การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนาโนอินทรีย์ นาโนโลหะอินทรีย์ต้านหนอนกอ

Biological Investigation of Nano-organic Nano-organometallic Agents against *Chilo polychrysus* (Meyrick)

โดย
สมหมาย ปะติตังโข
และคณะ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
2554

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนาโนอินทรีย์ นาโนโลหะอินทรีย์ ต้านหนอนกอ

Biological Investigation of Nano-organic Nano-organometallic Agents against *Chilo polychrysus* (Meyrick)

โดย

ผศ. ดร. สมหมาย ปะติตังโข

ผศ. ดร. กิ่งแก้ว ปะติตังโข

นางสาวสุรีพร ดัดถุยาวัตร

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

2554

หัวข้อโครงการ **การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนาโนอินทรีย์ นาโนโลหะอินทรีย์ต้านหนอนกอ**
ผู้วิจัย **สมหมาย ปะติตังโข และคณะ**
ปีที่ทำวิจัย **2554**

บทคัดย่อ

นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีที่เป็นความหวังใหม่ของมวลมนุษย์ชาติ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้อย่างมากมายหลากหลายมากขึ้น การนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ประโยชน์เป็นการบูรณาการศาสตร์หลายแขนงเข้าด้วยกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มฤทธิ์สารสกัดผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติไซลิงกอลดีไฮด์ โดยการสังเคราะห์อนุพันธ์ไซลิงกอลดีไฮด์ และควบคุมขนาดอนุภาคของสารให้อยู่ในระดับนาโนเมตร ได้สารที่เป็นนาโนอินทรีย์ และ นาโนโลหะอินทรีย์ 6 ชนิด คือ สาร L1, L2 C1, C2, C3 และ C4 แล้วนำสารทั้ง 6 ชนิด มาศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) และ Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) ทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E.coli., Salmonella* และ *Staphylococcus aureus* และทดสอบฤทธิ์การต้านหนอนกอในนาข้าว พบว่า สาร L2 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ออกฤทธิ์ได้ดีด้วยค่า IC_{50} ที่ต่ำในระดับ 51.109 มิลลิกรัม/ลิตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่า สารที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+}ได้มากที่สุด คือ สาร L1 ความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่า สาร C1, C2, C3 และ C4 สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ชนิด *E.coli., Salmonella* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดี และความสามารถในการต้านหนอนกอในนาข้าว พบว่า สาร C1 C2 C3 และ C4 สามารถต้านหนอนกอได้ดีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm ตามลำดับ สาร C1 C2 C3 และ C4 จึงควรมีการพัฒนาเป็นสารชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม เพื่อลดใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อร่างกายของมนุษย์และสิ่งแวดล้อมและหันมาใช้สารชีวภาพที่เป็นมิตรต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมต่อไป

Title: Biological Investigation of Nano-organic Nano-organometallic Agents against
Chilo polychrysus (Meyrick)

Author: Sommai Patitungkho et al.

Academic year: 2011

Abstract

Nanotechnology is the new hope of humanity to make it beneficial in various aspects. Nano utilization is the integration of many sciences. This research aimed to increase the effective extracts from natural sites syringaldehyde by synthesis of syringaldehyde derivative site, and control the size of the material particles in nanometer range. Six species of Nano-organic compound and Nano-organometallic compound, L1, L2, C1, C2, C3 and C4 are found. Then the six species were biological tested of antioxidant, activity using the technique of 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and Ferric reducing / antioxidant power (FRAP). They were tested to check the ability on the antiseptic, *E.coli., Salmonella and Staphylococcus aureus* and also tested to check the ability on antioxidant against *Chilo polychrysus* (Meyrick). It was revealed that L2 was able to well conduct antioxidant by DPPH method at the low level of IC_{50} valued 51.109 mg / liter. The ability to conduct antioxidant by FRAP method was found that L1 was able to well reduce from Fe^{3+} to Fe^{2+}. The the ability to stop bacteria growth, it was found that C1, C2, C3 and C4 were able to well stop growth of the bacteria, *E.coli., Salmonella and Staphylococcus aureus.* And the ability to resist *Chilo polychrysus* (Meyrick), it was found that C1, C2, C3 and C4 were able to well resist *Chilo polychrysus* (Meyrick) at the concentration rang of 20, 40, 60, 80 and 100 ppm, respectively. The compounds C1, C2, C3 and C4 should be developed as biological agents to reduce chemical utilization, considered harmful to humans and environment. The compounds are therefore utilized as eco-friendly products.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.โกวิท เชื่อมกลาง อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ขอขอบคุณ ผศ.สมเกียรติ กัลยพฤกษ์ รองอธิการบดี ฝ่ายวิจัยและประกันคุณภาพการศึกษา ขอขอบคุณ อาจารย์พิสมัย ประชานันท์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และอำนวยความสะดวกต่อกิจกรรมในการดำเนินงานการวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์การทดลองบางส่วน สถานที่ทำการทดลอง จนสามารถทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

สมหมาย ปะติตังโขและคณะผู้วิจัย

20 เมษายน 2555

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อภาษาไทย ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค

สารบัญ ง

สารบัญตาราง ฉ

สารบัญภาพ ช

บทที่ 1 บทนำ **1**

บทนำ 1

หลักการและเหตุผล 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

กรอบแนวคิดหรือทฤษฎีของแผนการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **6**

บทนำ 6

นาโนเทคโนโลยี 6

กระบวนการสร้างและการสังเคราะห์ของนาโนเทคโนโลยี 9

เครื่องมือวัดทางนาโนเทคโนโลยี 10

การใช้ประโยชน์จากนาโนเทคโนโลยี 12

อนุมูลอิสระ (free radical หรือ Reactive oxygen species (ROS) 14

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) 15

ผลกระทบหรือผลเสียของอนุมูลอิสระต่อสุขภาพ 16

ดัชนีวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC) 17

วิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระ 24

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 สารเคมี อุปกรณ์และวิธีการทดลอง **31**
สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ 31
วิธีการสังเคราะห์สารตัวอย่าง 33
การศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารตัวอย่าง 34
การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง 34
การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย 36
การทดสอบฤทธิ์การต้านเพลี้ยกระโดดและหนอนกอ 37

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล **38**
บทนำ 38
ผลการสังเคราะห์สารตัวอย่าง 39
ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ 39
ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH 42
ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP 45
ผลการทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย 49
ผลการศึกษาความสามารถในการฆ่าหนอนกอ 51

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง **54**
บทนำ 54
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 54
ข้อเสนอแนะ 55

บรรณานุกรม **56**

ภาคผนวก **59**

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

2.1 วิธีวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน 19

3.1 แสดงการเจือจางสารละลายในการทำกราฟมาตรฐาน 36

4.1 สมบัติทางกายภาพของสารที่สังเคราะห์ได้ 40

4.2 มวลโมเลกุล และ Elemental analysis ของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ 41

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสาร
แต่ละชนิดด้วยเทคนิค DPPH 43

4.4 แสดงค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ 44

4.5 แสดงค่ามาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย
วิธี FRAP 45

4.6 แสดงปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยสารตัวอย่างในการวิเคราะห์
หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP 46

4.7 แสดงความสามารถของการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารตัวอย่าง 49

4.8 แสดงความสามารถในการต้านหนอนกอจากสารตัวอย่าง 52

สารบัญภาพ

ภาพ **หน้า**

2.1 การเปรียบเทียบขนาดของอนุภาค 7

2.2 ขนาดของอนุภาคนาโน 8

2.3 เปรียบเทียบผลการรักษาโรคมะเร็งแบบเดิมกับแบบใหม่ 9

2.4 ลักษณะการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ 10

2.5 การจัดวางอะตอมบนโลหะนิเกิล 11

2.6 กล้อง Atomic Force Microscope 12

2.7 Mode of DNA acting drugs 29

4.1 โครงสร้างการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Syringaldehyde 39

4.2 ลักษณะมอร์โฟโลกีของสารนาโนอินทรย์ SRA-INH จากกล้องจุลทรรศน์ Scanning Electron Microscope (SEM), Hitachi TM-1000 41

4.3 การเปรียบเทียบค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) ของสารตัวอย่างกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 44

4.4 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP 45

4.5 กราฟแสดงปริมาณ Fe^{2+} ของสารตัวอย่างแต่ละชนิด 48

4.6 การต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 50

4.7 ผลการศึกษาความสามารถในการฆ่าหนอนกอ 51

4.8 ลักษณะการทำลายต้นข้าวของหนอนกอ 53

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำ

ในบทที่ 1 นี้ผู้วิจัยได้นำเสนอความเป็นมาของการทำวิจัย วัตถุประสงค์ของการวิจัย คำถามของการวิจัย สมมติฐานของการวิจัยและกรอบแนวคิดในการวิจัย ขอบเขตของการวิจัย การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่จะใช้ในการวิจัย และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.2 หลักการและเหตุผล

จากผลิตภัณฑ์มวลรวม (GDP) ไตรมาสที่ 1/2553 ขยายตัว 12 % ซึ่งสูงสุดในรอบ 15 ปี โดยแยกเป็นส่วนของภาคเกษตร 0.2 % โดยสาขาประมงขยายตัว 2.5 % จากรายการกุ้งแช่แข็งส่งออกที่เพิ่มขึ้น ส่วนสาขาเกษตรกรรมลดลง 0.3 % เป็นการลดลงในผลผลิตพืชที่สำคัญคือ ข้าว อ้อยและมันสำปะหลัง (http://www.nesdb.go.th) เนื่องจากส่วนของพืชเป็นสัดส่วนที่มีความสำคัญที่สุด จากสภาวะการแข่งขันในตลาดโลกที่สูงขึ้นโดยเฉพาะสินค้าเกษตรและอาหาร ซึ่งเป็นสินค้าหลักของประเทศไทย อีกทั้งปัจจุบันประเทศคู่ค้าที่สำคัญของไทยได้มีการกำหนดมาตรการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) ดังนั้น กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงได้มีการส่งเสริมให้ทำการเกษตรให้ได้ผลิตผลที่ปลอดภัยจากสารพิษและทำเกษตรอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น โดยกำหนดการปฏิบัติทางการเกษตรตามระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP; Good Agricultural Practice) ซึ่งมีวิธีการควบคุมศัตรูพืชแบบพึ่งพาสารเคมีให้น้อยที่สุด (จิระเดช แจ่มสว่าง. 2550 : ไม่มีเลขหน้า) ใช้วิธีการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาทดแทนสารเคมีให้มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นสารพิษส่วนมากมีสมบัติในการทำลายล้างสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์และจุลินทรีย์แทบทุกชนิด ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชนั้นๆ แนวความคิดที่จะเลิกใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและเปลี่ยนมาใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่ไม่ส่งผลเสียต่อมนุษย์ สัตว์ สิ่งแวดล้อม ตลอดจนเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศเป็นสิ่งที่ทุกคนปรารถนา จากการศึกษาการสูญเสียของผลผลิตทางการเกษตรจากการทำลายของสัตรูพืชและวัชพืชเฉลี่ยของโลกพบว่าสูญเสียกว่า 40 % โดยเฉพาะสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น เช่น ประเทศไทยที่สามารถปลูกพืชได้ตลอดทั้งปี ศัตรูพืชสามารถแพร่พันธุ์และระบาดได้ทั้งปีเช่นกัน จึงสร้างความเสียหายอย่างมาก ดังนั้น การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี (Biocontrol) ซึ่งเป็นการลดปริมาณประชากรและลดกิจกรรมของเชื้อโรคพืชที่จะก่อให้เกิดโรคจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืช โดยอาศัยสิ่งมีชีวิต (Organism) ทั้งนี้หมายรวมถึงพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Antagonistic microorganism) ตลอดจนสารพันธุกรรมหรือผลิตผลจากสารพันธุกรรม (Genes or gene products) ของสิ่งมีชีวิต แต่ยกเว้นผลจากการกระทำต่อเชื้อโรคโดยตรงจากมนุษย์ ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชและแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในการเป็นปฏิปักษ์ (เยาวพา สุวัตถิ. ม.ปป.ป : 66-93)

ปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาวิธีการควบคุมโรคพืชใหม่ๆ ทางชีวภาพเพื่อลดอันตรายจากการใช้สารเคมีทางการเกษตร โดยให้เกษตรกรหันมาใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งถือเป็นวิธีที่ยอมรับว่าใช้ได้ผลดี ได้มีการศึกษาถึงกลไกการควบคุมโรคและระบบการควบคุมโรคโดยวิธีต่างๆ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Antagonist) ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เชื้อแบคทีเรียมักเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคพืชโดยการแก่งแย่งอาหาร การยับยั้ง ทำลายและการเป็นปรสิต นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นอีก เช่น ให้เกษตรกรหันมาปลูกพืชแบบผสมผสานแทนการปลูกพืชเชิงเดี่ยวก็ได้ผลดีในระดับหนึ่ง แต่โดยภาพรวมยังไม่เป็นที่น่าพอใจ ทั้งนี้เนื่องจาก GDP ที่ขยายตัวมาจากภาคนอกการเกษตร ส่วนภาคการเกษตร โดยเฉพาะพืชผลหดตัว 0.3 % โดยผลผลิตจากมันสำปะหลัง อ้อย ข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลดลงดังกล่าวแล้ว ทั้งนี้ด้วยสาเหตุที่สำคัญคือภัยแล้งและโรคระบาด รัฐบาลจึงมีนโยบายเร่งด่วนที่จะเพิ่มขีดความสามารถให้ภาคอาหารและเกษตร เพื่อให้การผลิตได้ทั้งปริมาณและคุณภาพที่มีความปลอดภัย ซึ่งจะเห็นได้จากการที่รัฐมนตรีว่าการกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ดร.วีระชัย วีระเมธีกุล) ได้สั่งการให้ สวทช. เร่งเพิ่มขีดความสามารถให้อาหารและเกษตร เพื่อรองรับความต้องการของชุมชนและเอกชน หวังสร้างมูลค่าสินค้าไทยแข่งขันกับต่างชาติ เนื่องจากอาหารและเกษตรเป็นหัวใจสำคัญของประเทศไทย จึงต้องการให้นำความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นาโนเทคโนโลยี ไบโอเทคโนโลยี มาช่วยแก้ปัญหาหรือสร้างมูลค่าให้สินค้าของประเทศไทยในการแข่งขันกับต่างชาติ หรือแม้แต่แก้ปัญหาเฉพาะหน้า เช่น ภัยแล้งที่เกิดจากโลกร้อน ฝนทิ้งช่วงที่สร้างความเดือดร้อนให้ภาคการเกษตร ปุ๋ยนาโนที่จะควบคุมการปลดปล่อยสารอาหารออกมาในเวลาที่พืชต้องการ โดยให้เน้นงานยุทธศาสตร์เรื่องความปลอดภัยของอาหารและกระบวนการผลิตที่จะส่งผลกระทบต่อธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม โดยมองว่าตลาดสินค้าที่เน้นเรื่องความปลอดภัยทั้งกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมีแนวโน้มเติบโตได้ดีในอนาคต (**วท.รุกเพิ่มมูลค่าภาคอาหาร-เกษตร**. 2553)

นาโนเทคโนโลยี เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจัดการ การสร้างการสังเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องจักรหรือสิ่งต่างๆ ที่มีขนาดเล็กมากประมาณ 1 ถึง 100 นาโนเมตร ดังนั้นความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยีจึงสามารถนำมาใช้จัดเรียงอะตอมหรือโมเลกุลเข้าด้วยกันอย่างถูกต้องแม่นยำ ส่งผลให้โครงสร้างของวัสดุหรือสสารต่างๆ มีสมบัติที่พิเศษขึ้นทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้สอยและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีที่เป็นความหวังใหม่ของมวลมนุษยชาติ เพราะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายและหลากหลายมากขึ้น การนำนาโนเทคโนโลยีไปใช้ประโยชน์เป็น

การบูรณาการศาสตร์หลากหลายแขนงเข้าด้วยกัน เช่น อิเล็กทรอนิกส์ วัสดุศาสตร์ และเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งกำลังพัฒนาอยู่อย่างต่อเนื่องและนับวันจะเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้น ไม่ว่าผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดโรคภัยไข้เจ็บ ผลิตภัณฑ์ในการชะลอความแก่ เครื่องสำอาง คอมพิวเตอร์ นาโนไบโอเซ็นเซอร์ เส้นใยนาโน อนุภาคนาโน นาโนเทคโนโลยีเกี่ยวกับพลังงาน นาโนเทคโนโลยีเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม และนาโนเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับการเกษตรและอาหาร เป็นต้น

จากเหตุผลและความจำเป็นดังกล่าวข้างต้นทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะนำสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมาผสมผสานกับองค์ความรู้ทางด้านนาโนวิทยาศาสตร์และนาโนเทคโนโลยี เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดของข้าว ซึ่งข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับต้นๆ ของพืชเศรษฐกิจทั้งหลาย ดังนั้นการแก้ปัญหาศัตรูข้าวจึงมีความจำเป็นเร่งด่วน

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.3.1 เพื่อนำสารสกัดจากธรรมชาติมาทำการเพิ่มฤทธิ์ด้วยเทคนิคกึ่งสังเคราะห์ (Semi-synthesis) และควบคุมขนาดของอนุภาคให้อยู่ในระดับนาโนเมตร

1.3.2 เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (Physico-chemical properties) บางประการและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological properties) ของสารนาโนอินทรีย์และนาโนโลหะอินทรีย์ในการต้านเพลี้ยกระโดด

1.3.3 เพื่อทราบแนวทางการควบคุมสัตรูพืชแบบใหม่ โดยอาศัยความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยี

1.4 กรอบแนวคิดหรือทฤษฎีของแผนการวิจัย

1.4.1 นำสารสกัดสมุนไพรกลุ่ม แอลดีไฮด์ เช่น Syringal dehyde มาควบแน่นกับเอมีนปฐมภูมิ คือ Salicylic hydrazide และ Isoniazid จะได้อนุพันธ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติตัวใหม่ของนาโนอินทรีย์ หรือ นาโนไฮดราโซน

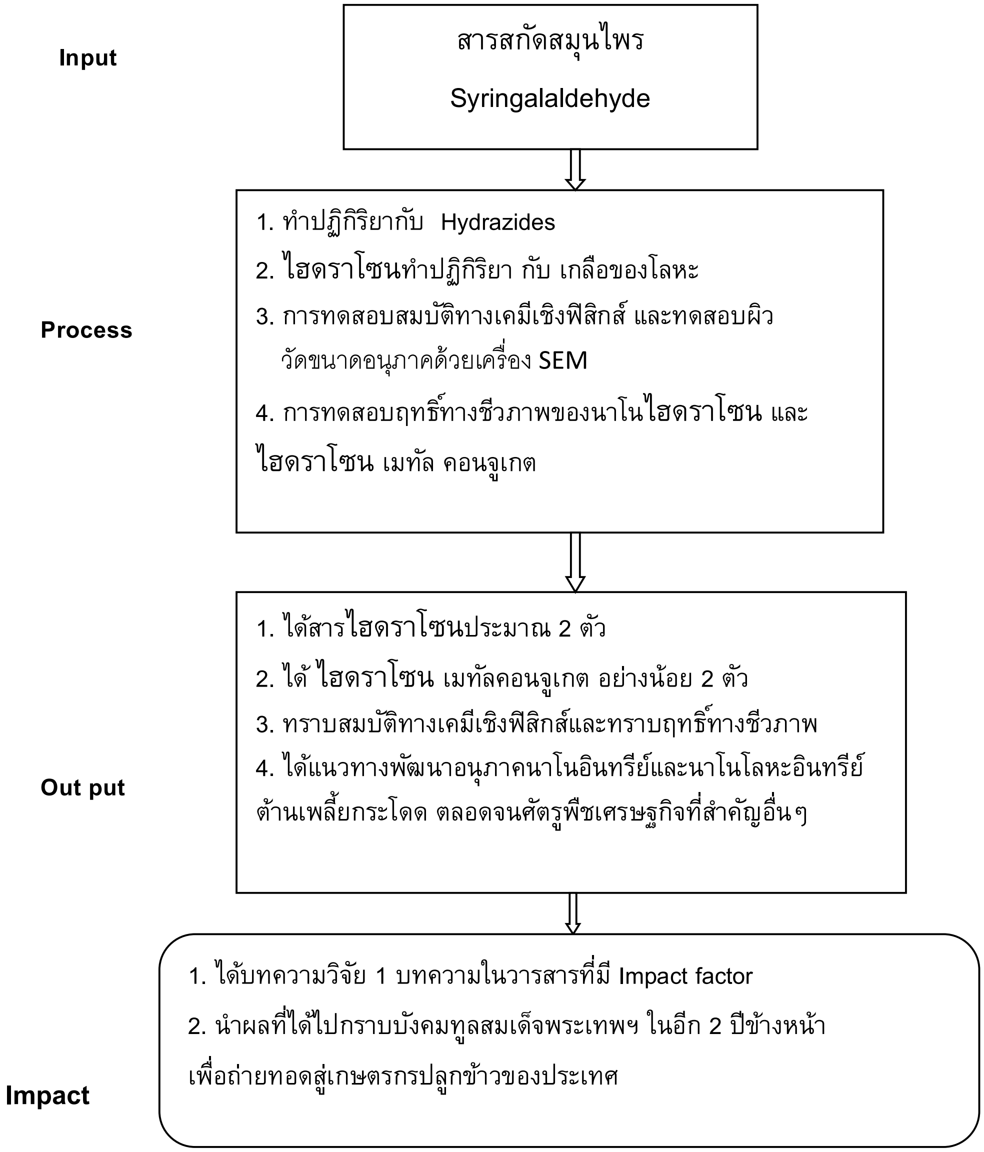
1.4.2 นำสารนาโนอินทรีย์ไปคอนจูเกตกับโลหะจะได้สารใหม่ต่อไปคือนาโนโลหะอินทรีย์

1.4.3 นำสารใหม่ในข้อ 1.4.1 และ 1.4.2 ไปศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (Physicochemical properties)

1.4.4 นำสารในข้อ 1.4.1 และ 1.4.2 ไปศึกษาทางด้านลักษณะและขนาดของอนุภาคด้วยเครื่อง AFM

1.4.5 ทดสอบความสามารถในการกำจัดเพลี้ยกระโดดของศัตรูพืชเศรษฐกิจในห้องปฏิบัติการ

1.4.6 ทดสอบความเป็นพิษ (Side effect) ของสารที่ได้



Input

สารสกัดสมุนไพร
Syringalaldehyde

Process

1. ทำปฏิกิริยากับ Hydrazides
2. ไฮดราโซนทำปฏิกิริยา กับ เกลือของโลหะ
3. การทดสอบสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ และทดสอบผิว วัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง SEM
4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของนาโนไฮดราโซน และไฮดราโซน เมทัล คอนจูเกต

Out put

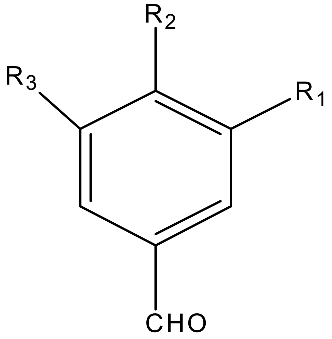
1. ได้สารไฮดราโซนประมาณ 2 ตัว
2. ได้ ไฮดราโซน เมทัลคอนจูเกต อย่างน้อย 2 ตัว
3. ทราบสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์และทราบฤทธิ์ทางชีวภาพ
4. ได้แนวทางพัฒนาอนุภาคนาโนอินทรีย์และนาโนโลหะอินทรีย์ต้านเพลี้ยกระโดด ตลอดจนศัตรูพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอื่นๆ

Impact

1. ได้บทความวิจัย 1 บทความในวารสารที่มี Impact factor
2. นำผลที่ได้ไปกราบบังคมทูลสมเด็จพระเทพฯ ในอีก 2 ปีข้างหน้าเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกรปลูกข้าวของประเทศ

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 นำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ Natural aldehyde ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ มาทำปฏิกิริยาการควบแน่นกับ Hydrazides ที่มี functional group เป็น $-NH_2$ ในสภาวะที่เหมาะสมได้ Novel hybrid hydrazones หรือสารนาโนอินทรีย์ตัวใหม่ 2 ตัว



Natural aldehyde

1.5.2 นำไฮดราโซนตัวใหม่ ในข้อ 8.1 มาทำปฏิกิริยากับเกลือของโลหะ เช่น Silver nitrate จะได้ Nano-organometallic agents อีก 2 ตัว

1.5.3 นำสารที่ได้ในข้อ 1.5.1 และ 1.5.2 ไฮดราโซน 2 ตัว และ Organometallic agents 2 ตัว และ สารเริ่มต้น มาทดสอบสมบัติทางเคมีเชิงฟิสกส์ (Physico-chemical properties) อาทิ ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างๆ (Solubility) การดูดกลืนแสง การนำไฟฟ้า (Conductivity) จุดหลอมเหลว (Melting point) และการตกผลึก (Crystallization) เป็นต้น

1.5.4 นำสารที่ได้ในข้อ 1.5.1 และ 1.5.2 มาศึกษาพื้นผิวและหาขนาดของอนุภาคด้วยเครื่อง AFM

1.5.5 นำสารที่ได้ในข้อ 1.5.1 และ 1.5.2 และสารเริ่มต้น มาทดสอบสมบัติฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) ในการกำจัดเพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens* (Stal) และการเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Normal cell lines) หรือ Side effect

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทนำ

ในบทนี้ได้ให้รายละเอียดในสิ่งต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.1.1 นาโนเทคโนโลยี

2.1.2 กระบวนการสังเคราะห์ของนาโนเทคโนโลยี

2.1.3 การใช้ประโยชน์จากนาโนเทคโนโลยี

2.1.4 อนุมูลอิสระ (Free radical)

2.1.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

2.1.6 ผลกระทบหรือผลเสียของอนุมูลอิสระต่อสุขภาพ

2.1.7 ดัชนีชี้วัดจากความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity,TAC)

2.1.8 วิธีที่นิยมในการศึกความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ

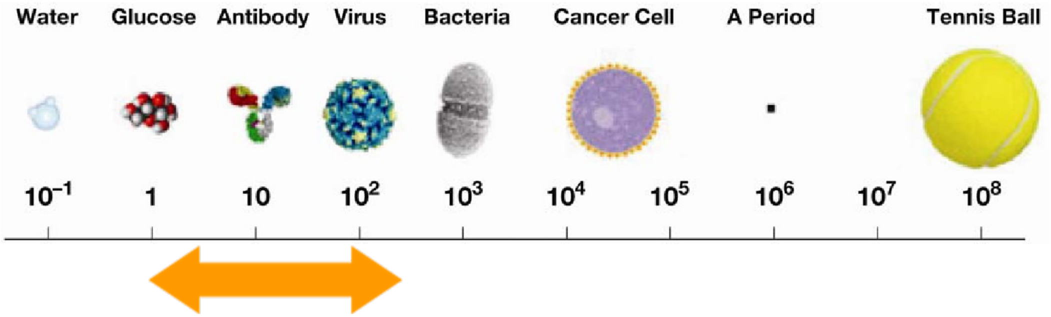
2.1.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2 นาโนเทคโนโลยี

ความเข้าใจในพื้นฐานของชีวิตเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดองค์ความรู้แบบบูรณาการของเคมี ชีวเคมี ชีววิทยา คอมพิวเตอร์ จนก่อให้เกิดเป็นศาสตร์ที่เรียกว่า เทคโนโลยีชีวภาพ ก่อให้เกิดการประยุกต์ใช้ความรู้เกี่ยวกับการดัดแปลงพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยีชีวภาพก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น การส่งถ่ายยีนแบบสุ่มที่ไม่สามารถกำหนดได้อย่างแม่นยำว่ายีนที่ส่งถ่ายเข้าไปได้เข้าไปในส่วนของ DNA ที่ต้องการหรือไม่ นอกจากนั้นเทคโนโลยีชีวภาพยังไม่สามารถก่อให้เกิดการประดิษฐ์จักรกลโมเลกุลชนิดใหม่ที่คล้ายคลึงกับกลไกในร่างกายได้ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดที่ว่ากลไกต่างๆ ของ DNA, RNA ไรโบโซม กรดแอมิโนและโปรตีนล้วนเกิดขึ้นในสารละลายที่มีอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้นและจะถูกทำลายลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 ^{0}C ดังนั้นจึงมีอีกหลายสิ่งที่องค์ประกอบเหล่านั้นไม่สามารถสร้างขึ้นได้ แต่ด้วยเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าในศตวรรษที่ 21 ในอนาคตเราสามารถสร้างจักรกลชีวภาพที่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเอง ซ่อมแซมตัวเอง เทคโนโลยีดังกล่าวจะเกิดขึ้นเมื่อใดและจะปฏิวัติวิถีชีวิตของเราอีกมากน้อยเพียงใด เพราะนั้นเป็นแนวทางที่จะเกิดต่อไปด้วย นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

นาโนเมตรเป็นหน่วยวัดอย่างหนึ่งซึ่งมาจากคำ 2 คำรวมกัน คือ “นาโน” กับ “เมตร” คำว่า “นาโน (Nano)” เป็นคำที่ใช้นำหน้าหน่วยวัดต่างๆ มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกว่า “Nanos” ซึ่งแปลว่า “เล็กหรือแคระ” เมื่อนำคำว่านาโนมาใช้นำหน้าหน่วยวัดทางวิทยาศาสตร์หรือคณิตศาสตร์จะหมายถึงเศษหนึ่งส่วนพันล้านส่วนของหน่วยวัดนั้น ซึ่งเป็นขนาดที่เล็กกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นผมคนประมาณ 80,000 ถึง 100,000 เท่า สิ่งที่เล็กที่สุดที่มนุษย์สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้มีขนาด 10,000 นาโนเมตร ดังนั้นสิ่งของขนาดหนึ่งนาโนเมตรตาเราไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยเปล่า หรือแม้แต่ใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา การที่จะมองเห็นสิ่งที่เล็กขนาดนี้ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายที่สูงมากหรือจะต้องเป็นกล้องที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อใช้กับนาโนเทคโนโลยีโดยเฉพาะเท่านั้น

นาโนเทคโนโลยี เทคโนโลยีประยุกต์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจัดการ การสร้าง การสังเคราะห์วัสดุหรืออุปกรณ์ในระดับของอะตอม โมเลกุลหรือชิ้นส่วนที่มี**ขนาดเล็กในช่วง 1 ถึง 100 นาโนเมตร** ซึ่งจะส่งผลให้วัสดุหรืออุปกรณ์ต่างๆ **มีหน้าที่ใหม่ ๆ และมีสมบัติที่พิเศษขึ้น**ทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ ทำให้มีประโยชน์ต่อผู้ใช้สอยและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจได้



ภาพที่ 2.1 การเปรียบเทียบขนาดของอนุภาค
ที่มา : ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (2554 : 2)

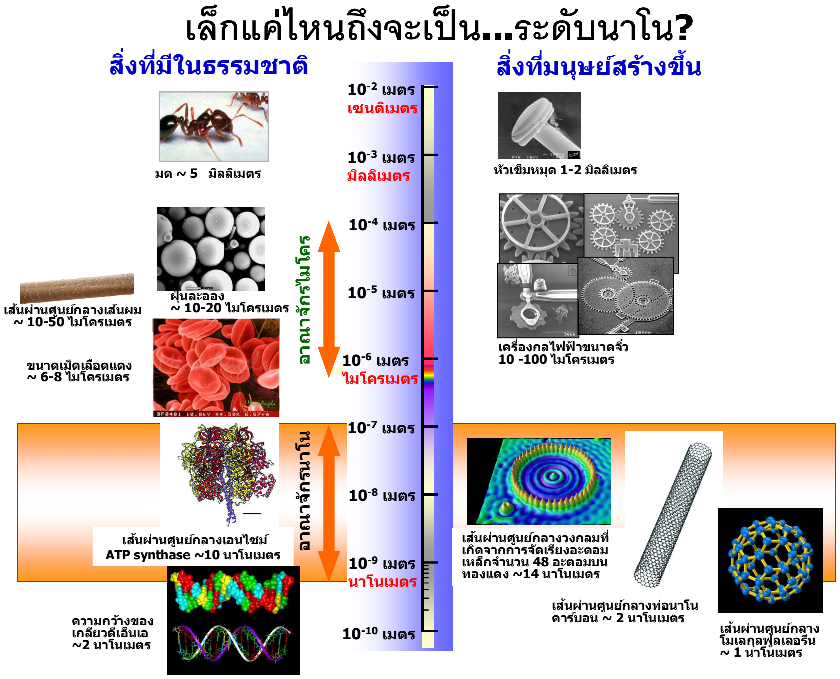
องค์ประกอบของนาโนเทคโนโลยี

1. ขนาดเล็กในระดับ 1 - 100 นาโนเมตร
2. มีหน้าที่ใหม่ๆ เกิดขึ้นหรือมีสมบัติที่พิเศษขึ้น
3. ถูกต้อง แม่นยำ และควบคุมได้

นั่นคือสิ่งที่จะเรียกได้ว่าเป็นนาโนเทคโนโลยีจะต้องมีคุณสมบัติครบทั้ง 3 ประการ คือ ขนาดจะต้องอยู่ในช่วง 1 - 100 นาโนเมตร มีหน้าที่ใหม่ๆ เกิดขึ้นหรือมีสมบัติพิเศษที่แตกต่างๆ ไปจากเดิม เนื่องจากวัสดุที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรจะมีสมบัติต่างๆ เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

เช่น สมบัติทางแม่เหล็ก สมบัติทางไฟฟ้า สมบัติทางกายภาพ สมบัติทางแสงและสมบัติทางเคมี ดังตัวอย่างของทองคำ เมื่อมีขนาดในระดับนาโนจะมีสีแดง มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมี หรือเงินเมื่อมีขนาดในระดับนาโนจะมีสีเหลือง สีม่วง สีเทา มีสมบัติทางชีวภาพ เช่น ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้

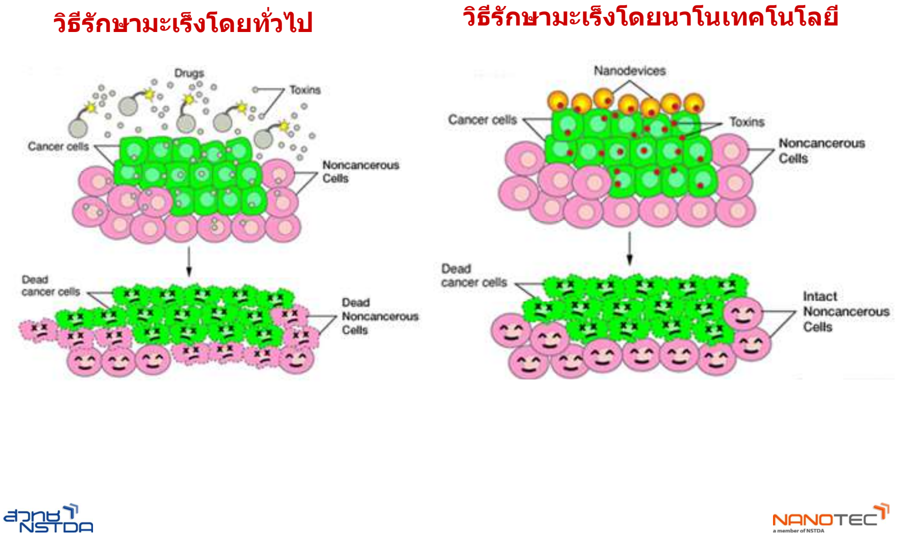
สมบัติของวัสดุขนาดนาโนที่พิเศษนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น แคปซูลยาขนาดนาโนสามารถนำยาไปยังเป้าหมายที่ต้องการในส่วนต่างๆ ของร่างกายได้อย่างแม่นยำ ทำให้ผลการรักษาโรคมีประสิทธิภาพสูงขึ้นและลดผลข้างเคียง จึงทำให้มีการค้นคว้าและพัฒนาเทคโนโลยีเกี่ยวกับวัสดุขนาดนาโนอย่างกว้างขวางและกำลังก้าวหน้าอย่างรวดเร็วจนมีการผลิตและใช้ในเชิงพาณิชย์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับสิ่งของขนาดนาโนเรียกว่า นาโนเทคโนโลยี


เล็กแค่ไหนถึงจะเป็น...ระดับนาโน?
สิ่งที่มีในธรรมชาติ
สิ่งที่มนุษย์สร้างขึ้น
10^{-2} เมตร
เซนติเมตร
10^{-3} เมตร
มิลลิเมตร
10^{-4} เมตร
10^{-5} เมตร
10^{-6} เมตร
ไมโครเมตร
10^{-7} เมตร
10^{-8} เมตร
10^{-9} เมตร
นาโนเมตร
10^{-10} เมตร
อาณาจักรไมโคร
อาณาจักรนาโน
มด ~ 5 มิลลิเมตร
ฝุ่นละออง ~ 10-20 ไมโครเมตร
เส้นผ่านศูนย์กลางเส้นผม ~ 10-50 ไมโครเมตร
ขนาดเม็ดเลือดแดง ~ 6-8 ไมโครเมตร
เส้นผ่านศูนย์กลางเอนไซม์ ATP synthase ~10 นาโนเมตร
ความกว้างของเกลียวดีเอ็นเอ ~2 นาโนเมตร
หัวเข็มหมุด 1-2 มิลลิเมตร
เครื่องกลไฟฟ้าขนาดจิ๋ว 10 -100 ไมโครเมตร
เส้นผ่านศูนย์กลางวงกลมที่เกิดจากการจัดเรียงอะตอมเหล็กจำนวน 48 อะตอมบนทองแดง ~14 นาโนเมตร
เส้นผ่านศูนย์กลางท่อนาโนคาร์บอน ~ 2 นาโนเมตร
เส้นผ่านศูนย์กลางโมเลกุลฟูลเลอรีน ~ 1 นาโนเมตร

ภาพที่ 2.2 ขนาดของอนุภาคนาโน

ที่มา : ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (2554 : 4)

นาโนเทคโนโลยีกับการรักษาโรคมะเร็ง


วิธีรักษามะเร็งโดยทั่วไป
Drugs
Toxins
Cancer cells
Noncancerous Cells
Dead cancer cells
Dead Noncancerous Cells
วิธีรักษามะเร็งโดยนาโนเทคโนโลยี
Nanodevices
Cancer cells
Toxins
Noncancerous Cells
Dead cancer cells
Intact Noncancerous Cells

ภาพที่ 2.3 เปรียบเทียบผลการรักษาโรคมะเร็งแบบเดิมกับแบบใหม่

ที่มา : ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (2554 : 40)

จากภาพจะเห็นว่าวิธีการรักษาโรคมะเร็งโดยทั่วไปที่ใช้กันอยู่มีจุดด้อย เนื่องจากยาออกฤทธิ์อย่างไม่จำเพาะทำลายทั้งเซลล์มะเร็งและในขณะเดียวกันก็ทำลายเซลล์ปกติด้วย ส่วนการรักษาด้วยนาโนเทคโนโลยีนั้นมีจุดเด่นคือยาออกฤทธิ์อย่างจำเพาะทำลายเฉพาะเซลล์มะเร็ง ส่วนเซลล์ปกติไม่เสียหาย นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณที่ใช้ลดลง (Low dose)

2.3 กระบวนการสร้างและการสังเคราะห์ของนาโนเทคโนโลยี

กระบวนการสร้างและการสังเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 1) การสร้างหรือการสังเคราะห์อุปกรณ์นาโนโดยใช้กระบวนการแบบบนลงล่าง (Top down) 2) การสร้างหรือการสังเคราะห์โดยใช้กระบวนการล่างสู่บน (Bottom up)

2.3.1 การสังเคราะห์แบบบนลงล่าง

ตัวอย่างของการสังเคราะห์หรือการสร้างอุปกรณ์นาโนในลักษณะนี้มีดังนี้

1) การสลักลวดลาย (Lithography)

2) การตกตะกอน (Deposition)

3) การกัดด้วยกรด (Etching)

4) การดัดแปลงเนื้อวัสดุ (Material modification)

2.3.2 การสังเคราะห์แบบล่างสู่บน

ตัวอย่างของการสังเคราะห์หรือการสร้างอุปกรณ์นาโนในลักษณะนี้มีดังนี้

1) การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis)

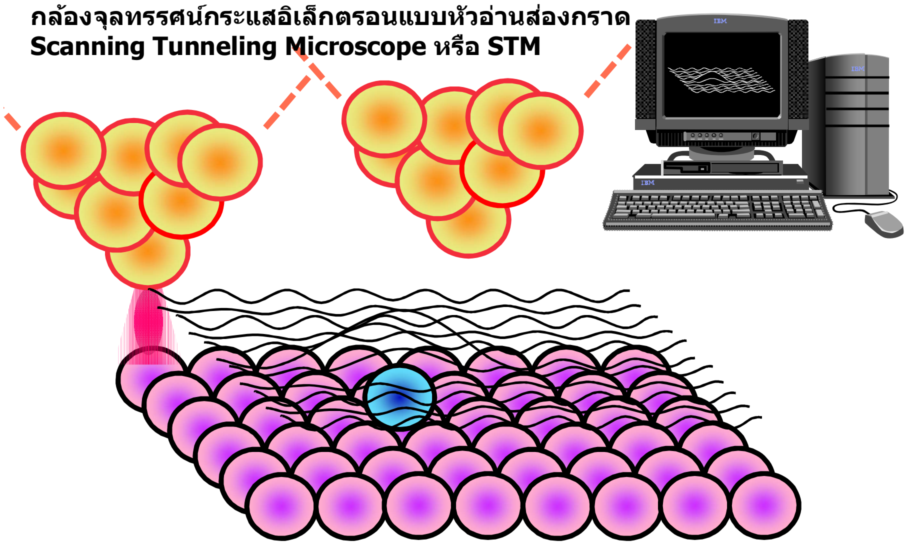
2) การประกอบตัวเอง (Self assembly)

3) การย้ายอะตอมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning probe manipulation)

2.4 เครื่องมือวัดทางนาโนเทคโนโลยี

การประดิษฐ์อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์หรือศึกษาวัสดุในระดับนาโนจนประสบความสำเร็จถือเป็นความสำเร็จก้าวแรกของการศึกษานาโนเทคโนโลยี คือ การใช้กล้องจุลทรรศ์แบบหัวส่องกราดหรือกล้อง STM (Scanning Tunneling Microscope) สแกนพื้นผิวโดยวัดกระแสไฟฟ้าที่ทะลุผ่านช่องว่างหัวเข็มของกล้อง STM กับผิวหน้าของตัวอย่าง ลักษณะคล้ายกับการใช้มือลูบไปตามพื้นผิวจะทำให้ทราบลักษณะของพื้นผิว นอกจากนั้นเครื่องนี้ยังสามารถใช้จัดเรียงอะตอมให้มีรูปร่างต่างๆ ตามที่เราต้องการได้อีกด้วย

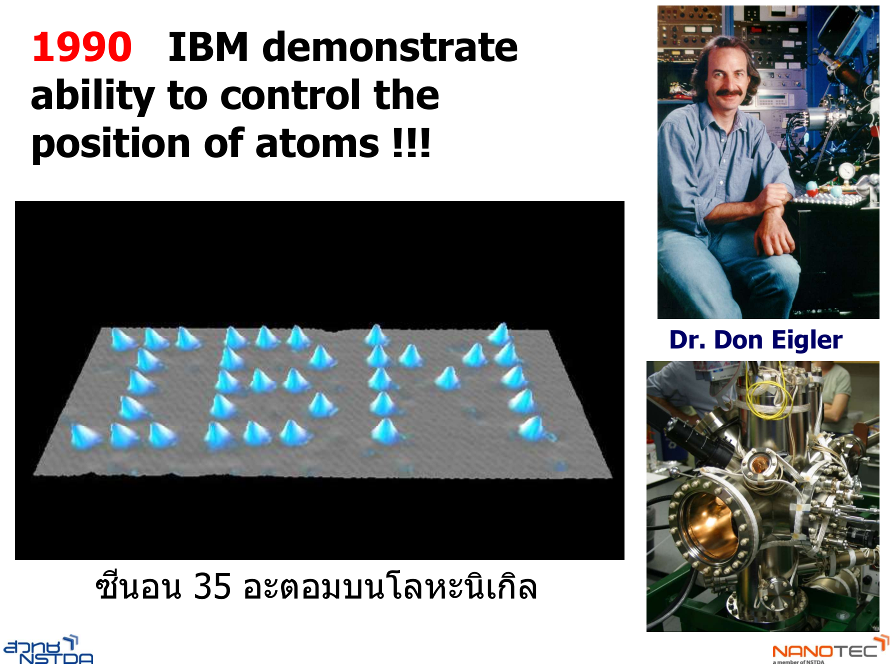
กล้อง STM สแกนพื้นผิวของตัวอย่างโดยการวัดกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์บังคับปลายเข็มโลหะที่แหลมให้เคลื่อนที่ไปบนผิวของตัวอย่างโดยปลายเข็มจะเคลื่อนที่ขึ้นลงตามความสูงต่ำของพื้นผิว


กล้องจุลทรรศน์กระแสอิเล็กตรอนแบบหัวอ่านส่องกราด
Scanning Tunneling Microscope หรือ STM
IBM

Don Eigler, IBM

ภาพที่ 2.4 ลักษณะการทำงานของกล้องจุลทรรศน์
ที่มา : ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (2554 : 14)

นอกจากนั้นกล้อง STM ยังสามารถใช้เคลื่อนย้ายอะตอมไปบนผิวตามต้องการ โดยอาศัยแรงดึงดูดระหว่างอิเล็กตรอนที่หัวเข็มกับอะตอมของตัวอย่าง ซึ่งดอน ไอเกอร์ (Don Eigler) แห่งบริษัทไอบีเอ็มเป็นคนแรกที่ใช้กล้อง STM เรียงอะตอมซีนอน 35 อะตอมเป็นอักษร “IBM” บนชั้นอะตอมของนิเกิลได้สำเร็จในปี พ.ศ. 1990



1990 IBM demonstrate ability to control the position of atoms !!!

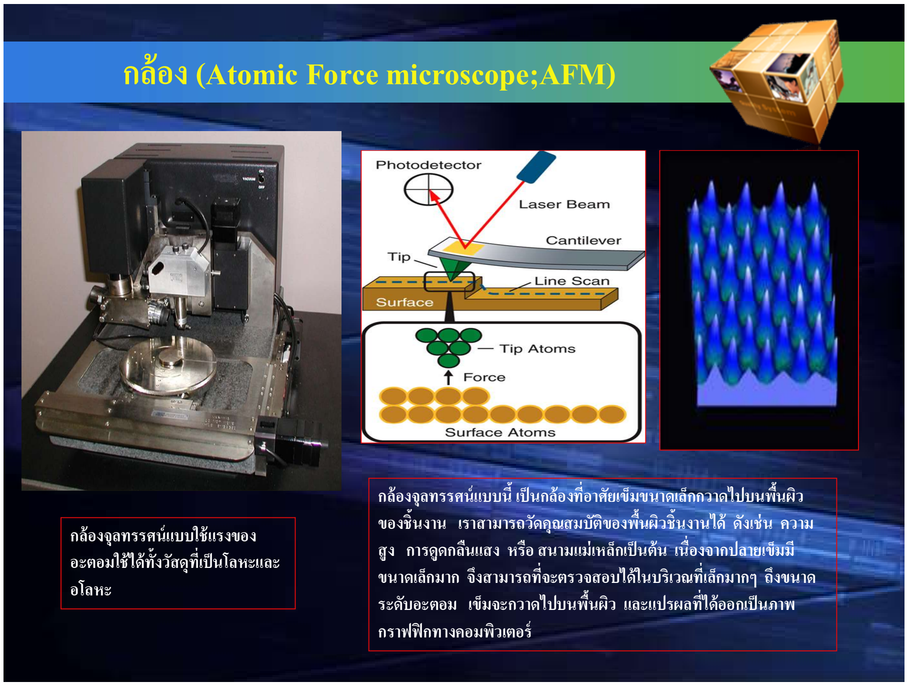
Dr. Don Eigler

ซีนอน 35 อะตอมบนโลหะนิเกิล

ภาพที่ 2.5 การจัดวางอะตอมบนโลหะนิเกิล
ที่มา : ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (2554 : 16)

กล้อง AFM (Atomic Force Microscope) เป็นเครื่องมือที่สำคัญมากต่อการศึกษาทางด้านนาโนเทคโนโลยี เป็นเครื่องที่ใช้สแกนพื้นผิวของตัวอย่างเช่นเดียวกับกล้อง STM แต่มีกลไกที่แตกต่างกันคือ กล้อง AFM จะอาศัยแรงกระทำกับอะตอม (Atomic Force) ในขณะที กล้อง STM ใช้แรงทางไฟฟ้า

กล้อง AFM ใช้ศึกษาโครงสร้างที่ซับซ้อน (Complex) ของโมเลกุล นอกจากนี้ยังใช้ในการตัด หัก งอ บิดและเคลื่อนย้ายโมเลกุลได้ตามต้องการ แต่การผลิตสารอินทรีย์ที่ละโมเลกุลยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากส่วนประกอบระดับนาโนในสิ่งมีชีวิตเป็นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์เข้าไม่ถ่องแท้



กล้อง (Atomic Force microscope;AFM)

Photodetector
Laser Beam
Cantilever
Tip
Line Scan
Surface
Tip Atoms
Force
Surface Atoms

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แรงของอะตอมใช้ได้ทั้งวัสดุที่เป็นโลหะและอโลหะ

กล้องจุลทรรศน์แบบนี้ เป็นกล้องที่อาศัยเข็มขนาดเล็กกวาดไปบนพื้นผิวของชิ้นงาน เราสามารถวัดคุณสมบัติของพื้นผิวชิ้นงานได้ ดังเช่น ความสูง การดูดกลืนแสง หรือ สนามแม่เหล็กเป็นต้น เนื่องจากปลายเข็มมีขนาดเล็กมาก จึงสามารถที่จะตรวจสอบได้ในบริเวณที่เล็กมากๆ ถึงขนาดระดับอะตอม เข็มจะกวาดไปบนพื้นผิว และแปรผลที่ได้ออกเป็นภาพกราฟฟิกทางคอมพิวเตอร์

ภาพที่ 2.6 กล้อง Atomic Force Microscope

ที่มา : ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (2551)

อุปกรณ์ทางด้านนาโนเทคโนโลยีเหล่านี้สามารถช่วยให้เราสามารถมองเห็นพื้นผิวระดับอะตอมได้เป็นครั้งแรก จึงทำให้เข้าใจโครงสร้างต่างๆ ในระดับนาโนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ปรับแต่งโมเลกุล ใช้สร้างภาพ หรือตัวอักษรขนาดจิ๋วโดยเรียงอะตอมหรือโมเลกุลบนพื้นผิวที่มีโครงสร้างอย่างจำเพาะ

2.5 การใช้ประโยชน์จากนาโนเทคโนโลยี

นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีที่เป็นความหวังใหม่ของมวลมนุษยชาติ เพราะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายและหลากหลายมากขึ้น การนำนาโนเทคโนโลยีไปใช้ประโยชน์เป็นการบูรณาการศาสตร์หลายแขนงเข้าด้วยกัน เช่น เทคโนโลยีชีวภาพ วัสดุศาสตร์ และอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งกำลังพัฒนาอยู่อย่างต่อเนื่องและนับวันจะเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรค ผลิตภัณฑ์ความงามชะลอความแก่ สิ่งทอ อาหาร ที่อยู่อาศัย เครื่องอำนวยความสะดวกต่างๆ พลังงาน วัสดุเครื่องใช้ที่มีน้ำหนักเบาแต่มีความแข็งและเหนียว การสร้างวัสดุที่ฉลาด (Material intelligence) การประดิษฐ์วงจรไฟฟ้าที่มีความเร็วกว่าเดิมนับร้อยนับพันเท่าจนกลายเป็นคอมพิวเตอร์

ที่สามารถคิดตัดสินใจเองได้ในที่สุด และยังทำให้เกิดความหวังอื่นๆ เพิ่มขึ้นอีกมหาศาล ในที่นี้จะให้รายละเอียดโดยสังเขปเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ความรู้ทางนาโนเทคโนโลยีในด้านต่างๆ (โครงการสร้างความเข้าใจวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรมแก่สาธารณชน. 2549 : 66-93) ดังนี้

2.5.1 นาโนเทคโนโลยีกับการแพทย์

นาโนเทคโนโลยีกับการแพทย์ เป็นการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคที่มีประสิทธิภาพสูง แม่นยำและรวดเร็วโดยใช้นาโนไบโอเซนเซอร์ การค้นหาและออกแบบโมเลกุลของยาให้มีขนาดระดับนาโนที่สามารถออกฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อเป้าหมาย (Target) ส่วนยาที่ละลายน้ำยากสามารถบรรจุในแคปซูลระดับนาโนเพื่อส่งยาไปยังเป้าหมาย การใช้นาโนเทคโนโลยีทำให้เกิดทางเลือกใหม่ๆ ในการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น สรุปการนำความรู้ทางนาโนเทคโนโลยีมาใช้ทางการแพทย์เพื่อวัตถุประสงค์ดังนี้

การวิเคราะห์และวินิจฉันโรค
การค้นพบยาชนิดใหม่
วิธีการรักษาโรคแบบใหม่
ระบบนำส่งยานำวิถี
วิศวกรรมเนื้อเยื่อ
สาธารณสุขพื้นฐาน

2.5.2 นาโนเทคโนโลยีกับอิเล็กทรอนิกส์

นาโนเทคโนโลยีกับอิเล็กทรอนิกส์ เป็นการนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการพัฒนาอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์ซึ่งกำลังทวีความสำคัญมากขึ้น เพราะนาโนเทคโนโลยีสามารถย่อขนาดของชิ้นส่วนคอมพิวเตอร์ให้เล็กลงได้มาก ทำให้คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์มีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา และมีสมรรถนะสูง นาโนอิเล็กทรอนิกส์หมายความครอบคลุมทั้งนาโนคอมพิวเตอร์ ระบบไฟฟ้าเครื่องกลจุลภาค (MEMS/NEMS) หน่วยความจำ โมเลกิวลาร์อิเล็กทรอนิกส์ จอภาพแบบ OLED และอุปกรณ์ประเภทออปติกขนาดนาโน (Nano optics) และอื่นๆ

2.5.3 นาโนเทคโนโลยีกับวัสดุ

นาโนเทคโนโลยีใช้ในการสังเคราะห์วัสดุขนาดซุปเปอร์จิ๋วหรือเรียกว่าวัสดุนาโน (Nanomaterials) วัสดุนาโนสังเคราะห์ได้แก่ โลหะ พอลิเมอร์ เซรามิกและคอมพอสิตที่เกิดขึ้นจากการออกแบบและสังเคราะห์โดยการจัดเรียงอะตอมหรือโมเลกุลเข้าด้วยกันอย่างแม่นยำ โดยสมบัติและพฤติกรรมต่างๆ ของวัสดุนาโน เช่น การนำไฟฟ้า สมบัติเชิงกล สมบัติทางแม่เหล็ก เป็นต้น จะแตกต่างไปจากชนิดเดียวกันที่มีขนาดใหญ่

วัสดุนาโนนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุฉลาดหลายชนิด (Smart materials) วัสดุฉลาดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น เลนส์แว่นตาชนิดพิเศษ เสื้อผ้าที่จดจำผู้ใช้ได้ ทำทรานซิสเตอร์ในอุปกรณ์อัลตราโซนิกทางการแพทย์ ใช้เป็นอุปกรณ์จุดก๊าซในเตาเครื่องทำความร้อน ใช้เป็นพื้นผิวหรือเสื้อผ้าที่ทำความสะอาดตัวเองได้ ใช้ทำวัสดุซ่อมแซมตัวเองได้ซึ่งนำไปใช้ทำถุงมือที่ไม่มีวันรั่ว รถยนต์ไร่รอลขีดข่วน ยางรถยนต์ที่ประสานเนื้อยางเองเมื่อเกิดรูรั่ว วัสดุนาโนยังแบ่งย่อยเป็นอีกหลายกลุ่ม เช่น

นาโนคอมพอสิต (Nanocomposites) เป็นวัสดุที่เกิดจากการเติมอนุภาคนาโนของสารต่างๆ เข้าไปในเนื้อของวัสดุบางชนิด เพื่อปรับปรุงสมบัติของวัสดุนั้นให้ดีขึ้น เช่น ทนความร้อน ป้องกันการติดไฟ เสริมความแข็งแรง การนำไฟฟ้า และเพิ่มความยืดหยุ่น ประโยชน์ของนาโนคอมพอสิต เช่น ใช้ในการสร้างชิ้นส่วนรถยนต์และเครื่องบินที่แข็งแรง แต่น้ำหนักเบา ใช้เป็นสารเคลือบผิวป้องกันการกัดกร่อนและรอยขีดข่วน ใช้ประดิษฐ์เซ็นเซอร์แบบฟิล์มบาง ใช้เป็นฟิล์มเรืองแสง ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ อาหารและเครื่องดื่มที่สามารถป้องกันการซึมผ่านของแก๊สต่างๆ นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเคมีและปูนซีเมนต์

นอกจากนี้ยังมีวัสดุนาโนอื่นๆ อีก เช่น ท่อนาโนคาร์บอน (Carbon nanotube) อนุภาคนาโน เส้นใยนาโน เป็นต้น

2.5.4 นาโนเทคโนโลยีกับเครื่องสำอาง

นาโนเทคโนโลยีได้นำมาใช้พัฒนาคุณภาพและประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของเครื่องสำอาง เช่น การผลิตเครื่องสำอางโดยการบรรจุสารต่างๆ ลงในถุงหุ้มหรือแคปซูลนาโน จะทำให้สารไม่สลายตัวเมื่อถูกแสงหรือออกซิเจน สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารให้ออกมาทีละน้อย

2.5.5 นาโนเทคโนโลยีกับพลังงาน

แหล่งพลังงานบนโลกมีต้นกำเนิดมาจากดวงอาทิตย์ น้ำมัน ถ่านหิน แก๊สธรรมชาติ แหล่งพลังงานเหล่านี้ล้วนเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามที่จะสังเคราะห์โครงสร้างของสารเพื่อจับกับพลังงานแสงอาทิตย์แล้วแปลงเป็นกระแสไฟฟ้า

นอกจากนี้นาโนเทคโนโลยียังเกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม อาหารและการเกษตร ตลอดจนเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ ในการดำรงชีวิต

2.6 อนุมูลอิสระ (free radical) หรือ Reactive oxygen species (ROS)

ROS เป็นโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเลคตรอนเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมาก จัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆ ภายในร่างกายเพื่อให้ตัวมันเสถียร แหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในตัวคนมี 2 แหล่ง คือ จากภายในร่างกาย เช่น การเผาผลาญอาหาร การหายใจ การออกกำลังกาย และจากแหล่งภายนอกร่างกายที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ ความเครียด การติดเชื้อ มลพิษในอากาศ

เป็นต้น อนุมูลอิสระมีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion) ไฮโรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ไฮดรอกซิลแรดดิคอล (Hydroxyl radical) เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจึงเกิดการทำลายโมเลกุลื่นๆ ต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อร่างกายเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า รอบดวงตาและผิวพรรณรวมทั้งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด ต้อกระจก ความดันโลหิตสูง อัลไซเมอร์ เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น ปกติภายในร่างกายของเรามีกลไกป้องกันการโจมตีจากอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (Superoxide dismutase), คาทาเลส (Catalase), กลูทาไทออนเปอร์รอกซิเดส (GPX) เป็นต้น แต่การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระยังไม่เพียงพอและมีขีดจำกัด ประกอบกับเมื่ออายุมากขึ้นร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้น้อยลง ดังนั้นร่างกายจึงควรรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก โดยการรับประทานอาหารมีอุดมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ

2.7 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น กระบวนการออกซิเดชั่นมีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม ทำให้แอปเปิ้ลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายของเราซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชั่น ในอีกทางหนึ่ง กระบวนการออกซิเดชั่นเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น เราใช้ออกซิเจนจากอากาศที่หายใจเข้าไปไปเผาผลาญอาหารที่ร่างกายได้รับให้เป็นพลังงานสำหรับการทำงานของเซลล์ต่างๆ แต่ก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ อนุมูลอิสระต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลดังกล่าว ตัวอย่างเช่น เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับแอลดีแอล (LDL: low-density lipoprotein) ซึ่งเป็นโคเลสเตอรอลตัวเลวทำให้เกิดออกซิไดซ์แอลดีแอล (Oxidized LDL) ซึ่งมีหลักฐานยืนยันว่า ออกซิไดซ์แอลดีแอลเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจ

การเกิดอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจน อนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\cdot}$) และอนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกกว่า อนุมูลอิสระอื่นๆ ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ไซด์และเปอร์ออกซีไนไตรท ($ONOO^-$) แม้ว่าโครงสร้างไม่อยู่ในอนุมูลอิสระแต่เป็นสารที่ได้จากปฏิกิริยาต่อเนื่องที่มีอนุมูลอิสระเป็น

ต้นเหตุ สารที่ไม่ได้อยู่ในรูปอนุมูลเหล่านี้มีบทบาทในปฏิกิริยารีด็อกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมากและมีความเป็นพิษสูง จึงมีการบัญญัติศัพท์ขึ้นใหม่ให้ครอบคลุมทั้งอนุมูลอิสระและสารที่ว่านี้ว่าสารความไวสูง (Reactive species, RS) (โอภา วัชระคุปต์. 2550 : 1)

2.8 ผลกระทบหรือผลเสียของอนุมูลอิสระต่อสุขภาพ

อาการและโรคที่อันเนื่องมาจาก ROS และ RNS

โดยหลักการแล้ว ภาวะ Oxidative stress หรือภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดส์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินสมดุลเป็นผลมาจาก

2.8.1 การลดน้อยลงของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ซึ่งมีผลกระทบต่อเอนไซม์ที่ทำหน้าควบคุมและป้องกันการเกิดออกซิเดชัน กล่าวคือทำหน้าที่กำจัดหรือต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ดังกล่าวนี้ ได้แก่ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสชนิดต่างๆ เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์คาตาเลส เป็นต้น การกลายพันธุ์ทำให้เอนไซม์เหล่านี้ไม่ทำงาน หรือทำงานบกพร่อง หรือสาเหตุจากโรคที่ทำให้เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันลดลงหรือหมดไป รวมทั้งสาเหตุทางโภชนา คือ ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันจากอาหารไม่เพียงพอ ทั้งหมดนี้ทำให้ร่างกายอยู่ในภาวะถูกออกซิไดส์เกิดอาการผิดปกติและตามมาด้วยการเกิดโรคหรือการเจ็บป่วย

2.8.2 การเกิดอนุมูลอิสระและผลิตผลที่เกี่ยวข้องเพิ่มขึ้น อนุมูลอิสระและผลิตผลที่เกี่ยวข้องจะเกิดขึ้นในภาวะต่างๆ เช่น การได้รับออกซิเจนในปริมาณที่สูง หรือการที่เซลล์ได้รับออกซิเจนใหม่ภายหลังจากภาวะขาดเลือดชั่วขณะ แม้ว่าออกซิเจนที่ได้รับจะไม่สูงก็ตาม แต่การทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ภายหลังภาวะขาดเลือดจะบกพร่องทำงานได้น้อยลงทำให้การเผาผลาญออกซิเจนผิดปกติเกิดอนุมูลอิสระและผลิตผลที่เกี่ยวข้องขึ้น การได้รับสารเป็นพิษพวกอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูล $NO_2^{\bullet}$ จากอาหารหรือมลพิษ หรือในภาวะที่ระบบมีการผลิตอนุมูลอิสระถูกกระตุ้น เช่น ระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นหรือในภาวะอักเสบ

ภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดส์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไปและไม่สมดุล ทำให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในการดำรงชีวิต ซึ่งสารชีวโมเลกุลที่เป็นเป้าหมาย คือ ดีเอ็นเอ โปรตีน และ ลิปิด การตายของเซลล์เกิดโดยกลไกที่สำคัญ 2 กลไก คือ กลไกการตายแบบ Necrosis ซึ่งเป็น การตายของเนื้อเยื่อหรือเซลล์จากสารพิษหรือจากเชื้อโรคต่างๆ และกลไกการตายแบบ Apoptosis คือตายตามอายุขัยของเซลล์นั้นๆ โดยการทำลายตัวเองของเซลล์ ซึ่งทั้งสองกลไกนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดภาวะที่เซลล์หรือร่างกายถูกออกซิไดส์ หรือ มีอนุมูลอิสระมาก ในการตายของเซลล์แบบแรกเซลล์จะบวมหรือพองตัวและแตกออก ทำให้องค์ประกอบและสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์กระจายออกมายังบริเวณที่ล้อมรอบภายนอก ส่งผลกระทบต่อเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ข้างเคียง ได้แก่ เอนไซม์หรือสารที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์

คาตาเลส กลูตาไทโอน รวมทั้งสารโปรออกซิแดนท์ (Pro-oxidant) โดยสารโปรออกซิแดนซ์เป็นสารที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระหรือสารที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระ เช่น ไอออนของคอปเปอร์ เหล็กและโปรตีนฮีม ส่วนการตายแบบ Apoptosis จะไม่ปลดปล่อยสิ่งที่บรรจุอยู่ภายในเซลล์ออกมาจึงไม่ทำให้เกิดการรบกวนแก่เซลล์แวดล้อมหรือเซลล์อื่นที่อยู่ข้างเคียง การตายของเซลล์แบบ Apoptosis อาจไปเร่งหรือก่อให้เกิดโรคบางโรค เช่น โรคที่เกี่ยวกับการเสื่อมของระบบประสาท โรคบางโรคสามารถเกิดขึ้นจากภาวะ Oxidative stress โดยตรง เช่น การฉายรังสีหรือการได้รับรังสีทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน โดยเฉพาะโมเลกุลของน้ำจะแตกตัวทำให้มีอนุมูล $^{-}$OH ไปทำลายโปรตีน ดีเอ็นเอ และลิปิดหรือไขมัน โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งโรคส่วนใหญ่อยู่ในภาวะถูกออกซิไดส์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินสมดุลไม่ได้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคแต่จะเป็นผลที่เกิดขึ้นตามมาภายหลังและทำให้โรคมีพัฒนาการกำเริบอย่างรวดเร็ว การที่เนื้อเยื่อเสียหายหรือถูกทำลายจากการติดเชื้อ การบาดเจ็บ การได้รับสารพิษ อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำผิดปกติจะเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณของสารสื่อต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการบาดเจ็บ ได้แก่ พรอสตาแกลนดิน ลิวโคไครอีน และไซโตไคน์ต่าง ๆ เช่น Tumor necrosis factors (TNFs) ทั้งหมดนี้พบว่าล้วนมีบทบทนำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โรคบางโรคที่มีการยืนยันอย่างกว้างขวางว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคและมีบทบาทสำคัญที่ทำให้โรคกำเริบมากขึ้น ได้แก่ โรคหัวใจและสมองขาดเลือด โรคความผิดปกติในระบบประสาทและโรคมะเร็ง โรคเบาหวาน (โอภา วัชระคุปต์. 2549)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือสารที่มีสมบัติยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ มีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ (Natural antioxidant) และสารสังเคราะห์ (Synthetic antioxidant) และมีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระที่ร่างกายได้รับ ได้แก่ ควันบุหรี่ แอลกฮอลล์ รังสี UV เอ็กซเรย์ ให้กลายเป็นสารที่ไม่ มีอันตรายต่อเซลล์ร่างกาย สามารถป้องกันหรือซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์ร่างกายจากออกซิเจนได้ (**อาหารต้านอนุมูลอิสระ.** 2555) สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) แคโรทีนอยด์ สารสกัดจากเมล็ดองุ่น ชาเขียว สารสกัดจากเปลือกสนฝรั่งเศส โคเอนไซม์คิวเท็น เนชันรัลเบต้าแคโรทีน ลูติน กรดอัลฟาไลโปอิค สารสกัดจากใบแปะก๊วย วิตามินซี วิตามินอี ซิลิเนียม

2.9 ดัชนีชี้วัดความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC)

จากการที่ร่างกายและเซลล์มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายชนิด จึงมีระบบควบคุมป้องกันไม่ให้มีอนุมูลอิสระเกินสมดุลที่จะทำให้เกิดอันตราย ระบบป้องกันอันตรายจากอนุมูลประกอบด้วย สารขจัดอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งมีทั้งสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น อัลบูมอน เฟอร์ริติน และสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น วิตามินซี และกรดยูริก เป็นต้น

และเอนไซม์ขจัดอนุมูลซึ่งมีอยู่หลายชนิด การใช้ดัชนีจากการหาปริมาณสารต้านออกซิเดชันเดี่ยว ๆ หรือการวัดปริมาณการเกิดสารชีวโมเลกุลที่ถูกอนุมูลอิสระทำให้เสียหายเป็นดัชนีวัดภาวะถูกออกซิไดส์เกินสมดุล ว่ามีระดับมากน้อยเพียงใดนั้น อาจไม่เป็นค่าที่สะท้อนถึงภาพรวมของภาวะออกซิเดชันของภาวะออกซิเดชัน ซึ่งเป็นการรวมองค์ประกอบทั้งหมดหรือภาวะรีด็อกซ์โดยรวม และใช้เป็นดัชนีชี้วัดภาวะออกซิเดชันของร่างกายโดยตรวจวัดจากเลือด พลาสมาและของเหลวที่ได้จากร่างกาย ในการวิเคราะห์มีหลักการสำคัญในการวิเคราะห์ คือ

ก. การวิเคราะห์การส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT) เช่น วิธี ORAC และวิธี TRAP

ข. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron transfer, ET หรือ SET) ได้แก่ วิธี FRAP และวิธี TEAC เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์โดยใช้หลักการ HAT จะวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในเลือดหรือพลาสมาในการขจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีการให้อะตอมไฮโดรเจน

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow XH + A^{\bullet}$$

วิธีการนี้จะหาพลังงานที่ทำให้พันธะของหมู่ที่จะให้อะตอมไฮโดรเจนแตกออก (Bond dissociation energy, BDE) สารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะมีค่า BDE ประมาณ -10 กิโลแคลอรี/โมล และมีค่าความต่างศักย์ของการแตกตัว (Ionization potential, IP) ต่ำกว่า -36 กิโลแคลอรี/โมล ในการหาดัชนี TAC เป็นการวัดความสามารถในการแข่งขันในเชิงจลศาสตร์ปฏิกิริยา HAT จะไม่ขึ้นกับตัวทำละลาย ค่าพีเอช แต่หากมีสารรีดิวซ์หรือโลหะอยู่ด้วยจะให้การวิเคราะห์โดยวิธี HAT จะไม่ขึ้นกับตัวทำละลายและค่าพีเอช แต่หากมีสารรีดิวซ์หรือโลหะอยู่ด้วยจะทำให้การวิเคราะห์ โดยวิธี HAT ซับซ้อนและส่งผลหาค่าที่วิเคราะห์ได้สูงกว่าความเป็นจริง วิเคราะห์โดยใช้หลักการ SET หรือ ET เป็นหารหาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่นได้แก่ โลหะ และอนุมูล สารต้านออกซิเดชันจะขจัดอนุมูลโดยกลไก HAT และ SET ซึ่งให้ผลผลิตที่เหมือนกันในขั้นสุดท้าย แม้ว่าจะมีกลไกทางจลนศาสตร์และเกิดสารข้างเคียงที่แตกต่างหันเมื่อรวมสมาการที่ (1)-(3) ในกลไก SET จะได้ผลเช่นเดียวกับสมการของกลไก HAT ดังแสดงข้างต้น

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow X^{-} + AH^{\bullet +} \qquad (1)$$

$$AH^{\bullet +} + H_2O \longrightarrow A^{\bullet} + H_3O^{+} \qquad (2)$$

$$X^{-} + H_3O \longrightarrow XH + H_2O \qquad (3)$$

ในการวิเคราะห์จะเกิดกลไกทั้งสอง คือ HAT และ ET ควบคู่กันไปเสมอ วิธี SET จะเปรียบเทียบความสามารถในการทำให้โปรตอนหลุดออกจากโมเลกุลและการแตกออกเป็นอิออน การที่ปฏิกิริยา SET เกิดลดลงเมื่อมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น แสดงถึงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่โปรตอนสารต้านออกซิเดชันที่เกิดกลไก SET จะมีค่า IP มากกว่า -45 กิโลแคลอรี/โมล ปฏิกิริยา ET จะช้าและเวลานานกว่าปฏิกิริยาจะสิ้นสุด ดังนั้นการคำนวณค่า TAC จะวิเคราะห์หาปริมาณลดลงเป็นร้อยละเท่าใดมากกว่าจะคำนวณหาค่าทางจลนศาสตร์ วิธี SET จะไวต่อวิตามินซีและกรดยูริก สารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวนวิธี SET ทำให้การวิเคราะห์มีความแปรปรวนสูง

วิธีการวิเคราะห์แบ่งเป็นวิธีการวัดโดยอ้อมและวิธีการวัดโดยตรง

วิธีวิเคราะห์หาค่า TAC โดยอ้อม วิธีวิเคราะห์จะทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นหาความสามารถของสารตัวอย่าง ได้แก่ เลือด พลาสมา ในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระที่ทำเกิดขึ้น ถือเป็นการวิเคราะห์โดยอ้อม ได้แก่ วิธี TRAP ORAC และ TEAC เริ่มด้วยการทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นและนำเลือดหรือพลาสมาเติมลงไปหลังจากนั้นจึงวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือ

ตารางที่ 2.1 วิธีวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน

การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน	**วิธีวิเคราะห์**
Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC)	วิธีโดยอ้อม HAT
Photochemiluminescence assay (PCL)	
TEACI ($ABTS^{\bullet+}$/ metmyoglobin)	วิธีโดยอ้อม SET
TEAC II ($ABTS^{\bullet+}$ โดย manganese dioxide MnO_2)	วิธีโดยอ้อม SET
TEAC II ($ABTS^{\bullet+}$ โดย potassium persulfate KO_8S_2)	วิธีโดยอ้อม SET
Diphenyl-l-picrylhydrazyly assay (DPPH)	SET
Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)	วิธีโดยอ้อม HAT
Ter ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)	วิธีโดยตรง SET

TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity assy, ABTS = 2,2(-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid radical,HAT = hydrogen atom transfer, SET = single electron transfer

วิธี TRAP วิธีนี้จะใช้สารประกอบกลุ่มเอโซ ABTS ABAP AAPH, 2,2'-azobis(2-amidopropane) ซึ่งสลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกซี ซึ่งหาปริมาณได้จากการที่อนุมูลอิสระที่

เกิดขึ้นไปทำปฏิกิกิริยาออกซิเดชันกับสาร ABTS กิดเป็นอนุมูลที่มีสี $ABTS^{\bullet+}$ มีค่า λ_{max} ที่ 660,734 และ 820 นาโนเมตร ซึ่งการวัดค่า TAC ทำโดยดูความสามารถของเลือดพลาสมา ในการต้านออกซิเดชันเมื่อนำเลือดไปผสมกับสารทดสอบ จะทำให้เกิดสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ช้าลง หรือเกิดสาร $ABTS^{\bullet+}$ น้อยลงทำให้มีสีจางซึ่งสามารถวัดหาปริมาณวัดหาปริมาณได้ การวิเคราะห์ทำได้ทั้งการวัดระยะเวลาในการเกิดสี $ABTS^{\bullet+}$ หลังจากเติมเลือดหรือพลาสมา หรือวัดปริมาณ $ABTS^{\bullet+}$ ที่เกิดขึ้นจากค่าดูดกลืนแสงในเวลาที่กำหนด วิธีการวัดโดยกำหนดเวลา ถึงแม้ว่าจะสะดวกและได้ค่าถูกต้องแม่นยำดี แต่เนื่องจากมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามามีบทบาททำให้ การแปลผลซับซ้อน เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดสีและอัตราการเกิดออกซิเดชัน ดังนั้นจึงมี การพัฒนาวิธีโดยการวัดพื้นที่ใต้เส้นกราฟ (AUC) ซึ่งจะให้ค่าที่ถูกต้อง แต่ยุ่งยากไม่สะดวกในการปฏิบัติและใช้เวลาในการวิเคราะห์

วิธี TRAP มีการพัฒนาต่อมาโดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากระตุ้นเมทไมโอโกลบินเกิดเป็นอนุมูลเฟอร์ริลไมโอโกลบิน อนุมูลเฟอร์ริลไมโอโกลบินไปทำปฏิกิริยากับ ABTZ เกิดเป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสี ดังนั้นเมื่อเติมเลือดหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปในสารผสมที่ใช้ทดสอบเลือดหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะยับยั้งปฏิกิริยาให้สีที่เกิดขึ้นลดลง วิธีการนี้อาจวัดค่าดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ λ_{max} เท่ากับ 734 นาโนเมตร วัดที่จุดเดียวในเวลาที่กำหนด หรือวัดอัตราความเร็วในการเกิด $ABTS^{\bullet+}$ โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงหลังจากการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือระบุเป็นค่าระยะเวลาที่ใช้ก่อนเกิดปฏิกิริยา (lag time) หรือค่าระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรร็อก

วิธี ORAC จัดเป็นวิธีการวิเคราะห์โดยอ้อมอีกวิธีหนึ่ง วิธี ORAC ใช้ออกซีไม่ให้ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยกลไก HAT การวิเคราะห์จะวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยอนุมูลเปอร์ออกซีให้ทำปฏิกิริยาเปลี่ยนสารที่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ไปเป็นสารที่ไม่ให้แสงฟลูเรสเซนซ์ ดังนั้นเมื่อเติมเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี จึงทำให้มีแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นตามปริมาณและความแรงของสารทดสอบที่เติมลงไป วิธีนี้จะใช้ β-phycoerythrin (β-PE) แทน $ABTS^{+}$ ซึ่ง β-PE มีสมบัติให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 565 นาโนเมตร เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงหรือรังสีที่มีความยาวคลื่นเท่ากับ 540 นาโนเมตร β-PE จะถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ ทำให้สมบัติในการให้แสงฟลูออเรสเซนซ์เสียไป ดังนั้นเมื่อผสมสารเอโซ AAPH ซึ่งจะสลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกซี (สมการที่ 1) อนุมูลเปอร์ออกซีจะทำให้เกิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ β-PE ลดลง (สมการที่ 2) ดังนั้นการเติมซีรั่มหรือสารต้านออกซิเดชันลงไปในสารละลายทดสอบจะยับยั้งการสูญเสียแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ β-PE (สมการ 3 และ 4)

$R{=}N{=}N{-}R \xrightarrow{\hspace{2cm}} N_2 + 2\ ROOR^{\bullet}$ (1)
(AAPH)

$ROO^{\bullet} + \beta$-PE หรือ FL $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ ROOH + oxidized-β-PE หรือ FL (2)
แสงฟลูออเรสเซนซ์ ไม่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์

$ROO^{\bullet} + AH \xrightarrow{\hspace{2cm}} ROOH + A^{\bullet}$ กลไก HAT (3)
สารต้านอนุมูลอิสระ

$ROO^{\bullet} + A^{\bullet} \xrightarrow{\hspace{2cm}} ROOA$ (4)

โปรตีน β-PE เป็นสารที่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ในระยะแรก ซึ่งต่อมา β-PE ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจาก β-PE มีความแปรปรวนสูงในการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ และแสงฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงเมื่อถูกแสง นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มโพลีฟีนอลโดยเฉพาะโปรแอนโทไซยานิดินจะจับกับโปรตีน β-PE ทำให้ได้ค่า ORAC ต่ำกว่าความเป็นจริง ปัจจุบันนิยมใช้ฟลูออเรสซีน (Fluorescein,FL) หรือไดคลอโรฟลูออเรสซีน (H_2DCF-dA) ซึ่งมีความคงตัวและไม่ไวต่อปฏิกิริยาจนเกินไป ในการวิเคราะห์จะดูผลการเกิดปฏิกิริยาเป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อให้ได้ค่า ORAC ที่ถูกต้องสมบูรณ์จะวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟ AUC ของการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อเติมเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในสารละลายทดสอบจะทำให้การลดลงของแสงเกิดช้ากว่าและลดลงน้อยกว่า

เพื่อลดความแปรปรวนจากสารเคมี จากเครื่องมือ และจากผู้วิเคราะห์ ค่า ORAC จะคำนวณเป็นค่าที่สมมูลกับสารมาตรฐานโทรร็อก หรือ Trolox exquivalent (TE) มีหน่วยเป็นไมโครโมลเทียบเท่าโทรร็อกต่อสารตัวอย่าง 1 ลิตร หรือ 1 กรัม (μM ของ TE/L ของ μM ของ TE/g)

ข้อจำกัดของวิธี ORAC คือเป็นวิธีที่วัดเฉพาะความสามารถในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดจากอนุมูลเปอร์ออกซีที่ละลายน้ำเท่านั้น ไม่ได้วัดความสามารถรวมในการต้านอนุมูลชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลในลิพิดซึ่งมีความสำคัญในการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน จึงมีการพัฒนาเปลี่ยนตัวทำละลายในการวิเคราะห์เป็นสารละลายของอนุพันธ์ไซโคลเด็กซ์ตริน (7% RMCD ในสารละลายอะซิโตน 50%) วิธี ORAC ได้พัฒนาโดยการใช้แผ่น Microplate ชนิด 48 หลุม หรือ 96 หลุม โดยแผ่นทดสอบ 48 หลุม จะมีความแปรปรวนต่ำกว่า 96 หลุม ทำให้การวิเคราะห์ทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณสารทดสอบน้อยลง

วิธี FRAP วิธีนี้เป็นวิธีวิเคราะห์หาค่า TAC โดยตรง มีหลักการว่าสารต้านออกซิเดชันในร่างกายทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอนจึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า TAC เป็นความสามารถรวมในการรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยเลือด ซึ่งประกอบด้วยสารต้านออกซิเดชันหลายชนิด ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัล Fe^{3+}-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

วิธี FRAP จะวัดความต่างศักย์ของการรีดอกซ์ที่มีค่าต่ำกว่า 0.7 โวลท์ ซึ่งเป็นค่าความต่างศักย์ของสมการรีดอกซ์ของ Fe^{3+}-TPTZ ดังนั้น วิธี FRAP สามารถใช้วัดภาวะรีด็อกซ์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ แต่วิธี FRAP ไม่สามารถวัดสารต้านออกซิเดชันที่ขจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน (HAT) เช่น หมู่ไทออลในโปรตีน ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์เลือดหรือพลาสมา วิธี FRAP จึงให้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

เนื่องจากความต่างศักย์รีด็อกซ์ของ Fe(III)-TPTZ มีค่าใกล้เคียงกับค่าของ ABTS$^{\bullet+}$ ซึ่งใช้ในวิธีวิเคราะห์ TEAC ดังนั้นสารต้านออกซิเดชันจำพวกเดียวกันมีโครงสร้างที่คล้ายกันจะทำปฏิกิริยาได้ทั้งในวิธีวิเคราะห์ FRAP และวิธี TEAC แม้ว่าทั้งสองวิธีจะมีความแตกต่างกันในเรื่องของค่าพีเอช โดยวิธี TEAC จะวิเคราะห์โดยทำปฏิกิริยาในสภาวะเป็นกลาง ส่วนวิธี FRAP จะทำในสภาวะกรดมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.6 เพื่อให้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กละลายได้ เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดที่พีเอชต่ำหรือเป็นกรดจะลดค่าความต่างศักย์ในการแตกตัวเป็นไอออน ทำให้เร่งการส่งผ่านอิเล็กตรอนและเพิ่มค่าความต่างศักย์รีดอกซ์ ดังนั้นถึงแม้ว่าค่าที่ได้จากทั้งสองวิธี FRAP และ TEAC จะให้ค่าที่ไปในทิศทางเดียวกัน แต่ค่าที่ได้จากวิธี FRAP จะมีค่าต่ำกว่าวิธี TEAC เสมอ และค่าที่ได้จากวิธี FRAP ส่วนใหญ่จะไม่สัมพันธ์กับค่าที่หาโดยวิธีอื่นๆ

ถึงแม้ว่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กจะมีความสัมพันธ์ไม่มากนักกับการขจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน แต่การที่อนุมูลอิสระถูกออกซิไดซ์หรือถูกรีดิวซ์ให้เป็นไอออนเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังนั้นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยวิธี FRAP จึงแสดงถึงภาวะรีดอกซ์ของพลาสมาเนื่องจากวิธี FRAP จะเป็นการวิเคราะห์โดยใช้เฉพาะหลักการ SET เท่านั้น ดังนั้นสมควรนำผลการวิเคราะห์โดยวิธีอื่นๆ มาประกอบการประเมินผลด้วยเพื่อให้มีความถูกต้องดีขึ้น

ทั้งวิธี TEAC และวิธี FRAP เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ซึ่งเกิดอย่างรวดเร็วภายใน 4-6 นาที แต่ในการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันจากพืชจำพวกโพลีฟีนอลจะพบว่าค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จะเพิ่มขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังนั้นการวัดครั้งเดียวตามเวลาที่กำหนด จึงอาจไม่ใช้ค่าที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ วิธี FRAP มีข้อดีคือเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อยไม่แพงและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ แต่มีข้อเสียคือกลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เกี่ยวข้องกันกับกลไกในร่างกาย

วิธี TEAC แม้ว่าวิธี TEAC และวิธีวิเคราะห์อื่นๆ โดยการใช้ ABTS เป็นสารให้กำเนิดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ และวัดการขจัด $ABTS^{\bullet+}$ เปรียบเทียบกับโทรร็อกซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ละลายน้ำจะใช้ปฏิกิริยาที่จัดอยู่ในประเภท SET แต่สารบ่งชี้ที่ใช้ในวิธี TEAC สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้ง 2 แบบ โดยการเกิดรีดักชันโดยตรงด้วยกลไก SET และโดยการขจัดอนุมูลอิสระด้วยกลไก HAT วิธี TEAC เป็นการวัดความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีความคงตัว วิธีนี้ ABTS จะถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลเปอร์ออกซีเกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ และมีสี ดังนั้นเมื่อเติมเลือด พลาสมา หรือสารต้านอนุอิสระมูลลงไปจะทำให้มีสีลดลง ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สมมูลกับสารต้านอนุมูลมาตรฐานโทรร๊อก จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity วิธี TEAC มีการพัฒนาตามลำดับ โดยวิธี TEAC แรกเริ่มใช้เมทไมโอโกลบินกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากันเกิดเป็นอนุมูลอิสระ Ferrylmyo globin ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ ABTS ให้เป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสีที่มีค่า λ_{max} หลายค่า โดยค่า λ_{max} ที่ 415 นาโนเมตรและ 734 นาโนเมตร เป็นค่าความยาวคลื่นที่นิยมใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ในการวิเคราะห์จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ลดลงจากค่าควบคุมเมื่อไม่ได้เติมสารทดสอบหรือเลือด

นำค่าที่ลดลงมาทำการเปรียบเทียบกับค่าที่สารมาตรฐานโทรร็อก ในระยะแรกของการวิเคราะห์ จะใส่สารทดสอบหรือพลาสมาและสารอื่นๆ รวมกันก่อนแล้วจึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระโดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นขั้นสุดท้าย ซึ่งทำให้ได้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง หลังจากนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีโดยเปลี่ยนลำดับการเติมสารทดสอบโดยผสมสารหรือเลือดที่ต้องการวิเคราะห์เป็นขั้นตอนสุดท้ายภายหลังจากการทำให้เกิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ การพัฒนาต่อมาทำโดยนำสารอื่นไปทำให้เกิดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เช่น ใช้แมงกานีสไดออกไซด์ หรือโปตัสเซียมเปอร์ซัลเฟต ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ดีในลิพิด นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการทำให้เกิด $ABTS^{\bullet+}$ โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจาก Horseradish ซึ่งมีข้อดีคือ ใช้เวลาน้อยกว่าและเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้สภาวะรุนแรง เช่น อุณหภูมิสูงหรือใช้สารเคมีต่างๆ นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ทำให้สามารถศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ในค่าพีเอชในช่วงกว้าง แต่ต้องคำนึงไว้ว่าในภาวะกรดจะเพิ่มการเกิด Trolox exquivalent

ข้อดีของวิธี TEAC คือทำได้ง่าย อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระภายในเวลา 30 นาที ปกติจะใช้เวลาประมาณ 5 นาที การวิเคราะห์ทำได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง ทำให้สามารถศึกษากลไกได้โดยละเอียด อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ ใช้วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารที่ละลายน้ำหรือสารที่ละลายในลิพิด ส่วนข้อเสียของวิธี TEAC คือ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์หรือในร่างกายเช่นเดียวกับ Fe(III)-TPTZ

วิธี DPPH อนุมูล DPPH$^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำโดยใช้เครื่องมือ EPR (ESR) หรือใช้เครื่องสเปคโตรสโกปีวัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

ต่อมาได้มีการพัฒนามาใช้ DPPH$^{\bullet}$ ในการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เรียกว่า Antiradical Efficiency (AE) โดยคำนวณจากสมการ

$$\boxed{AE = 1/EC_{50}T_{EC50}}$$

EC_{50} = ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถลดปริมาณ DPPH$^{\bullet}$ เริ่มต้นลงได้ 50%

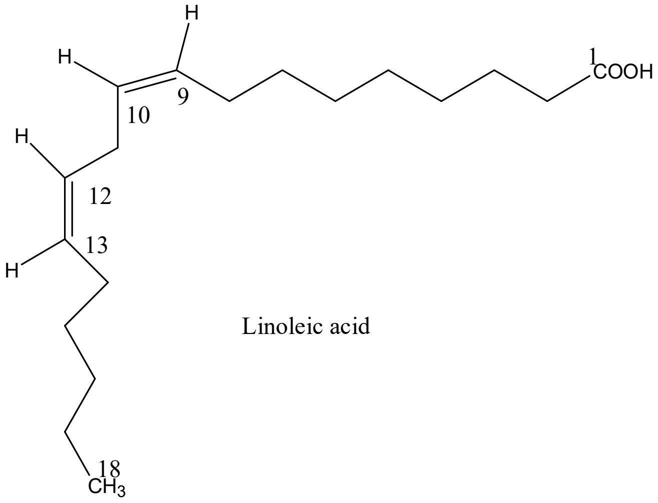
T_{EC50} = เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณอนุมูลอิสระให้ได้ EC_{50}

ข้อดีของวิธีนี้คือง่ายใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป จึงนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรตินอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้น วิธีนี้จึงไม่สามารถใช้จัดอันดับอนุมูลอิสระที่ความไวสูงได้ นอกจากนี้อิเล็กตรอนเดี่ยวของ DPPH$^{\bullet}$ จะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรในโครงสร้าง ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆ ที่สารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH$^{\bullet}$ จางลงได้อีกด้วย (โอภา วัชระคุปต์. 2550)

2.10 วิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ที่นิยมใช้กันทั่วไปมี 3 วิธี คือ 1) Antioxidant activity ซึ่งการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระของกรดลิโนลีอิค 2) Reducing power เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ 3) Scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการกำจัดสาร DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งโดยได้อธิบายรายละเอียดของแต่ละวิธีดังนี้

2.10.1 การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของกรดลิโนลีอิค (Antioxidant activity)



Linoleic acid

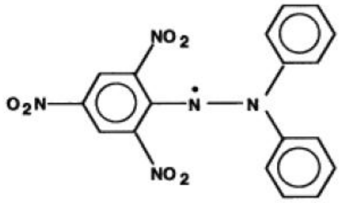
กรดลิโนลีอิคเป็นกรดไขมันชนิดหนึ่งที่มีพันธะคู่เป็นส่วนประกอบ ทำให้กรดนี้สามารถจับกับอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในระบบทำให้กลายเป็นอนุมูลอิสระ จากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศได้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็น Conjugated diene ที่เสถียร (Erikson,1987) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีพันธะคู่เป็นส่วนประกอบ ทำให้สารต้านนี้สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้ จึงสามารถลดการเกิดเป็นอนุมูลอิสระของกรดลีโนลีอิกได้ ด้วยเหตุนี้ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระของกรดลิโนลีอิค จึงวัดได้โดยการเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงในสารละลายที่มีกรดลิโนลีอิคผสมอยู่ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง จากนั้นใช้เครื่อง UV Spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ค่าที่ได้นี้แปรผันกับความเข้มข้นของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น ดังนั้น การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงจึงบ่งบอกได้ถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้

2.10.2 การวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Reducing power) สารที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ สามารถจ่ายอิเล็กตรอนให้กับอะตอมหรือโมเลกุลในตระกูลของโลหะที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ (เช่น เหล็ก ทองแดง เป็นต้น) (Halliwell and Gutteridge. 1984) เหล็กที่อยู่ในภาพเฟอร์ริคไอออน (Fe^{3+}) มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ ได้ดี ในด้านชีวเคมีอนุมูลอิสระที่พบมากที่สุดเป็นสารที่มีออกซิเจนและไวต่อปฏิกิริยา (ROS) ไอออนอิสระของเหล็กสามารถเป็นตัวเร่งการเกิด ROS เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูล ไฮดรอกซิล เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของแต่ละสารที่สกัดได้ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์ริคไอออนกับสารสกัดแต่ละชนิดมีค่าคงที่และค่าของการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากเครื่องมือวิเคราะห์สารโดยใช้หลักการทาง

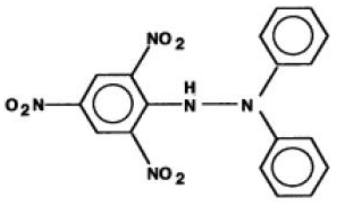
สเปคโตรสโคปี (UV Spectrophotometer) จะมีค่าแปรผันตามความเข้มข้นของเฟอร์รัสไอออนที่เกิดขึ้น ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจึงบ่งบอกได้ถึงความสามารถของการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์

2.10.3 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH [Scavenging effect on 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH)]

DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระและเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

ดังนั้น ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย (นิยมใช้ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระมาก เพราะใช้งานง่าย) โดยในการทดสอบนี้จะให้ DPPH (มีสีม่วงเข้ม) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิจัยทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีนักวิทยาศาสตร์มากมายหลายกลุ่มได้สกัด สังเคราะห์เพื่อเพิ่มฤทธิ์และนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นยารักษาโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืช รวมทั้งใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ในที่นี้จะให้รายละเอียดเกี่ยวกับการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์บางท่านดังนี้

Lopez, Lidia M. *et al.* (2002 : 237) ได้แสดงให้เห็นถึงสมบัติทางชีวภาพของ lipophilic *O*-napthoquinone ซึ่งเป็น quinine ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมีฤทธิ์เป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น Antibacterial, Antifungal, Trypanocidal และ Cytotoxic effects โดยสมาชิกที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือ β-lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho

[1,2b] pyran-5,6-dione) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ดี เช่น Yoshida and walker sarcoma, epidermoid laryngeal carcinoma, melanoma, promyelocytic-leukemia, prostate, breast, ovary, colon, hepatoma และ lung cancer cells อีกด้วย

Azmi, A.S. *et al.* (2005 : 3131) ได้แสดงให้เห็นว่า Resveratrol (3,4',5-trihydroxy stilbene) ซึ่งเป็นสารพวก Polyphenol ที่ได้จากพืชต่างๆ เช่น ใบหม่อน (Mulberries) และ องุ่น (Grapes) มีสมบัติทาง Chemopreventive properties, Anti-inflammatory, Anti-platelet, Anti-mutagenic effects และยังมีสมบัติเป็น Aagonist สำหรับ Estrogen receptor นอกจากนี้ยังป้องกันโรคหัวใจ (Cardiovascular protective properties) และป้องกันพืชไม่ให้เกิดโรคจากเชื้อรา ขัดขวาง DNA polymerase และ Ribonucleotide reductase, ยับยั้ง LDL oxidation ต่อต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ระยะคือ Tumor initiator, Promotion และ Progression ดังนั้น Resveratrol สามารถชักนำให้เกิด Apoptosis ในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้ นักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ยังได้ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่ม Polyphenol ที่ได้จากพืช เช่น Flavonoids, Tannins และ Curcumins พบว่าสามารถชักนำให้เกิด Oxidative DNA damage แม้ว่าจะใช้เพียงลำพัง หรือในรูป Metal compounds เช่น Cu(II) สมบัติหลายประการของสารเหล่านี้ เช่น เกาะกับ DNA และการทำลาย (Degradation) คล้ายคลึงกับสารต้านมะเร็งอื่นๆ เช่น Bleomycin, Adriamycin และ 4'-(9-Acridinylamino) methanesulphone-m-anisidine (mAMSA) โดย Polyphenolic resveratrol สามารถทำให้สาย DNA แตกเมื่อมี Cu ไอออนอยู่ด้วย

DiSilvestra, R.A. *et al.* (2005 : 251) ศึกษาผลการต้านอนุมูลอิสระของ Soy isoflavone อาจจะช่วยป้องกันการกลับซ้ำของมะเร็งเต้านมได้ แต่ Isoflavone ที่ออกฤทธิ์คล้าย Estrogen อาจจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม การออกฤทธิ์เช่นนี้ของ isoflavone เป็นผลมาจากเอนไซม์ 2 ชนิดที่มี Copper อยู่คือ Superoxide dismutase 1 (SOD 1; ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระจึงป้องกันโรคมะเร็งเต้านมได้) และ Ceruloplasmin (เพิ่มการผลิต estrogen เมื่อมีมากจึงเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม) จากการศึกษาทางระบาดวิทยาของสตรีเอเชียถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดมะเร็งเต้านมและอาหารที่มีถั่ว พบว่าผู้หญิงเซี่ยงไฮ้ที่มี Isoflavone จากปัสสาวะในปริมาณน้อยในสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสตรีที่บริโภคถั่วปริมาณน้อยมีโอกาสเกิดโรคมะเร็ง

Al-Haiza, M.A. *et al.* (2003 : 275) ใช้ Coumarins เป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่สำคัญในการใช้ประโยชน์ เช่น ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Bactericides), ฆ่าเชื้อรา (Fungicides), ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory), Anticoagulant และ Anticancer agents สมบัติทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ทำให้นักวิจัยสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ๆ ที่มีมากยิ่งขึ้นไปอีก โดยมีลักษณะที่แตกต่างกันที่วง Heterocyclic ที่เชื่อมต่ออยู่กับ Coumarin (Coumarin moiety)

Kostova, Irena *et al.* (2005 : 542) ทำการสังเคราะห์สารประกอบของ Lanthanum (III) กับ Bis-coumarins ศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ด้วยเทคนิค EA, IR, ^{1}H-และ ^{13}C-NMR และ Mass-spectral data ตามลำดับ โดยสเปกตรัมของสารประกอบเหล่านี้เทียบกับลิแกนด์อิสระ พบว่า La(III) ทำปฏิกิริยากับลิแกนด์ที่ตำแหน่ง Deprotonated hydroxyl ทั้ง 2 หมู่ สำหรับ Cytotoxicity ใช้เทคนิค MTT assay กับ HL-60, BV-173 และ SKW-3 cell lines ผลที่ได้คาดว่าสารประกอบเหล่านี้เป็นตัวทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Trigger programmed cell death หรือ Apoptosis)

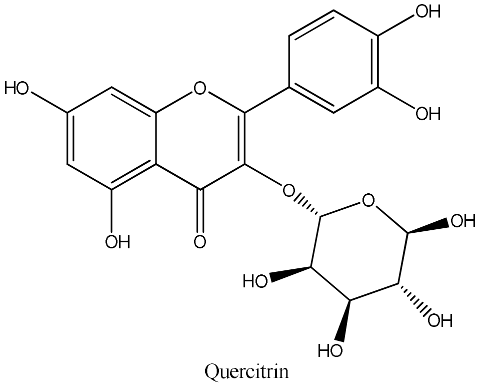
Lewis, A. *et al.* (2004 : 4550) ได้ศึกษาอนุพันธ์ของคูมาริน (Coumarin) dicumarol (3,3'-Methylene bis[4-hydroxycoumarin] เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก Sweet clover (*Melilotus alba*) ใช้เป็นยา Anticoagulant นอกจากนี้สารคูมาริน และอนุพันธ์ยังใช้เป็นยาต้านมะเร็ง โดยเฉพาะต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะ Malignant cell lines (*in vitro)* นอกจากนี้ยังได้ทดสอบทางคลินิก (Clinical trials) พบว่า สามารถออกฤทธิ์ต้าน Prostate cancer, Malignant melanoma และ Metastatic renal cell carcinoma ได้ด้วย

Leonard *et al.* (2011 : 391-396) ได้สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยตัวรีดิวส์จากสารสกัดของโสมเกาหลี (Ginseng) เทียบกับ $NaBH_4$พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน โดยถ้าใช้ตัวรีดิวส์ที่แรง เช่น $NaBH_4$ จะได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าการใช้สาร Ginseng นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคทองคำที่ได้จากการีดิวส์ด้วย Ginseng มีความเสถียรสูง ค่า Plasmon resonance band ยังปรากฏที่ 535 nm และไม่ตกตะกอน

Das, Manash R. *et al.* (2011 : 16-22) ได้สังเคราะห์เงินนาโนในสารละลายที่มีแผ่นแกรฟีนออกไซด์ และศึกษาการต้านแบคทีเรีย ผลพบว่า ขนาดและรูปร่างของอนุภาคเงินนาโนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย $AgNO_3$ ส่วนการต้านแบคทีเรีย พบว่าอนุภาคเงินนาโนต้านแบคทีเรีย *E.coli* และ *P.aeruginosa* ทั้งในอาหาร Broth และ Agar plate

Mu,Bin *et al.* (2011 : 385-390) ได้สังเคราะห์ Polyelectrolyte multilayer microcapsules ระหว่างไคโตซานกับออกซิไดส์ โซเดียมแอลกิเนต (OSA) พบว่าแคบซูลที่ได้มีความเสถียรที่ pH ต่ำ แต่เมื่อ pH สูง โครงสร้างนี้ก็จะถูกทำลายไป

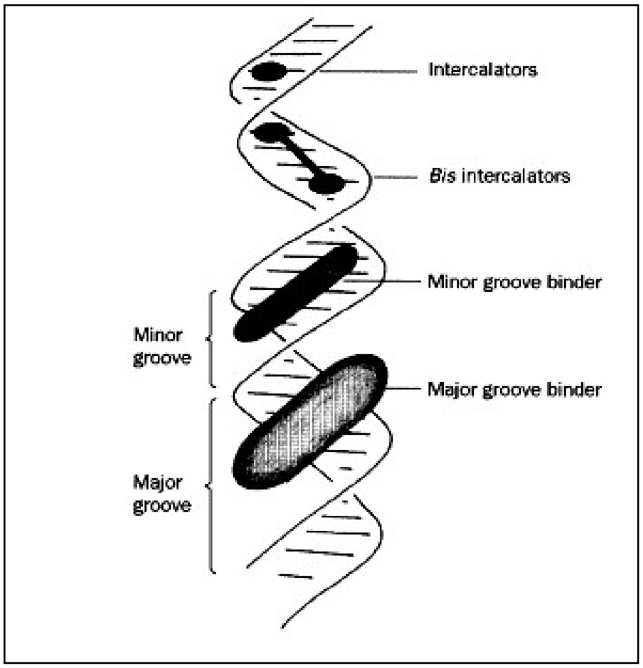
Kumari, Avnesh *et al.* (2011 : 224-232) ได้ศึกษาสมบัติของเคอร์ซิทริน (Quercitrin) ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ โดยการบรรจุลงในแคบซูลระดับนาโน (Nanoencapsulation)



Quercitrin

ผลพบว่า สมบัติต่างๆ ของสารดังกล่าวนี้ดีขึ้น เช่น การต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการละลาย (Solubility) การซึมผ่าน (Permeability) และความเสถียร (Stability)

Hi et al. (2011) ได้แสดงให้เห็นว่า ZnO nanoparticles ที่มีขนาดอนุภาค 70 ± 15 nm สามารถต้านเชื้อราที่เกิดกับผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว 2 ชนิด คือ *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expasum* ได้ดี และนอกจากนี้ยังพบว่า ZnO nanoparticles มีสมบัติในการออกฤทธิ์เป็น Concentration dependence (คือความเข้มข้นเพิ่มขึ้นฤทธิ์การต้านเชื้อราเพิ่มขึ้น) อีกด้วย


Intercalators
Bis intercalators
Minor groove binder
Minor groove
Major groove binder
Major groove

ภาพที่ 2.7 Mode of DNA acting drugs

จากข้อมูลข้างต้นนี้จะเห็นว่าผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างกว้างขวาง ทั้งการต้านมะเร็ง ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อราที่ก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืช และที่สำคัญคือ เมื่อขนาดของอนุภาคแตกต่างกัน แม้ว่าจะเป็นสารชนิดเดียวกันก็ออกฤทธิ์แตกต่างกัน ซึ่งตำแหน่งการออกฤทธิ์เมื่อขนาดอนุภาคมีขนาดต่างกัน แสดงในภาพที่ 2.7 จากเหตุผลดังกล่าวทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่นำสารที่ได้จากผลผลิตทางธรรมชาติ ได้แก่ Natural aldehyde มาเพิ่มฤทธิ์ โดยเทคนิค Double pharmacophore ในสภาวะ Mild condition ในระดับนาโนเมตร แล้วทดสอบสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (Physicochemical properties) และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) ในการต้านเพลี้ยกระโดดที่เป็นศัตรูของข้าวที่ระบาดหนักอยู่ในขณะนี้ผลที่ได้โครงการวิจัยนี้จะแก้ปัญหาให้เกษตรกรได้เป็นอย่างดี

บทที่ 3

สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

3.1.1.1 Brain heart infusion gar, Himedia Laboratories, India.
3.1.1.2 Potato dextrose agar, Himedia Laboratories, India.
3.1.1.3 Plate count agar, Himedia Laboratories, India.
3.1.1.4 Nutrient Agar, Himedia Laboratories, India.
3.1.1.5 Soil Extract Agar, Himedia Laboratories, India.
3.1.1.6 Agar powder, Himedia Laboratories, India.
3.1.1.7 Ammonium sulphate, iron (II) sulfate-6-hydrate, Merck, Germany.
3.1.1.8 L-Asparagine anhydrous, AR grade, Fluka Biochemica, Switzerland.
3.1.1.9 Magnesium sulfate heptahydrate, Fluka Biochemica, Switzerland.
3.1.1.10 Potassium dihydrogen phosphate, Fluka Chemica, Switzerland.
3.1.1.11 Potassium iodide, Ajax Chemicals, Australia.
3.1.1.12 Sucrose, Merck, Germany.
3.1.1.13 Sodium carbonate, Merck, Germany.
3.1.1.14 Sodium nitrite, Riedel-deHaen, Germany.
3.1.1.15 Sodium molybdate, Merck, Germany.
3.1.1.16 Sodium arsenite, Carlo Erba, France.
3.1.1.17 N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, Serva Fein Bio Chemica GmbH and Co.KG, Germany.
3.1.1.18 Sodium hydroxide, Ajax Chemicals, Australia.
3.1.1.19 Sodium carbonate, Merck, Germany.
3.1.1.20 Sodium acetate, Carlo Erba, USA.
3.1.1.21 N,N-Dimethylformamide, Ajax Finechem, New Zealand.
3.1.1.22 Methanol, BDH Laboratory Supplies Pools, England.
3.1.1.23 Dimethyl sulphoxide, Sigma-Aldrich Laborchemikakien GmbH, Germany.
3.1.1.24 Potassium chloride, Ajax Finechem, New Zealand.
3.1.1.25 Chrom azurol S, Aldrich, Germany.

3.1.1.26 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Fluka Chemica, Switzerland.
3.1.1.27 Pyridine, Merck, Germany.
3.1.1.28 Silica gel for TLC (Al plate), Merck, Germany.
3.1.1.29 Silica gel for column, Merck, Germany.
3.1.1.30 Ferrous chloride tetrahydrate, Fluka, Germany.
3.1.1.31 Ferric chloride anhydrous, Fluka Chemica, Germany.
3.1.1.32 Crystal violet, QRëC, New Zealand.
3.1.1.33 สารละลายไอโอดีน
3.1.1.34 Ethyl alcohol, Carlo Erba, France.
3.1.1.35 Safranin, Gammaco, Thailand.
3.1.1.36 Sulfuric acid, Mallinckrodt, USA.
3.1.1.37 Sulphanilamide, BDH Laboratory Supplies Pools, England.
3.1.1.38 Iodine, Merck, Germany.
3.1.1.39 Hydrochloric acid, Carlo Erba, USA.
3.1.1.40 Di-sodium hydrogenphosphate dihydrate, Fluka Garantie, Switzerland.
3.1.1.41 Citric acid, Ajax Chemicals, Australia.
3.1.1.42 Acetic acid, Carlo Erba, USA.
3.1.1.43 Amberite XAD-4 resin, Sigma Chemical Co., USA.
3.1.1.44 1,10-Phenanthroline, Merck, Germany.
3.1.1.45 น้ำกลั่น
3.1.1.46 Syringaldehyde,
3.1.1.47 Silver nitrate,
3.1.1.48 Copper (II) chloride dihydrate,
3.1.1.49 Izoniazid,
3.1.1.50 Thiosemicarbazide,
3.1.1.51 Semicarbazide,

3.1.2 อุปกรณ์

3.1.2.1 Rotary evaporator, Buchi Rotovapor R-124
3.1.2.2 UV spectrophotometer, Parmacia Biotech
3.1.2.3 Autoclave. Hirayama, Scientific promotion Co.,LTD.
3.1.2.4 Lamina air flow, Jafelab
3.1.2.5 Hot air oven. Memmert,Scientific promotion Co., LTD.

3.1.2.6 Biological Incubator, Hotpack, Philadelphia, USA.
3.1.2.7 Boekel Scientific Dricycler, Philadelphia, USA.
3.1.2.8 UV lamp, Gamag, Switzerland.
3.1.2.9 Hotplate & stirrer, Jenway Ltd., Essex, United Kingdom.
3.1.2.10 Volumetric Flask, Herka intercolor, Germany.
3.1.2.11 Beaker ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 mL, Pyrex, Germany.
3.1.2.12 Pipetman, Gilson Medical Electronics, France.
3.1.2.13 Spectronic 20 genesis, Spectronic Instruments, USA.
3.1.2.14 Crest Ultrasonic Cleaner, ETL Testing Laboratories Inc., NJ. USA.
3.1.2.15 Microscope, Nikon, Japan.
3.1.2.16 Test tube screw cap, Pyrex, Germany.
3.1.2.17 Plate for bacterium growth, Pyrex, Germany.
3.1.2.18 Graduated Cylinder, Pyrex, Germany.
3.1.2.19 ขวดสีชา
3.1.2.20 ช้อนตักสาร
3.1.2.21 Micro Test Tubes with caps, Pyrex, Germany.
3.1.2.22 Microhaematocrit tubes, Herlev, Denmark.
3.1.2.23 Magnet Retriever, PTFE Labware.
3.1.2.24 Erlenmeyer flask 2000 and 3000 ml, Pyrex, Germany.

3.2 วิธีการสังคราะห์สารตัวอย่าง

3.2.1 วิธีการสังเคราะห์ลิแกนด์

3.2.1.1 ชั่ง Syringaldehyde (1 mol) ใส่ลงในขวดก้นกลมละลายด้วย Methanol

3.2.1.2 เติมตัวเข้าทำปฏิกิริยา เช่น Semicarbazide (1 mol) ลงในขวดก้นกลมที่มี Syringaldehyde นำไปกวนด้วยเครื่องพร้อมให้ความร้อน (40 ^{0}C) เพื่อให้สารทั้ง 2 ชนิดละลายเข้าทำปฏิกิริยากัน

3.2.1.3 ทดสอบความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาโดยแผ่น TLC โดยดีเวลลอป (Develop) ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม สังเกตผลภายใต้แสง UV

3.2.1.4 ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในเวลา 2 วัน

3.2.1.5 กรองและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2. วิธีการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน

สารประกอบเชิงซ้อนทุกตัวสังเคราะห์ด้วยวิธีที่คล้ายคลึงกันคือ

นำสาร Schiff base ligands มาทำปฏิกิริยาคอนจูเกตชันกับ Ag^+ และ Cu^{2+} ในเมทานอล (Methanolic solvent) ด้วยอัตราส่วนโดยโมล 1:1 ปรับความเป็นกรด-เบสของสารละลายให้ได้ pH ~6 กวนสารละลายอย่างต่อเนื่อง ณ อุณหภูมิ 40-60 ^{0}C ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

3.3 การศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารตัวอย่าง (Physico-chemical properties)

3.3.1 การวัดสมบัติการละลายในตัวทำละลายต่างๆ เช่น เมทานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ไดเมทิลฟอร์มาไมด์

3.3.2 การสังเกตลักษณะผลึก สี และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของผลผลิต (% yield)

3.4 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง

3.4.1 การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

3.4.1.1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยการชั่งสาร 0.0050 g ใส่ขวดวัดปริมาตร 50 ml ละลายด้วย Methyl alcohol จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 ml

3.4.1.2 เตรียมขวดวัดปริมาตร 10 ml จำนวน 7 ขวด เตรียมเป็นความเข้มข้น 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm ตามลำดับ และเตรียมขวดสีชา จำนวน 22 ใบ

1) ขวดสีขา 21 ขวด จะมีสารที่ใช้ทำการศึกษา ส่วนอีก 1 ใบ เป็นขวด control ซึ่งจะมี methyl alcohol (MeOH) 1 ml และ DPPH 2 ml

2) ในแต่ละความเข้มข้นจะต้องมีขวดสีชา 3 ใบ เช่น ถ้าความเข้มข้น 5 ml จะต้องมีขวด 3 ขวด ยกเว้นขวด control มีเพียงขวดเดียว

3.4.1.3 นำขวดสีชา ทั้ง 22 ใบ ไปอบไว้ที่อุณหภูมิ 100 ^{0}C รอให้ขวดเย็น

3.4.1.4 ปิเปตสารละลายตัวอย่างใส่ขวดวัดปริมาตร 10 ml ทั้งหมด 7 ขวด ความเข้มข้นตามลำดับ (ถ้าความเข้มข้น 80 ppm ให้ปิเปต 8 ml แล้วเติม methyl alcohol (MeOH) อีก 2 ml เพื่อปรับปริมาตรเป็น 10 ml)

3.4.1.5 ชั่ง DPPH 0.0040 g ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 50 ml ละลายด้วย methey alcohol จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 ml

3.4.2 วิธีการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดย วิธี DPPH assay

3.4.2.1 ปิเปต 1 ml ของสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น ใส่ในขวด 3 ใบ เพื่อทำการทดสอบ 3 ครั้ง

3.4.2.2. ปิเปต Methanolic DPPH radical 2 ml ใส่ขวดสีชาในแต่ละความเข้มข้น

3.4.2.3. เขย่าให้สารเข้าด้วยกัน นำขวดทั้ง 22 ใบ ไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เวลา 30 นาที

3.4.2.4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง Spectronic 20 GENESYS ที่ความยาวคลื่น 517 nm ปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.000 โดยวัดจากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง

3.4.2.5. คำนวณหาค่า % Radical scavenging

3.4.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) ทำได้ดังนี้

3.4.3.1 Acetate buffer (300 ml, pH 3.6) โดยชั่ง 3.1 g ของ Sodium acetate, glacial acetate acid 16 ml ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 L ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

3.4.3.2 Dilute HCl เป็น 40 mM โดยปิเปต 1.46 ml ของน้ำกลั่นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.3.3 Ferric chloride มา 0.051 g ละลายโดยน้ำกลั่น 10 ml

3.4.3.4 TPTZ (2, 4, 6 – tri [2 – pyridyl] – s – triazin) 10 ml, 0.031 g ละลายใน HCl 40 mM จากนั้นละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C (เตรียมใหม่ทุกครั้งเวลาใช้)

3.4.3.5 การเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยการนำสารละลาย acetate buffer, Ferric chloride และ TPTZ ในปริมาตร 100 ml, 10 ml , 10 ml ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C

3.4.4 วิธีการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

3.4.4.1 ปิเปตสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายมาตราฐาน ปริมาตร 150 µl ใส่ในขวดสีชาที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้น แล้วเตรียมสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เวลา 6 นาที

3.4.4.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

3.4.4.3 นำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Iron(II)sulfate solution กับค่าการดูดกลืนแสง

3.4.5 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Ferrous sulfate

เตรียมสารละลาย Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้น 1 mM โดยชั่ง $FeSO_4 .7H_2O$ 0.0279 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 ml จากนั้นทำการเจือจางสารละลาย (Dilution) เป็นความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ดังตาราง

ตารางที่ 3.1 แสดงการเจือจางสารละลายในการทำกราฟมาตรฐาน

Standard concentration (μM)	**Ferrous sulphate (ml)**	**Distilled Water (ml)**
100	1	9
200	2	8
400	4	6
600	6	4
800	8	2
1000	10	0

นำสารละลาย Ferrous (II) sulphate ในแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเทียบความเข้มข้น

3.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

3.5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมอาหารเพื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยใช้อาหารสำเร็จรูป Brain Heart Infusion agar สามารถเตรียมได้โดยการชั่งอาหารสำเร็จรูป 25 g ละลายในน้ำกลั่น 500 mL แล้วนำไปต้มจนอาหารละลายหมด จากนั้นเทอาหารลงในขวดรูปชมพู่แล้วทำการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 º C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำอาหามาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ต้องทำในเครื่อง Lamina air flow เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อที่อยู่ในอากาศ)

3.5.2 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อนำไปทดสอบความสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ในการทดสอบความสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยนำสารตัวอย่างแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นความเข้มข้น 2,000, 1,000 และ 500 ppm โดยชั่งสารตัวอย่างมา 20 mg แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm ปิเปตออกมา 5 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตร จะได้สารที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm จากนั้นปิเปตออกมา 5 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 500 ppm

3.5.3 วิธีการทดสอบความสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

3.5.3.1 นำอาหาร Brain Heart Infusion agar ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.6.1 ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อแบคทีเรีย 1 loop แตะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อให้เต็มจาน

3.5.3.2 นำ Paper disc ที่จุ่มสารตัวอย่างแต่ละชนิดมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อ

3.5.3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัด Clear Zone

3.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านเพลี้ยกระโดดและหนอนกอ

นำสารตัวอย่างมาเตรียมความเข้มข้นต่างๆ เช่น 100, 80, 60, 40 และ 20 ppm ตามลำดับ แล้วนำไปพ่นใส่เพลี้ยที่เก็บไว้ในกล่อง ซึ่งป้องกันการแพร่กระจายของเพลี้ยไปยังท้องถิ่นอื่นๆ

บทที่ 4

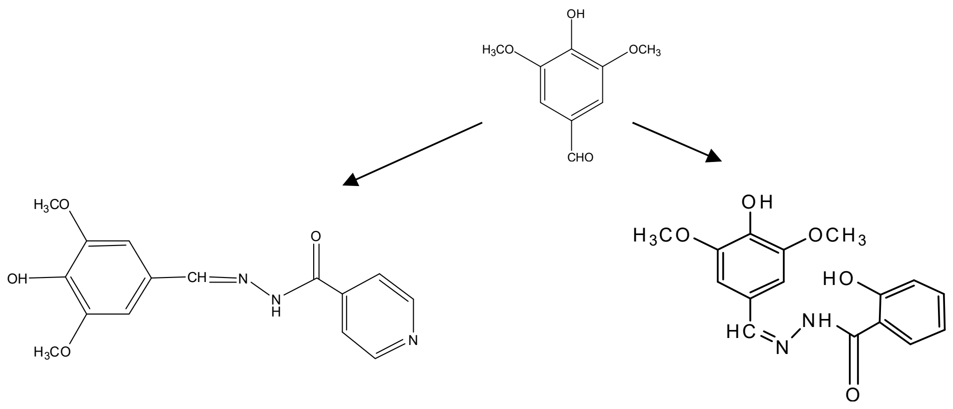
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 บทนำ

ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้เก็บรวบรวมข้อมูลที่สำคัญในด้านต่าง ๆ จากการทดลองดังนี้

4.1.1 ผลการสังเคราะห์สารตัวอย่าง
4.1.2 ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์
4.1.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารแต่ละชนิด
4.1.4 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH
4.1.5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP
4.1.6 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย
4.1.7 ผลการศึกษาความสามารถในการฆ่าหนอนกอ

4.2 ผลการสังเคราะห์สารตัวอย่าง


OH
H3CO
OCH3
CHO
H3CO
OH
CH=N
N H
O
N
H3CO
OH
H3CO
OCH3
HO
HC
N
NH
O

ภาพที่ 4.1 โครงสร้างการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Syringaldehyde

4.3 ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์

สมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ที่สำคัญของสารประกอบ ทั้งที่อยู่ในสภาพเป็นลิแกนด์ ได้แก่ syringaldehyde-salicylic hydrazone ; **L1**, Syringaldehyde-isonicotinic hydrazone ; **L2**, และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างลิแกนด์เหล่านี้กับ Cu และ Ag ได้แก่ **C1**, **C2**, **C3** และ **C4** สารประกอบที่สังเคราะห์ได้จะมีสี สูตรโมเลกุล จุดหลอมเหลว เปอร์เซ็นต์ของธาตุองค์ประกอบ และเปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์แตกต่างกัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

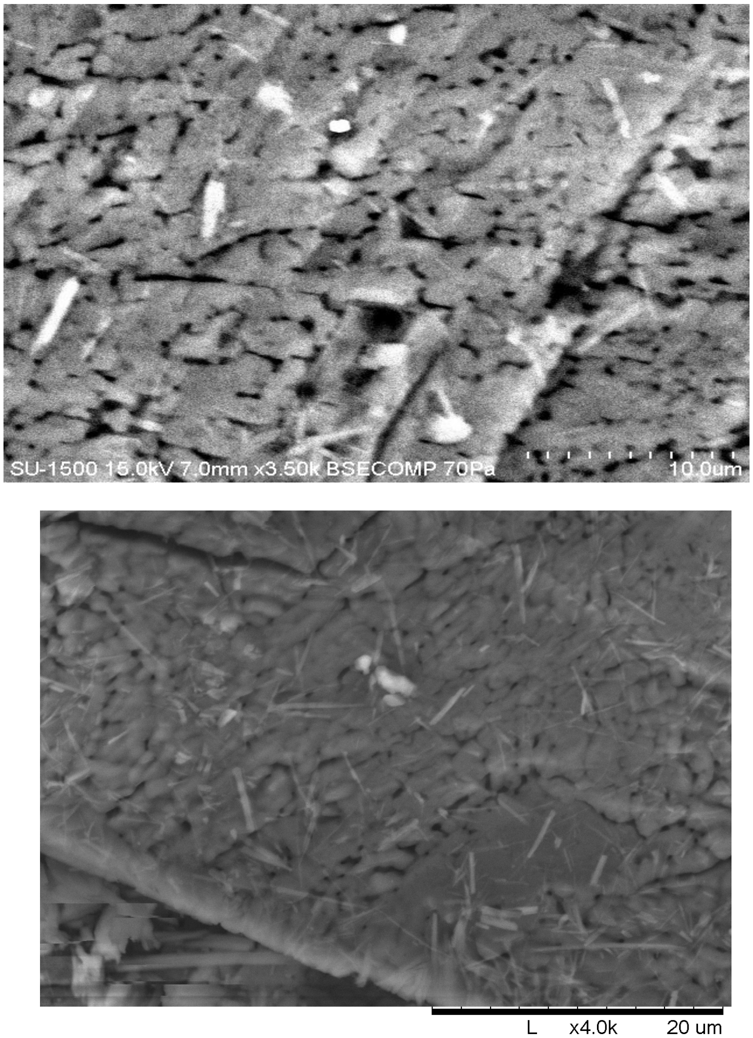
ตารางที่ 4.1 สมบัติทางกายภาพของสารที่สังเคราะห์ได้

ชื่อสามัญ (Trivial name)	รหัส	สูตรโมเลกุล	จุดหลอมเหลว (^{0}C)	สีของสารตัวอย่าง	ตัวทำละลาย
1. SRA-SAL	L1	$C_{16}H_{16}N_2O_5$	234.6	สีเหลืองใส	MeOH,EtOH ,DMSO,DMF
2. SRA-INH	L2	$C_{15}H_{15}N_3O_4$	229.2	สีเหลืองอ่อน	MeOH,EtOH ,DMSO,DMF
3. SRA-SAL-Cu	C1	$[C_{16}H_{16}N_2O_5CuCl_2(H_2O)]$	288.9	สีเขียวอ่อน	MeOH,EtOH ,DMSO,DMF
4. SRA-SAL-Ag	C2	$[C_{16}H_{16}N_2O_5AgNO_3(H_2O)]$	227.2	สีน้ำตาลเข้ม	MeOH,EtOH ,DMSO,DMF
5.SRA- INH-Cu	C3	$[C_{15}H_{15}N_3O_4CuCl_2(H_2O)]$	195.7	สีเขียว	MeOH,EtOH ,DMSO,DMF
6. SRA-INH-Ag	C4	$[C_{15}H_{15}N_3O_4AgNO_3(H_2O)]$	213.3	สีเหลืองใส	MeOH,EtOH ,DMSO,DMF

สารที่ได้จากการสังเคราะห์ทุกตัวเป็นสารประกอบที่มีขั้ว แต่สภาพขั้วจะมีมากในสารประกอบพวกลิแกนด์ (L1, L2) เมื่อนำลิแกนด์เหล่านี้ไปทำปฏิกิริยากับโลหะทองแดงและเงินจะได้สารประกอบเชิงซ้อน (C1-C4) ที่มีสภาพขั้วลดลงเนื่องจากความเป็นประจุลดลง ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเกิดภาวะ Neutralized ของลิแกนด์ที่มีประจุลบกับไอออนของโลหะทองแดงและเงินที่มีประจุบวกนั่นเอง

ตารางที่ 4.2 มวลโมเลกุล และ Elemental analysis ของสารที่ได้จากการสังเคราะห์

รหัสอย่างง่าย	% yield	MW	% C	% H	% N	% O
L1	212.91	316.32	60.69	5.05	8.85	25.29
L2	197.14	301.31	59.73	4.83	13.93	20.62
C1	77.07	450.80	42.59	3.54	6.21	17.74
C2	80.23	486.19	39.49	3.29	5.75	16.45
C3	66.14	435.75	41.30	0.26	9.63	14.68
C4	86.54	471.18	38.20	3.18	0.91	13.58


SU-1500 15.0kV 7.0mm x3.50k BSECOMP 70Pa
10.0um
L x4.0k 20 um

ภาพที่ 4.2 ลักษณะมอร์โฟโลกีของสารนาโนอินทรย์ SRA-INH จากกล้องจุลทรรศน์ Scanning Electron Microscope (SEM), Hitachi TM-1000

4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยวิธี DPPH แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การจับอนุมูลอิสระ (% Scavenging effect) ซึ่งเป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับสารสังเคราะห์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 520 nm ซึ่งเป็นค่า Wavelength ที่สารละลาย DPPH สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH เปลี่ยนไปแสดงว่า สารมีสมบัติเป็นแอนตีออกซิแดนด์โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH โดย DPPH free radical ได้รับอิเล็กตรอนหรืออะตอมอิสระต่อไป สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 520 nm จะลดลงแล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป จะทำให้ทราบค่าเท่ากับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารแต่ละชนิดด้วยเทคนิค DPPH

ชนิดของสาร	**ความเข้มข้น (ppm)**	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 520 nm**			$\bar{x}\pm$**SD**	**Radical Scavenging activity (%)**
		ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**		
L1	20	0.391	0.244	0.259	0.298 ± 0.081	34.934
	40	0.203	0.252	0.273	0.243 ± 0.036	46.943
	60	0.335	0.211	0.170	0.239 ± 0.086	47.816
	80	0.113	0.322	0.172	0.202 ± 0.108	55.895
	100	0.225	0.191	0.080	0.165 ± 0.076	63.973
L2	20	0.345	0.329	0.253	0.309 ± 0.049	32.532
	40	0.230	0.296	0.238	0.255 ± 0.036	44.323
	60	0.190	0.253	0.189	0.211 ± 0.037	53.930
	80	0.130	0.193	0.173	0.165 ± 0.032	63.973
	100	0.145	0.090	0.087	0.085 ± 0.006	81.441
C1	12.5	0.162	0.269	0.196	0.209 ± 0.055	29.152
	25	0.396	0.083	0.097	0.192 ± 0.177	34.915
	50	0.254	0.056	0.064	0.125 ± 0.112	57.627
	100	0.164	0.077	0.082	0.108 ± 0.049	63.389
C2	20	0.193	0.173	0.207	0.191 ± 0.017	5.911
	40	0.172	0.165	0.174	0.170 ± 0.005	16.256
	60	0.131	0.151	0.143	0.142 ± 0.010	30.049
	80	0.155	0.133	0.124	0.137 ± 0.016	32.512
	100	0.028	0.140	0.035	0.068 ± 0.063	66.502
C3	20	0.193	0.199	0.102	0.165 ± 0.054	18.719
	40	0.275	0.085	0.100	0.153 ± 0.106	24.630
	60	0.225	0.104	0.097	0.142 ± 0.072	30.049
	80	0.190	0.080	0.100	0.123 ± 0.059	39.438
	100	0.113	0.115	0.106	0.111 ± 0.005	45.320
C4	12.5	0.290	0.280	0.273	0.281 ± 0.009	4.745
	25	0.312	0.243	0.253	0.269 ± 0.037	8.813
	50	0.224	0.196	0.214	0.211 ± 0.014	28.474
	100	0.177	0.160	0.186	0.174 ± 0.013	41.016

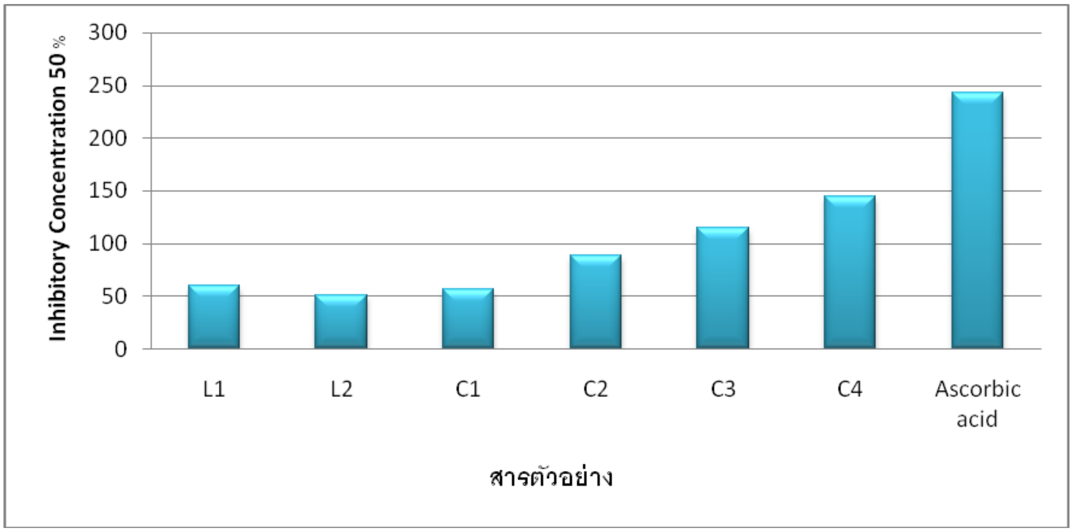
จากตารางที่ 4.3 พบว่า สาร Novel Schiff base ทั้งหมดออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง และเมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้น แสดงว่าสารตัวอย่างออกฤทธิ์ในลักษณะที่เรียกว่า Concentration dependence

สำหรับค่า IC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^+$ ลดลง 50% ได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ

สารตัวอย่าง	**IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%)**
L1	60.289
L2	51.109
C1	56.283
C2	88.770
C3	114.362
C4	145.103
Ascorbic acid	242.884

เมื่อนำค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) ของสารตัวอย่างมาสร้างกราฟเปรียบเทียบกับสารอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ Ascorbic acid ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 การเปรียบเทียบค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) ของสารตัวอย่างกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

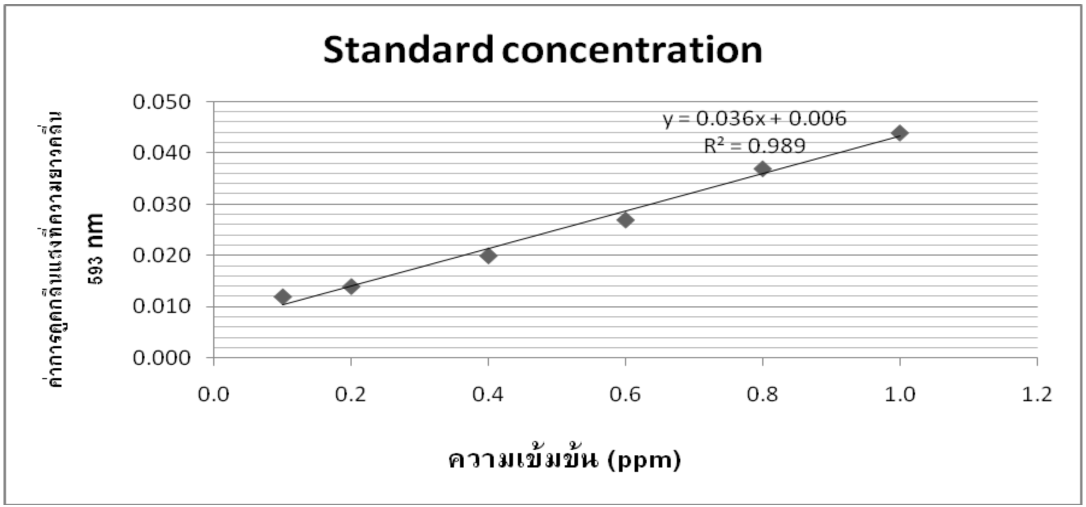
จากภาพที่ 4.3 จะพบว่าสาร L2 สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH^{+} ได้ดีที่สุด มีค่า IC$_{50}$ (Inhibitory Concentration 50%) เหลือในปริมาณที่น้อย

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

เมื่อนำสารละลาย Iron (II) sulphate ที่เตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 100 80 60 40 และ 20 (ppm) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสงดังตาราที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงค่ามาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

Standard concentration (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm
0.0	0.000
0.1	0.012
0.2	0.014
0.4	0.020
0.6	0.027
0.8	0.037
1.0	0.044



ภาพที่ 4.4 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐานและคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่เกิดขึ้นได้ผลดังตารางที่ 4.6

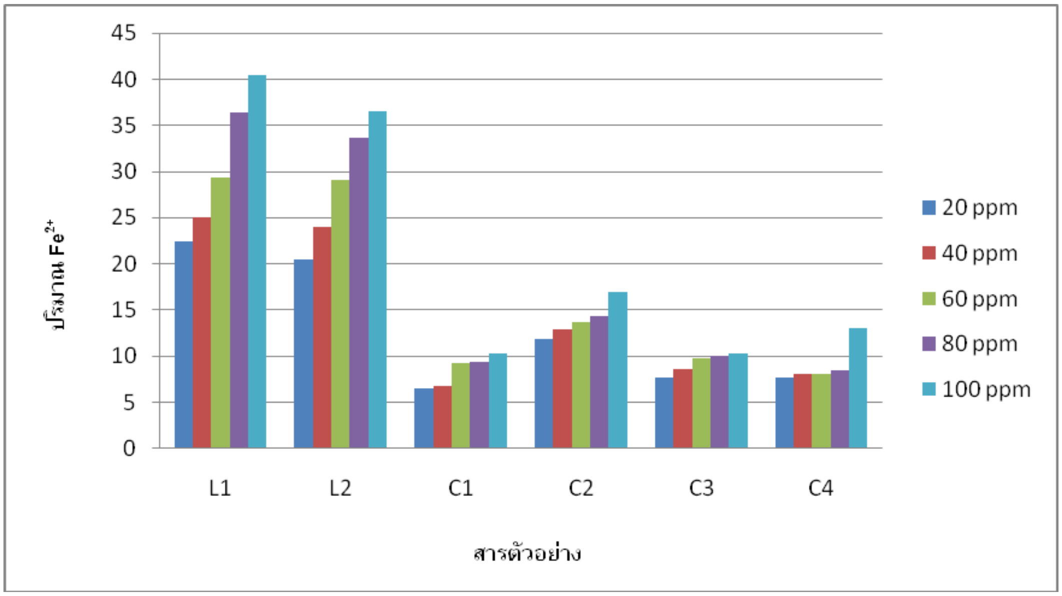
ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยสารตัวอย่างในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm			$\bar{x}$±SD	**ปริมาณของ Fe^{2+}**
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
L1	100	1.476	1.466	1.447	1.463 ± 0.015	40.472
	80	1.344	1.295	1.313	1.317 ± 0.025	36.416
	60	1.075	1.051	1.059	1.062 ± 0.012	29.333
	40	0.926	0.885	0.914	0.908 ± 0.021	25.055
	20	0.823	0.786	0.829	0.813 ± 0.023	22.416

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) แสดงปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยสารตัวอย่างในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm			$\bar{x}$±SD	**ปริมาณของ Fe^{2+}**
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
L2	100	1.318	1.315	1.323	1.319 ± 0.004	36.472
	80	1.220	1.213	1.224	1.219 ± 0.006	33.694
	60	1.046	1.055	1.051	1.051 ± 0.005	29.027
	40	0.874	0.868	0.867	0.870 ± 0.004	24.000
	20	0.739	0.741	0.751	0.744 ± 0.006	20.500
C1	100	0.393	0.371	0.360	0.375 ± 0.017	10.250
	80	0.343	0.341	0.342	0.342 ± 0.001	9.333
	60	0.321	0.342	0.357	0.340 ± 0.018	9.277
	40	0.254	0.257	0.243	0.251 ± 0.007	6.805
	20	0.248	0.229	0.244	0.240 ± 0.010	6.500
C2	100	0.621	0.625	0.603	0.616 ± 0.012	16.944
	80	0.520	0.522	0.526	0.523 ± 0.003	14.361
	60	0.511	0.497	0.490	0.499 ± 0.011	13.694
	40	0.480	0.470	0.470	0.473 ± 0.006	12.972
	20	0.429	0.434	0.437	0.433 ± 0.004	11.861
C3	100	0.435	0.358	0.343	0.379±0.049	10.361
	80	0.342	0.412	0.348	0.367±0.039	10.027
	60	0.361	0.360	0.354	0.358±0.004	9.777
	40	0.315	0.317	0.323	0.318±0.004	8.666
	20	0.279	0.272	0.299	0.283±0.014	7.694
C4	100	0.502	0.449	0.471	0.474±0.027	13.000
	80	0.317	0.295	0.315	0.309±0.012	8.416
	60	0.375	0.296	0.321	0.297±0.023	8.083
	40	0.295	0.309	0.282	0.295±0.014	8.027
	20	0.259	0.312	0.273	0.281±0.027	7.638

จากตารางที่ 4.6 พบว่า สาร novel Schiff base ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP เมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นจะสามารถ รีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้ในปริมาณที่มากและเมื่อลดความเข้มข้นของสารลงสารตัวอย่างจะรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้น้อยลงตามลำดับของความเข้มข้น



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณ Fe^{2+} ของสารตัวอย่างแต่ละชนิด

จากภาพที่ 4.5 จะพบว่า สารที่เป็นลิแกนด์ คือ สาร L1 จะสามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้ในปริมาณที่มากกว่าสารตัวอย่างชนิดอื่น และสารจะแปลผันตามความเข้มข้น เมื่อสารมีความเข้มข้นมากจะสามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้มากเช่นกัน

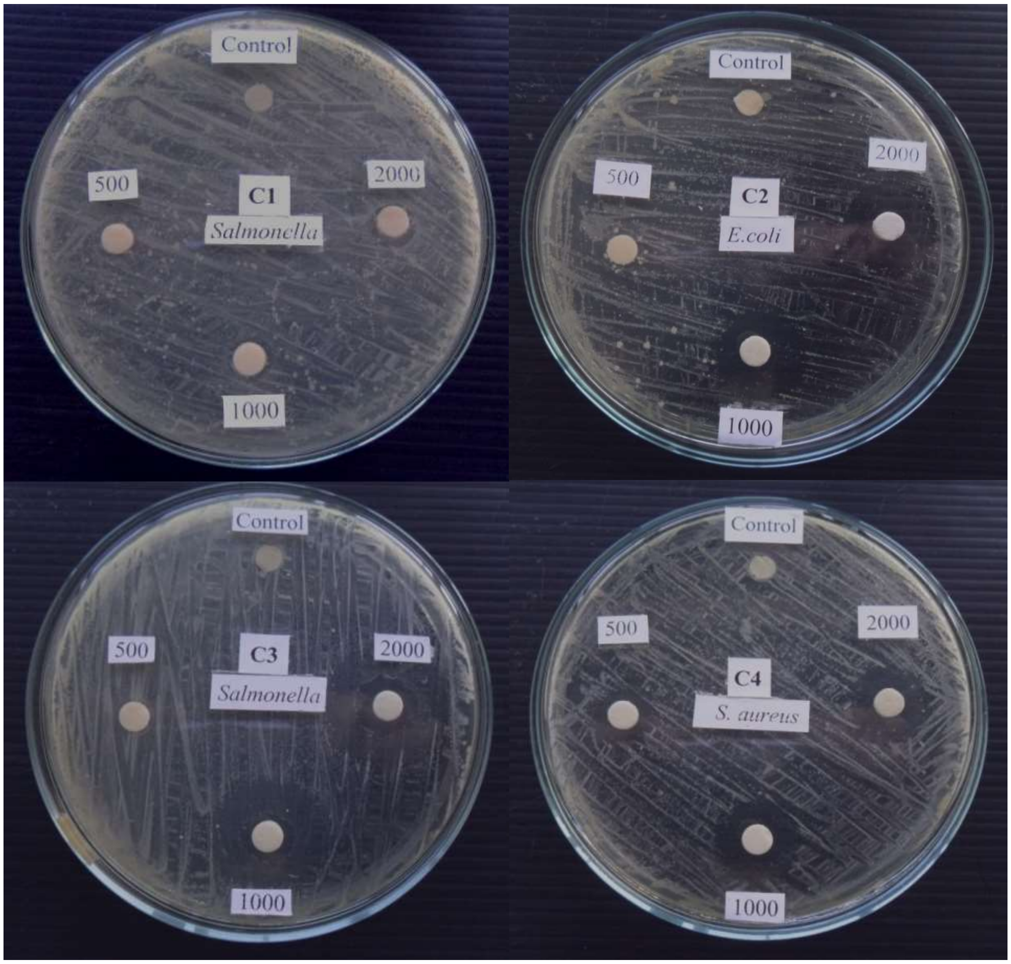
4.6 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย

เมื่อนำสารที่สังเคราะห์แต่ละชนิดมาเตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 2000 1000 และ 500 เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *E.coli.,Staphylococcus aureus.,* และ *Salmonella* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง สามารถวัด Clear Zone ได้ผลดังตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.13

ตารางที่ 4.7 แสดงความสามารถของการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารตัวอย่าง

ชนิดของสาร	**ความเข้มข้น (ppm)**	**Clear zone (mm)**		
		E.coli	***S. aureus***	***Salmonella***
C1	Control	-	7	-
	2000	18	15	10
	1000	17	20	9
	500	14	17	8
C2	Control	-	-	-
	2000	23	20	13
	1000	22	12	13
	500	16	15	9
C3	Control	-	-	-
	2000	15	17	21
	1000	12	16	19
	500	-	16	-
C4	Control	-	-	-
	2000	23	20	18
	1000	22	19	15
	500	20	18	8

จากตารางผลการทดลอง พบว่า สารตัวอย่างทุกชนิดสามารถต้านการเจริญเติบโดของแบคทีเรียได้ทุกตัว นอกจากนี้ยังพบว่าสาร C4 สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด

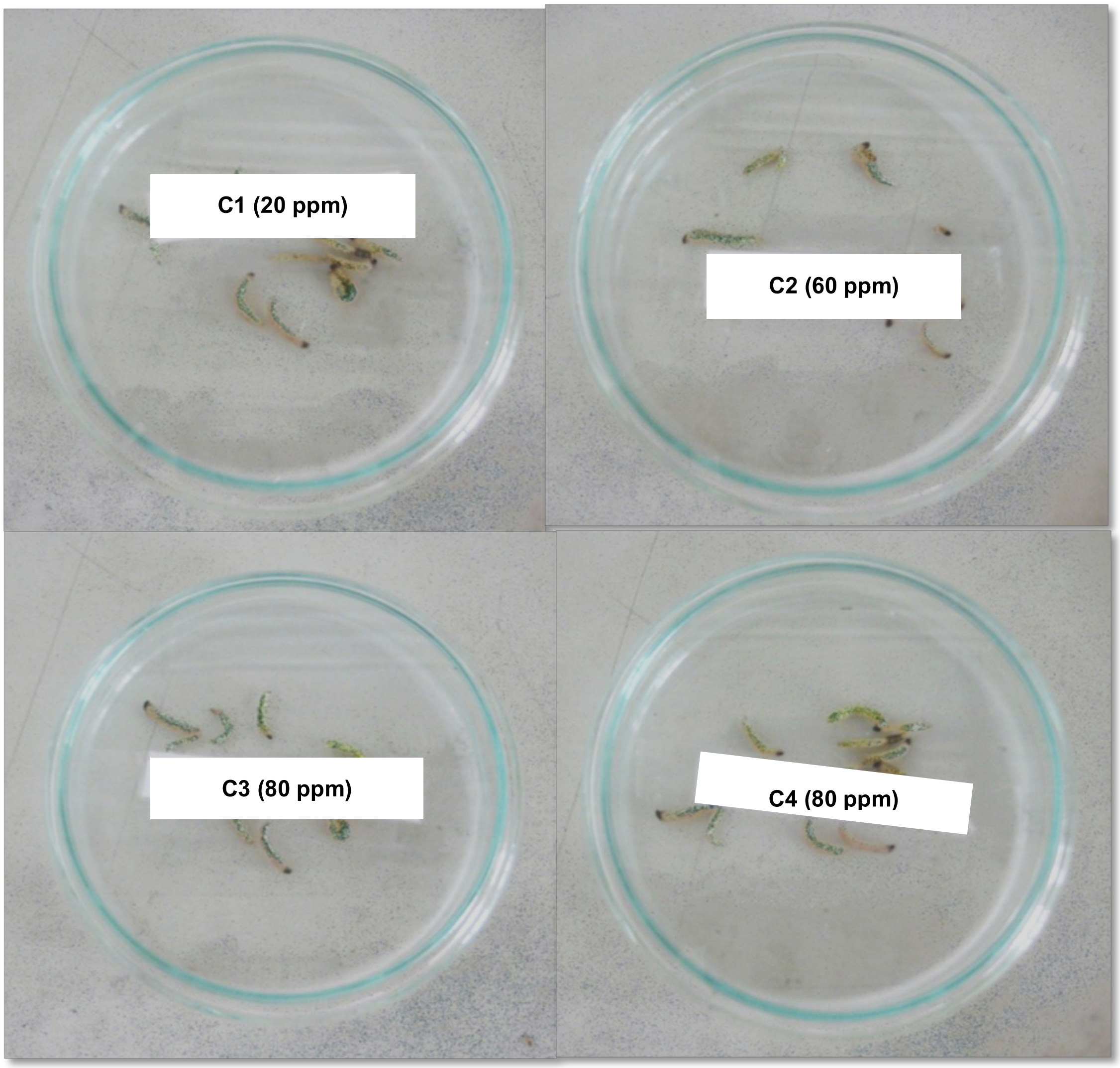

Control
500
2000
C1
Salmonella
1000
Control
500
2000
C2
E.coli
1000
Control
500
2000
C3
Salmonella
1000
Control
500
2000
C4
S. aureus
1000

ภาพที่ 4.6 การต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากภาพที่ 4.6 พบว่าสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้แตกต่างกันซึ่งสารที่ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ สาร C4 สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้ง 3 ความเข้มข้นและมองเห็น Clear zone ได้อย่างชัดเจน

4.7 ผลการศึกษาความสามารถในการฆ่าหนอนกอ

เมื่อนำสารที่สังเคราะห์แต่ละชนิดเตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 100 80 60 40 และ 20 เพื่อทดสอบความสามารถในการฆ่าหนอนกอในนาข้าว ที่ทำให้ผลผลิตตกต่ำ เป็นปัญหาของประชาชนชาวอำเภอลำปลายมาศ ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 4.7 และตารางที่ 4.8



ภาพที่ 4.7 ผลการศึกษาความสามารถในการฆ่าหนอนกอ

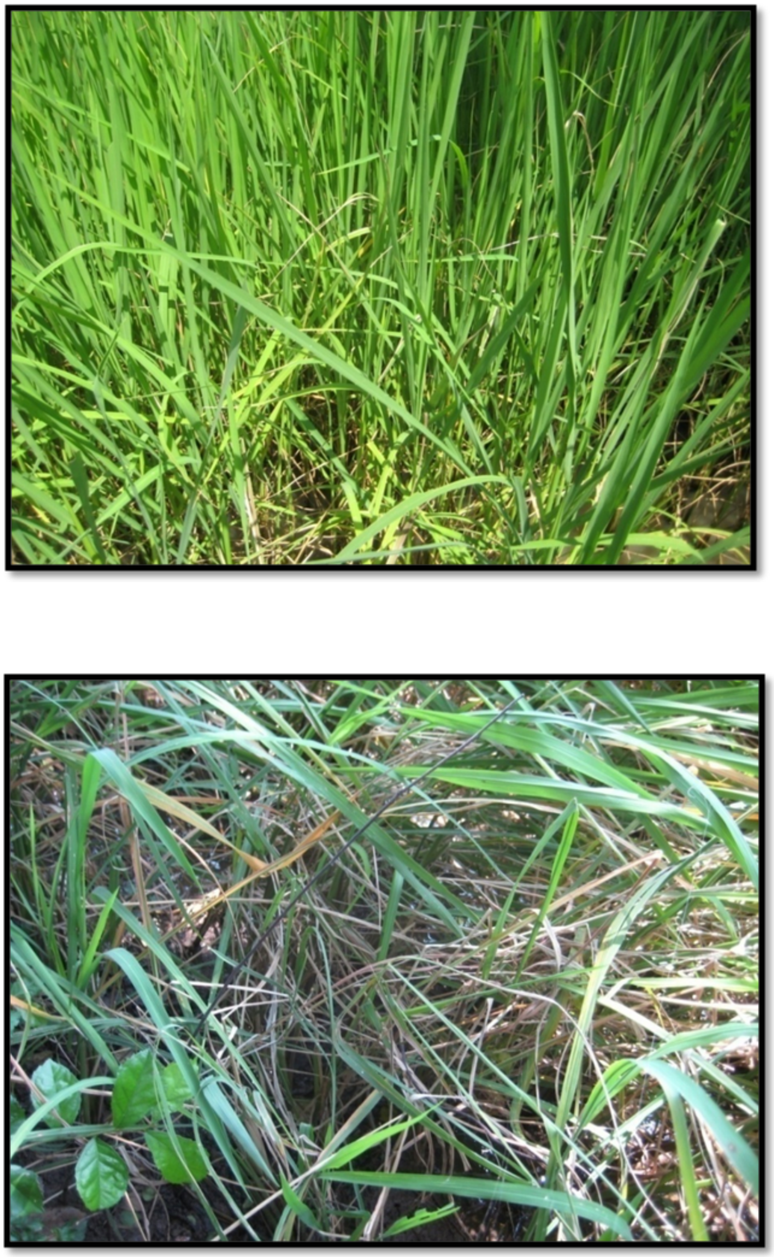
จากภาพที่ 4.7 พบว่าสารตัวอย่างแต่ละชนิดมีความสามารถฆ่าหนอนกอที่ทดลองในห้องปฏิบัติการได้ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ต่ำไปจนถึงความเข้มข้นที่สูง

ตารางที่ 4.8 แสดงความสามารถในการต้านหนอนกอจากสารตัวอย่าง

ชนิดของสาร	**ความเข้มข้น**	**ระยะเวลาในการฆ่าหนอนกอ (นาที)**					
	(ppm)	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**
C1	Control	-	-	-	-	-	-
	100	/					
	80		/				
	60			/			
	40		/				
	20				/		
C2	Control	-	-	-	-	-	-
	100		/				
	80	/					
	60			/			
	40				/		
	20						/
C3	Control	-	-	-	-	-	-
	100		/				
	80		/				
	60			/			
	40					/	
	20					/	
C4	Control	-	-	-	-	-	-
	100	/					
	80			/			
	60					/	
	40				/		
	20						/

หมายเหตุ : / หมายถึง ความเข้มข้นที่เริ่มฆ่าหนอนกอ

จากตารางผลการทดลอง พบว่า ความสามารถของสารที่ใช้ในการฆ่าหนอนกอเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารมากจะสามารถฆ่าหนอนกอได้ในเวลาที่น้อยและเมื่อลดความเข้มข้นของสารลงจะสามารถฆ่าหนอนกอในเวลาที่เพิ่มมากขึ้นตามลำดับของความเข้มข้นของสารในการทดลอง



ภาพที่ 4.8 ลักษณะการทำลายต้นข้าวของหนอนกอ

สรุป ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้รายงานถึงผลการศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ มอร์โฟโลกี และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ ของสารตัวอย่าง คือ สาร L1, L2, C1, C2, C3 และ C4 ซึ่งได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และ FRAP ผลการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและผลการฆ่าหนอนกอในนาข้าว ซึ่งสามารถสรุปได้ดังบทที่ 5

บทที่ 5

สรุปวิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 บทนำ

ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้สรุปประเด็นต่าง ๆ ที่ได้จากการทำวิจัย ดังนี้คือ การสังเคราะห์ การศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ สมบัติทางชีวภาพ ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และ FRAP assay การต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli., Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* รวมถึงการต้านหนอนกอในนาข้าว ของอนุพันธ์ syringaldehyde hydrazonate hydrazonate copper complexes และ hydrazonate silver Nitrate complexes

5.2 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนหรือสารประกอบนาโนโลหะอินทรีย์พบว่า ได้ผลผลิตในเปอร์เซ็นต์ที่สูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนบางชนิดที่ได้มีลักษณะเป็น คริสตอล

การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างโดยวิธี DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picry-hydrazyl) พบว่า สาร L1, L2, C1, C2, C3 และ C4 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งมีค่าน้อยกว่าสารมาตรฐาน Ascorbic acid นั่นแสดงว่าสารแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงซึ่งมีค่า IC_{50} เรียงตามลำดับ ดังนี้ คือ 60.289, 51.109, 56.283, 114.362 และ 145.103 ส่วนสาร hydrazonate copper complexes มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ได้น้อยกว่าในขณะที่เป็นลิแกนด์อิสระ

สำหรับผลการต้านอนุมูลอิสระโดยการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} (FRAP) พบว่า ลิแกนด์และสารเชิงซ้อนต่างก็มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้น้อย ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลทำหน้าที่ในการให้อิเล็กตรอนได้ยาก

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ของสารที่สังเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และ เทคนิค FRAP ที่มีความสัมพันธ์กันน้อย ทั้งนี้เป็นเพราะว่า สารสกัดที่มีความสามารถใน การรีดิวซ์เหล็กได้ดีอาจจะแสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนไม่ดี (โอภา วัชระคุปต์. 2549) นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายและขนาดของโมเลกุลของสารสกัดที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (มัณฑนา ภาณุมาภรณ์. 2552) ดังนั้น การที่ลิแกนด์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ได้ดีเพราะมี

ความสามารถในการละลายน้ำได้ดี และโมเลกุลไม่เกะกะ (Steric effect) จึงเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ดี แต่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้น้อยในเทคนิค FRAP

ผลการต้านแบคทีเรีย พบว่า สารเชิงซ้อนทุกตัวออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้แก่ *E.coli* *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* และออกฤทธิ์ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (Concentration dependence manner) ยกเว้นสาร C3 ที่สามารถต้านแบคทีเรียได้เพียง 2 ชนิด คือโรคที่เกิดจากแบคทีเรียเหล่านี้เป็นโรคที่รักษาได้ยาก โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เพราะแบคทีเรียนี้ดื้อต่อยา Methicillin ที่ใช้อยู่ ผลจากการวิจัยนี้ พบว่า มีสาร syringaldehyde salicylic hydrazone สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ จึงเป็นการค้นพบใหม่ที่น่าสนใจและยังสร้างความหวังใหม่ให้กับผู้ป่วยที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ผลการต้านหนอนกอในนาข้าว พบว่า สารเชิงซ้อนทุกชนิดออกฤทธิ์ต้านหนอนกอได้ดีทุกความเข้มที่ใช้ในการทดลอง (20, 40, 60, 80 และ 100 ppm)

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

ควรมีการนำสารนาโนอินทรีย์ และนาโนโลหะอินทรีย์ ไปปรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์กับศัตรูพืชชนิดอื่น

5.3.2 ข้อเสนอแนะสำหรับนำผลการวิจัยไปใช้

5.3.2.1 ในการทำการสังเคราะห์สารตัวอย่างแต่ละครั้ง อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองต้องสะอาด ถ้าอุปกรณ์ไม่สะอาดอาจเกิดการปนเปื้อนและทำให้ผลการทดลองคาดเคลื่อนได้

5.3.2.2 ควรนำเทคนิคการใช้สารนาโนอินทรีย์ และนาโนโลหะอินทรีย์ ในการต้านหนอนกอในนาข้าวไปขยายความรู้ให้กับชุมชนต่างๆ ที่ประสบปัญหาหนอนกอในนาข้าว

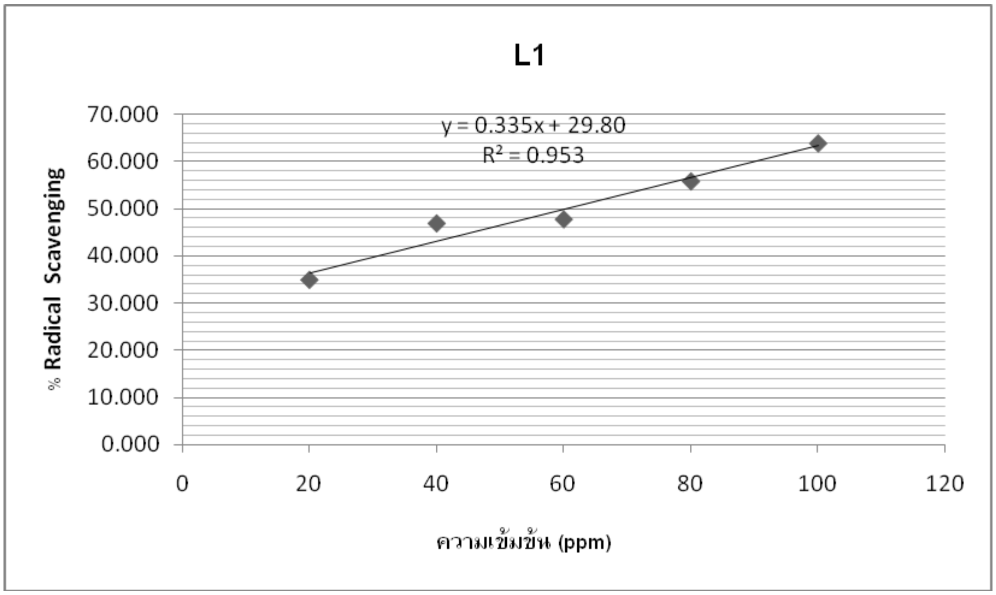
5.3.2.3 ควรได้รับการสนับสนุนแหล่งทุนให้ผลิตสารนาโนอินทรีย์ และนาโนโลหะอินทรีย์ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ภาคผนวก

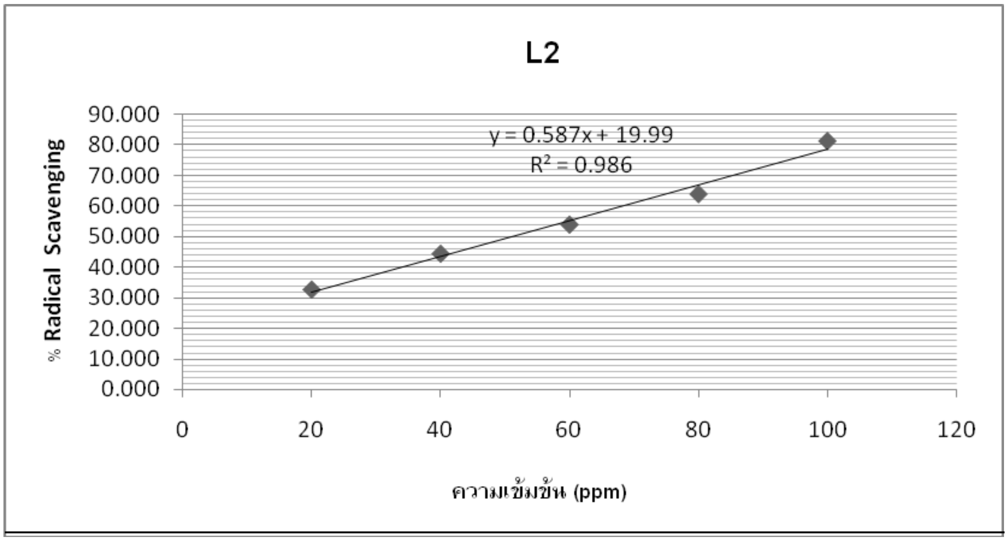
ภาคผนวก

กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างแต่ละชนิด

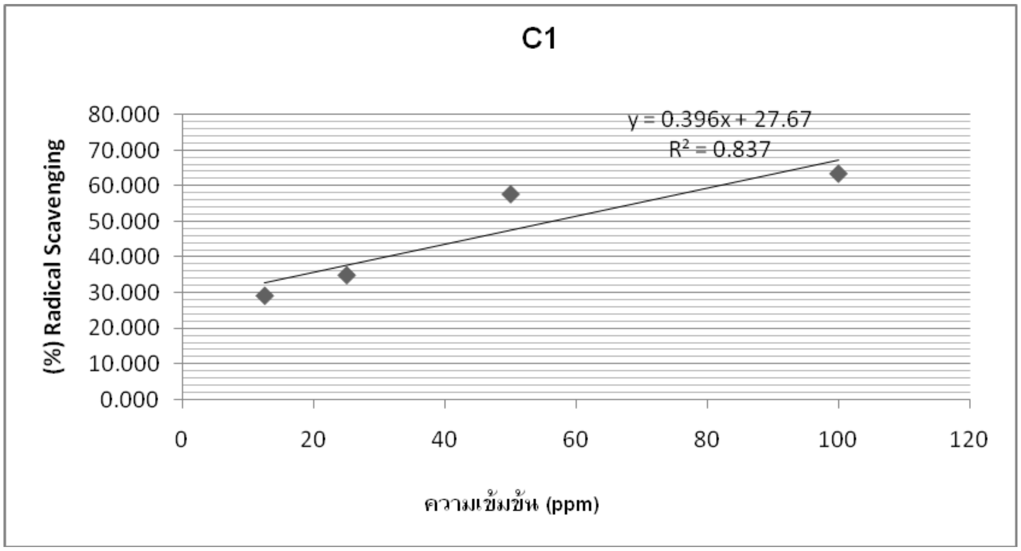
เมื่อนำค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมาสร้างกราฟเปรียบเทียบกับความเข้มข้นจะได้กราฟเป็นเส้นตรงตามภาพต่อไปนี้



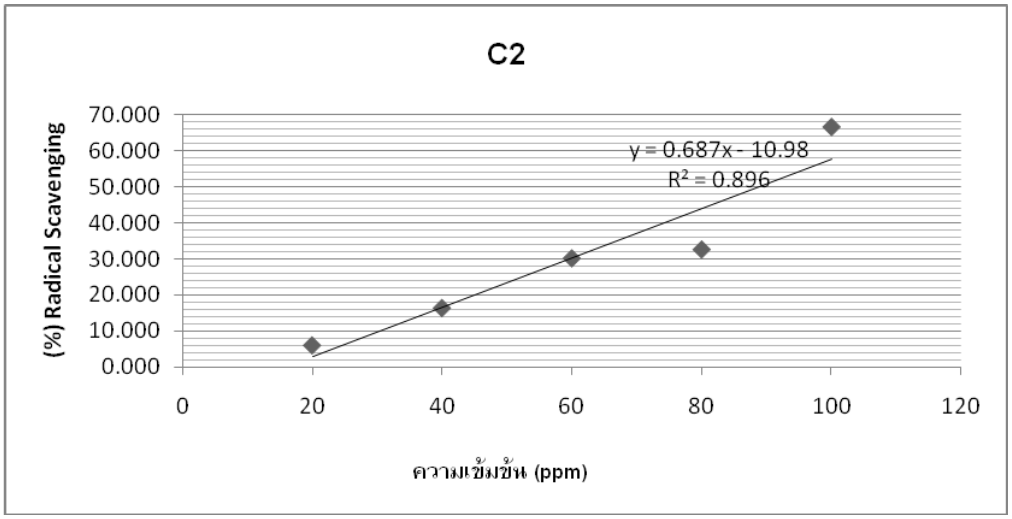
กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสาร L1



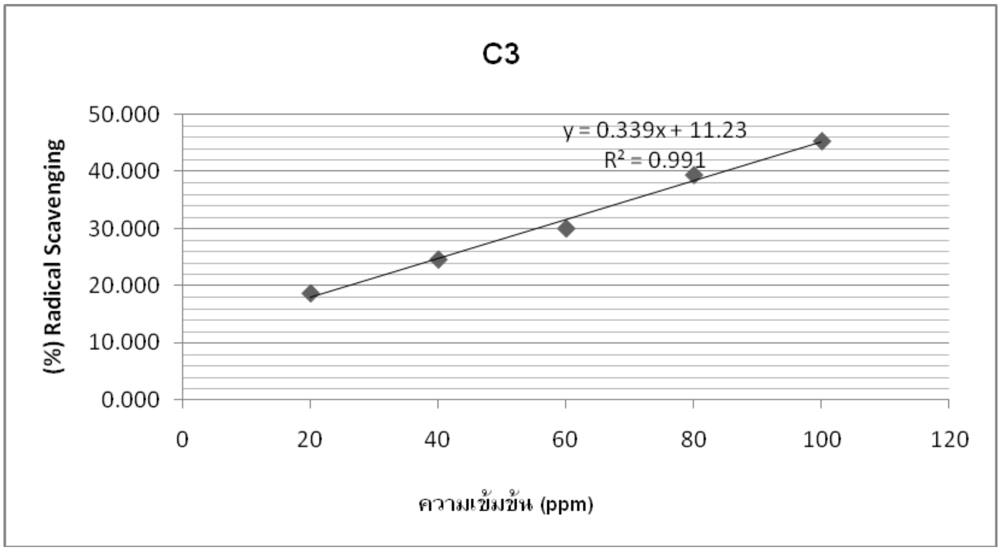
กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสาร L2



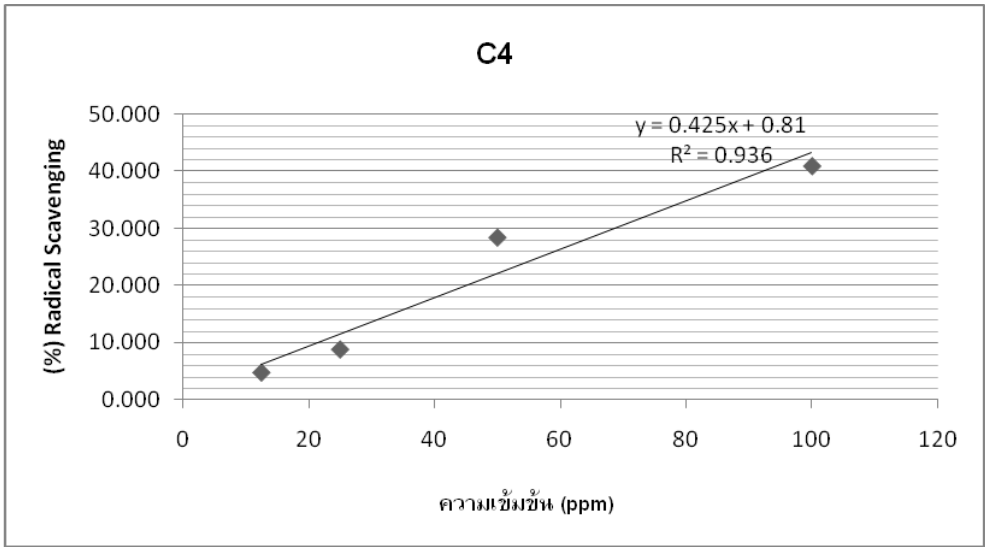
กราฟที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสาร C1



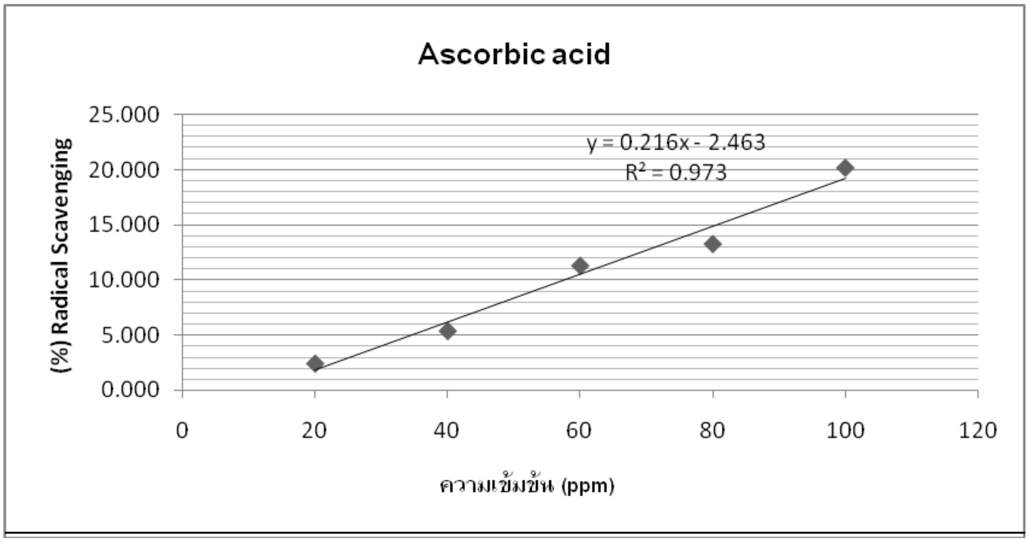
กราฟที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสาร C2



กราฟที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสาร C3



กราฟที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสาร C4



กราฟที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสาร Ascorbic acid

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

โครงการสร้างความเข้าใจวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรมแก่สาธารณชน. (2549). **ประโยชน์จากนาโนเทคโนโลยี.** ปทุมธานี : สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์แลเทคโนโลยีแห่งชาติ.

จิระะเดช แจ่มสว่าง. (2550). **การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี บนเส้นทางของการเกษตรยุคใหม่**. ค้นเมื่อ 20 มกราคม 2554 จาก http://www.thaigreenagro.com/Article.

เยาวพา สุวัตถิ. (ม.ป.ป.). ค้นเมื่อ 12 พฤศจิกายน 2553 จาก http://www.thairath.co.th

วท.รุกเพิ่มมูลค่าภาคอาหาร-เกษตร. (2553). ค้นเมื่อ 21 มกราคม 2555 จาก http://www.thairath.co.th

ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2551). **เอกสารประกอบการเรียนรู้ หลักสูตรวัสดุนาโน.** กรุงเทพฯ : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีแห่งชาติ.

--------. (2554). **โครงการอบรมครูวิทยาศาสตร์ (วิทยาศาสตร์ เคมี ฟิสิกส์ ชีววิทยา) ประจำปี 2554 "นาโนเทคโนโลยีเบื้องต้น".** กรุงเทพฯ : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

อาหารต้านอนุมูลอิสระ. ค้นเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2555 จาก www.wyethnutrition.co.th

โอภา วัชระคุปต์. (2550). **สารต้านอนุมูลอิสระ Radical scavenging agents**. 2nd edition. กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์.

Azmi, A.S. Bhat, S.H. and Hadi, S.M. (2005). "Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implications for anticancer properties." **FEBS Letters**. 579 : 3131-3135.

Al-Haiza, Mostafa, M.A. and El-kady, M.Y. (2003). "Synthesis and Biological Evaluation of Some New Coumarin Derivatives." **Molecules**. 8 : 275-286.

Das, Manash R., et al. (2011). "Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of grapheme oxide sheets and its antimicrobial activity." **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**. 83 : 16-22.

DiSilvestro, Robert A., et al. (2005). "Soy isoflavone supplementation elevates erythrocyte superoxide dismutase, but not plasma ceruloplasmin in postmenopausal breast cancer survivors." **Breast Cancer Research and Treatment**. 89 : 251-255.

Hubbard, N.E. and Erikson.K.I. (1987). “Enhancement of metastasis from a transportable mouse mammary tumor by a dietary linoleic acid.” **Cancer Research**. 47 : 6171- 6175.

Halliwell, Barry and Gutteridge, John M.C. (1984). “Oygentoxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.” **Biochemistry Journal.** 219 : 1-14.

He, Lili, Liu, Yang, Mustapha, Azlin, and Lin, Mengshi. (2011). “Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*.” **Microbiological Research**. 166 : 207-215.

Lopez, Lidia M., et al. (2002). “Effect of lipophilic 0-Naphthoquinone CG 10-248 on rat liver mitochondria structure and function.” **Biocell**. 26(2) : 237-245.

Kostova, Irena et al. (2005). “Cytotoxic activity of new lanthanum (III) complexes of bis-coumarins.” **European Journal of Medicinal Chemistry**. 40 : 542-551.

Mu,Bin, Lu, Chunyin and Liu, Peng, (2011) . Disintegration-controllable stimuli-responsive polyelectrolyte multilayer microcapsules via covalent layer-by-layer assembly. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**. 82 : 385-390.

Kumari, Avnesh, et al. (2011). Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**. 82 : 224-232.

Leonard, Kwati, et al. (2011). Insitu green synthesis of biocompatible ginseng capped gold nanoparticles with remarkable stability. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**. 82 : 391-396.

Lewis, Anne. *et al.* (2004). “Treatment of Pancreatic Cancer Cells with Dicumarol Induces Cytotoxivity and Oxidative Stress.” **Clinical Cancer Research**. 10(1) : 4550-4558.