็ว ใช้สารเคมีและปริมาณตัวอย่างน้อย ในการพัฒนาแลคเคสไบโอเซนเซอร์ที่มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูงในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ จะใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่อะมิโน (CNT-NH₂) อนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) เอนไซม์แลคเคส (Lac) กับสารละลายโบลิวินซีรัมอัลบูมิน (BSA) และสารละลายกลูตาไรต์ไฮด (Glu) หรือขั้วไฟฟ้า GC/CNT-NH₂/AuNPs/Lac+BSA/Glu ใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีในการศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของ caffeic acid ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า คือ สารละลาย CNT-NH₂ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร AuNPs ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลายผสมระหว่าง Lac ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 % อัตราส่วน 20:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และสารละลาย Glu ความเข้มข้น 1 % ได้พัฒนาระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรดี โดยสัญญาณที่ได้จากการฉีด caffeic acid ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (จำนวน 20 ซ้ำ) ให้ค่า % R.S.D. เท่ากับ 3.09 สารต้านอนุมูลอิสระทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (caffeic acid, catechin, gallic acid และ chlorogenic acid) ให้กราฟมาตรฐานแบบเป็นเส้นตรง ชีดกำจัดในการตรวจวัดอยู่ระดับต่ำถึงพีพีเอ็ม วิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรไทยได้อย่างรวดเร็วถึง 29 ตัวอย่างต่อชั่วโมง เหมาะสมสำหรับใช้เป็น ระบบวิเคราะห์ที่รู้ผลเร็วสำหรับหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ในตัวอย่างจริงระบบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณของสารอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารสกัดจากผัก -พืชพื้นบ้านและชา

Key words: ไบโอเซนเซอร์, แลคเคส, สารต้านอนุมูลอิสระ, ระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิส, พืชสมุนไพร

Abstract

This work presents a high throughput screening (HTS) of antioxidant analysis system using flow injection analysis coupled with amperometric detection on the laccase-based biosensor. The development of amperometric detection on laccase based-biosensor in the flow injection system that enables rapid and automated determination for the total antioxidant capacity assay using minute amount of reagents and small sample volumes was focused. A sensitive and selective laccase biosensor using glassy carbon modified with composites of NH_2 functionalized carbon nanotube (CNT-NH_2), gold nano particles (AuNPs), laccase enzyme (Lac), bovine serum albumin (BSA) and glutaraldehyde (Glu) was developed for antioxidant assay. Reduction of caffeic acid was first studied at a developed biosensor, GC/ CNT-NH_2 /AuNPs/Lac+BSA/Glu, using cyclic voltammetry. Results indicated that the optimum condition for modified solution were CNT-NH_2 of 3 mg/mL, AuNPs of 10 μL , mixtures of 5 mg/mL laccase and 1% BSA of 20:1 (v/v), and 1 % Glu, respectively. Flow-injection analysis system with amperometric detection on the biosensor was developed for quantitation of antioxidants. The system provides an impressively good precision (%R.S.D. = 3.09) for 20 μL injections ($n = 20$) of 10 ppm caffeic acid. The linear calibration curves were observed for all tested antioxidants (caffeic acid, catechin, gallic acid and chlorogenic acid). The detection limits at a low ppm level were obtained. This method was successfully applied to evaluate antioxidant content in some plant extracts such as Thai indigenous herb with rapid sample throughput (29 samples/h). The developed flow injection-laccase biosensor is therefore suited for mass screening of real-world samples. This method was successfully applied to evaluate antioxidant contents in some plant extracts such as Thai indigenous vegetables/herbs and teas.

Key words: biosensor, laccase, antioxidant, flow injection analysis, herb