สมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบโลหะไดเมทิลไกลออกซิมที่มีขนาดอนุภาคในระดับนาโน

Physico-chemical Property and Biological Activity of Dimethyl Glyoxime Metal Nanoparticles level.

ครุปกรณ์ ละเอียดอ่อน[1*] สมหมาย ปะติตังโข[2] และกิ่งแก้ว ปะติตังโข[3]

[1]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ อำเภอเมืองบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์ 31000

[2]สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ อำเภอเมืองบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์ 31000

[3]สาขาวิชาบรรณารักษ์และสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ อำเภอเมืองบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์ 31000

[*]Corresponding Author, E-mail: Kluphakorn.li@bru.ac.th

Received: 12 August 2018 | Revised: 1 January 2019 | Accepted: 17 March 2019

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทางเคมีด้วยสภาวะที่ไม่รุนแรง ศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ พบว่า สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองแดง (C1) เหล็ก (C2) และนิกเกิล (C3) ในตัวทำละลายเอทานอลที่ร้อนได้ผลผลิตในเปอร์เซ็นต์ที่สูงถึง 78.82 81.11 และ 55.01 % ผลการศึกษาด้วยเครื่อง SEM พบว่า ลักษณะของอนุภาคทองแดงนาโนเป็นทรงกลม ส่วนเหล็กและนิกเกิลนาโนมีลักษณะเป็นรูปเข็มกระจายตัวสม่ำเสมอ ส่วนฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า อนุภาคทองแดงนาโนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด รองลงมาคือ อนุภาคเหล็กและนิกเกิลนาโน สำหรับการต้านอนุมูลอิสระเทคนิค FRAP พบว่า ลิแกนด์ Dimethyl glyoxime (DMG หรือ L1) ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด ส่วนทองแดงมีฤทธิ์ต่ำที่สุด สำหรับฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ พบว่า C1 และ C2 มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *B. cereus Staphylococcus aureus Salmonella* และ *E. coli* ได้ดีที่สุดโดยมีค่าขอบเขตการยับยั้งเฉลี่ยระหว่าง 25-30 mm ดังนั้นผลจากการวิจัยในครั้งนี้จึงมีประโยชน์ต่อวงการแพทย์และเภสัชเป็นอย่างยิ่ง

ABSTRACT

The objectives of this research study were to synthesize nanoparticles by using chemical processes with mild condition and to study physico-chemical properties and biological activities in terms of antioxidant properties and antibacterial activities that cause disease in humans. It was found that nanoparticles could be synthesized by using warm solvent as copper (C1), iron (C2), and nickel (C3) nanoparticles with high percent yield 78.82, 81.11, and 55.01% respectively. The result of the study derived from Scanning Electron Microscopes (SEM) showed that copper nanoparticles are in round shape while iron and nickel nanoparticles are in needle shape/monoclinic shape with regular dispersion. Regarding antioxidant properties of the nanoparticles after employing free radical scavenging DPPH technique, it was found that copper nanoparticles possessed the highest efficiency, followed by iron and nickel nanoparticles respectively. Regarding antioxidant properties of the nanoparticles after employing free radical

scavenging FRAP technique, it was found that the best reduced substance changing from Fe^{3+} to Fe^{2+} was Dimethylglyoxime /ligand (DMG/L1); and copper possessed the lowest antioxidant properties. In terms of antibacterial activities that cause disease in humans, it was found that the C1 and C2 nanoparticles possessed the highest antibacterial efficiency against all of the four bacteria: *B. cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella,* and *E. coli* with mean values of clear zone between 25-30 mm. Therefore, the present research study has contributed in establishing copper, iron, and nickel nanoparticles with DMG reducing ligand obviously warrant further investigations for establishing their therapeutic utilities

คำสำคัญ: สมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ สารประกอบโลหะไดเมทิลไกลออกซิม อนุภาคนาโน
Keywords: Physico-chemical Property, Biological Activity, Dimethyl Glyoxime Metal, Nanoparticles

บทนำ

ในปัจจุบัน นาโนเทคโนโลยีได้มีบทบาทสำคัญต่อวงการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมากขึ้น ประเทศทั่วโลกได้พัฒนาความรู้เกี่ยวกับนาโนเทคโนโลยีให้ทันสมัยเพื่ออำนวยความสะดวกของประชากรทั้งทางด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร เทคโนโลยีชีวภาพ วิศวกรรมและเคมีคลินิก เป็นต้น (ชลดา, 2555) ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และนาโนเทคโนโลยีซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการจัดการ การสร้าง การสังเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์หรือสิ่งต่างๆ ให้มีอนุภาคขนาดเล็กมากประมาณ 1 ถึง 100 นาโนเมตรมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่พิเศษแตกต่างไปจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่เนื่องจากอนุภาคขนาดเล็กส่งผลให้มีพื้นที่สัมผัสที่สูง จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเคมีบนพื้นผิวได้ดี (Wang et al., 2006) ซึ่งปัจจุบันความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยี ได้ถูกพัฒนาไปใช้ในวิทยาศาสตร์หลาย ๆ ด้าน รวมถึงทางการแพทย์และทางทันตกรรม เพื่อการรักษาและดูแลสุขภาพหรือการใช้นาโนชิปช่วยตรวจวินิจฉัยโรค (Chaloupka et al., 2010) ส่วนในการประยุกต์อนุภาคนาโนในด้านวัสดุนั้นนักวิทยาศาสตร์สามารถนำความรู้มาใช้จัดเรียงอะตอมหรือโมเลกุลเข้าด้วยกันอย่างถูกต้องแม่นยำ ส่งผลให้โครงสร้างของวัสดุหรือสารต่าง ๆ มีสมบัติที่พิเศษขึ้นทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ ที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้สอยและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ นาโนเทคโนโลยีจึงเป็นเทคโนโลยีที่เป็นความหวังใหม่ของมวลมนุษยชาติ เพราะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ อย่างมากมายและหลากหลายมากขึ้น การนำนาโนเทคโนโลยีไปใช้ประโยชน์จึงกลายเป็นการบูรณาการศาสตร์หลากหลายแขนงเข้าด้วยกันทั้งในทางวิศวกรรม ฟิสิกส์ เคมี ชีววิทยา อาทิเช่น การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพด้วยสารสกัดจากพืชเพื่อยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ (Gan and Li, 2012) การสังเคราะห์เส้นใยนาโนซิลิกอนคาร์ไบด์เพื่อให้นำไฟฟ้าและนำความร้อนได้ดี (ชลธิราและพิศิษฐ์, 2554) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนไททาเนียมไดออกไซด์ไปรวมกับเส้นใยผ้าทำให้ผ้าสามารถทำความสะอาดได้ด้วยเอง ช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (Montazer and Seifollahzadeh, 2011) การผลิตวัสดุผสมเพื่อยังยั้งแบคทีเรียก่อโรคในการบรรจุภัณฑ์อาหาร (วีรชนและคณะ, 2557) การพัฒนาระบบจ่ายยาเฉพาะจุดที่เกิดโรคทำให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (Chaloupka et al., 2010) การพัฒนาวัสดุเรซินคอมโพสิตในการช่วยลดการยึดเกาะของแบคทีเรียและมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Li et al., 2009) การวิจัยและพัฒนาน้ำยาซักล้างสูตรน้ำและการผลิตเครื่องสำอางระงับกลิ่นกายที่มีประสิทธิภาพกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่มีอนุภาคซิลเวอร์นาโน (สนอง, 2558)

ในขณะเดียวกันวงการแพทย์พยายามหาแนวทางในการป้องกัน ยับยั้งเชื้อโรคหรือโรคภัยไข้เจ็บก็เกิดขึ้นมาทำร้ายคนและสัตว์อยู่เรื่อยๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไข้หวัดนก โรคเอดส์ โรคซาร์ นอกจากนี้ยังมีโรคร้ายอีกมากมายที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (Free radicals) เช่นโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อม ความบกพร่องของเซลล์ประสาท ระบบสื่อประสาทในสมอง และสภาวะขาดเลือดของอวัยวะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต เช่น หัวใจและสมอง ที่สำคัญคืออนุมูลอิสระทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกายและมีความไวต่อการออกซิไดซ์ ทำให้สมบัติและการทำงานเปลี่ยนไป เกิดการบกพร่อง หรือถูกทำลาย อันเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคชนิดต่างๆ (โอภา, 2544) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็ได้สร้างความเดือดร้อนทำให้เกิดโรคอีกมากมาย เช่น โรคอุจจาระร่วง (Diarrheal diseases) โรคติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ ไส้

ติ่งอักเสบ เยื่อบุช่องท้องอักเสบ แผลติดเชื้อ โลหิตติดเชื้อ ที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *E. Coli* ทำให้สร้างความเสียหายอย่างมากทั้งด้านสังคม ด้านเศรษฐกิจและด้านสุขภาพอนามัย เป็นสาเหตุจูงใจให้นักวิทยาศาสตร์ทุกด้านพยายามศึกษาค้นคว้าหาความรู้หรือแก้ปัญหานี้อย่างจริงจัง เช่นในปี 2550 ได้มีการค้นพบสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากเปลือกต้นวงศ์อบเชยมีค่า EC_{50} สูงกว่า BHT ซึ่งเป็นสารต้านแอนติออก-ซิแดนต์ที่ยอมรับกันและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน หรือการนำอนุภาคนาโนเคลือบลงบนเครื่องมือทางการแพทย์บางชนิดที่ต้องการใช้งานเพื่อป้องกันการติดเชื้อ เคลือบกับผ่าปิดแผล (กานต์พิมลและรินา, 2560) การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนจากสารสกัดจากโกงกางใบใหญ่ (*Rhizophola mucronata*) ในการยับยั้งเชื้อรา (Singh et al., 2013)

การพัฒนาอนุภาคนาโนเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและนับวันจะเข้ามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้น ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญด้านการสังเคราะห์สารอนุภาคนาโน โดยการนำสาร Dimethyl glyoxime (DMG) เป็นสารที่มีสมบัติโดดเด่นคือมีพื้นที่ผิวสูง สามารถปรับเปลี่ยนองค์ประกอบหลักในการจัดเรียงอะตอมและสามารถสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียได้มาก โดยการนำมารีดิวซ์กับเกลือของโลหะทองแดงและเหล็ก เป็นการผสมผสานองค์ความรู้ทางด้านนาโนศาสตร์และนาโนเทคโนโลยี ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโน หลังจากนั้นนำไปทดสอบสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physic-chemical properties) และฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological properties) ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, และ *Staphylococcus aureus* โดยเทคนิค In vitro และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH (1,1-diphenyl-2-2 picrylhydrazyl) และ เทคนิค FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay) ในครั้งนี้ ผลที่ได้จากการวิจัยจะได้นำไปเป็นแนวทางในการพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับนาโนมีประสิทธิภาพสูง สามารถที่จะนำไปเป็นยาในการรักษาโรคในมนุษย์ สัตว์และพืชเศรษฐกิจ ตลอดจนเครื่องสำอางและวัสดุอุปกรณ์ที่ปลอดเชื้อต่าง ๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสังเคราะห์สาร มีขั้นตอนดังนี้

1.1 การสังเคราะห์ C1 (Dimethyl glyoxime + $CuCl_2$ + Phenanthroline hydrate) ละลายสาร Dimethyl glyoxime 1 mol ใน เอทานอล (10 ml) แล้วเติม $CuCl_2$ 1 mol จะได้สารละลายที่มีสีเขียวเข้ม เติม Acetonitrile (20 ml) จากนั้นเติม Phenanthroline hydrate 1 mol แล้วปรับความเร็วในเครื่องกวน (Magnetric stirrer) เพื่อทำให้เหล็กเกิดสารเชิงซ้อนช่วยป้องกันการตกตะกอนของเกลือเหล็กและสีของสารเชิงซ้อนจะมีความเสถียรได้นาน จากนั้นจะได้สารละลายที่มีสีเขียวใส ใช้เวลาในการกวน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดพบว่า สารเกิดการตกตะกอน จึงกรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 3 วัน จึงเก็บสารตัวอย่างไว้ใน Vacuum

1.2 การสังเคราะห์ C2 (Dimethyl glyoxime + $FeCl_3$ + Phenanthroline hydrate) ละลายสาร Dimethyl glyoxime 1 mol ใน เอทานอล (10 ml) แล้วเติม $FeCl_3$ 1 mol จะได้สารละลายที่มีสีเหลืองอ่อน เติม Phenanthroline hydrate 1 mol ปรับความเร็วในเครื่องกวน จากนั้นจะได้สารละลายที่มีสีแดงแกมส้ม ใช้เวลาในการกวน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด พบว่าสารเกิดการละลายในตัวทำละลายเป็นอย่างดี จึงนำสารประกอบที่ได้ไประเหยแห้งทิ้งไว้ 2 วัน จึงเก็บสารตัวอย่าง

1.3 การสังเคราะห์ C3 (Dimethyl glyoxime + $NiCl_2$ + Phenanthroline hydrate) ละลายสาร Dimethyl glyoxime 1 mol ใน เอทานอล (10 ml) แล้วเติม $NiCl_2$ 1 mol จะได้สารละลายที่มีสีเหลืองอ่อน เติม Phenanthroline hydrate 1 mol ปรับความเร็วในเครื่องกวน จากนั้นจะได้สารละลายที่มีสีแดงแกมส้ม ใช้เวลาในการกวน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด พบว่า สารเกิดการละลายในตัวทำละลายเป็นอย่างดี จึงนำสารประกอบที่ได้ไประเหยแห้งทิ้งไว้ 2 วัน จึงเก็บสารตัวอย่าง

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM

โดยการติดตัวอย่างบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้า แล้วนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ion sputter (ยี่ห้อ Balzers, model SCD 040) จากนั้นนำไปส่องดูด้วย SEM (ยี่ห้อ JEOL, model JSM-6400)

3. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง

โดยการเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ดัดแปลงจาก Mokbel and Hashinaga. (2005) แล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง SPECTRONIC 20 GENESYS ที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยวัดจากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง เพื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ Radical scavenging

4. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

โดยการเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) ดัดแปลงจาก Benzie and Strain (1996) โดยนำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Iron (II) sulfate solution กับค่าการดูดกลืนแสง โดยการเตรียมสารละลาย Ferrous sulphate ที่ความเข้มข้น 1 mM โดยชั่ง $FeSO_4 .7H_2O$ จำนวน0.0279 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 ml จากนั้นทำการเจือจางสารละลาย (Dilution) เป็นความเข้มข้น 100 80 60 40 20 ppm ตามลำดับ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเทียบความเข้มข้น

5. การทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ ได้แก่ *Escherichia coli*. *Bacillus cereus* *Salmonella* และ *Staphylococcus aureus*. มีขั้นตอนดังนี้

5.1 นำเชื้อที่เตรียมไว้เกลี่ยบน Hot plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ โดยใช้ Cotton bud ที่ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave แล้วนาน 15 นาที

5.2 เตรียมสารตัวอย่างโดยชั่ง C1, C2 และ C3 0.02 g ปรับปริมาตรด้วย Dimethyl sulfoxide และ Methanol

5.3 ปิเปตสารตัวอย่างใส่ลงขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้

ความเข้มข้น 0.618 M ปริมาตร 5 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml

ความเข้มข้น 0.825 M ปริมาตร 5 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml

ความเข้มข้น 1.031 M ปริมาตร 5 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml

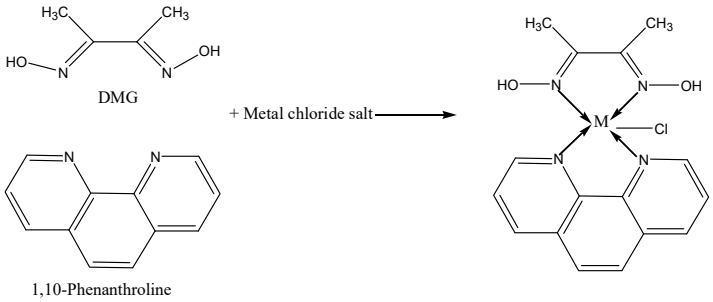
5.4 นำ Paper disk วางบนแผ่นกระจกสี่เหลี่ยมแต่ละความเข้มข้น แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 µl ลงบน Paper disk ในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำ Paper disk เก็บไว้ในที่มืดและที่มีแสงสว่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ในข้อที่ (3)

5.5 นำเชื้อไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ ในกรณีของแบคทีเรียใช้อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดวัดเขตควบคุมการเจริญเติบโต (Clear zone)

ผลการวิจัย

1. ผลการสังเคราะห์สารตัวอย่าง

ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะโดยเทคนิคทางเคมีที่มีลิแกนด์หลักเป็น Dimethyl glyoxime ลิแกนด์ช่วยเป็น Phenanthroline ใน Alcoholic medium ที่อุณหภูมิ 40 °C ด้วยวิธีคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การสังเคราะห์และโครงสร้างของสารอนุภาคนาโน Dimethyl glyoxime (DMG)

2. ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์

สมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ที่สำคัญของสารประกอบ ทั้งที่เป็นลิแกนด์ ได้แก่ Dimethyl glyoxime ซึ่งกำหนดให้เป็น L1 และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างลิแกนด์เหล่านี้กับ Cu, Fe และ Ni ได้แก่ C1, C2 และ C3 สารประกอบที่สังเคราะห์ได้จะมีสี สูตรโมเลกุล จุดหลอมเหลว เปอร์เซ็นต์ของธาตุองค์ประกอบ และเปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ซึ่งสารที่สังเคราะห์ได้มีทั้งหมด 4 ชนิด กำหนดเป็นรหัสดังต่อไปนี้ คือ สาร L1 ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ DMG เมื่อนำสาร L1 มาคอนจูเกตกับโลหะ Cu, Fe และ Ni จะได้สารผลิตภัณฑ์จำนวน 3 ชนิด ซึ่งกำหนดให้เป็นสาร C1, C2 และ C3 ซึ่งจุดหลอมเหลว สีของสาร และสมบัติการละลายในตัวทำละลาย

ผลการศึกษามวลโมเลกุล และการวิเคราะห์สารที่ได้จากการสังเคราะห์ เมื่อทำการสังเคราะห์แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาคำนวณหาค่าผลผลิตร้อยละ (% yield) จะพบว่าสารตัวอย่างจะมีค่าผลผลิตร้อยละมากกว่า 50 % ขึ้นไปทุกชนิดและสารที่มีค่าผลผลิต มากที่สุดคือสาร C2 เมื่อพิจารณาผลจากตารางแล้วนั้นจะพบว่าสารแต่ละชนิดไม่มีสารใดที่มีค่าผลผลิตเกิน 100 % อาจเนื่องมาจากขั้นตอนการเก็บสารตัวอย่างสารอาจมีการระเหยและสูญเสียไปกับตัวจึงทำให้ค่าผลผลิตไม่ถึง 100 % และนอกจากนี้เมื่อพิจารณาก็จะพบว่าสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดจะมีมวลโมเลกุลและธาตุองค์ประกอบที่แตกต่างกันก็เนื่องจากว่าสารทั้ง 4 ชนิดเป็นสารต่างชนิดกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 สมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารประกอบตัวอย่าง

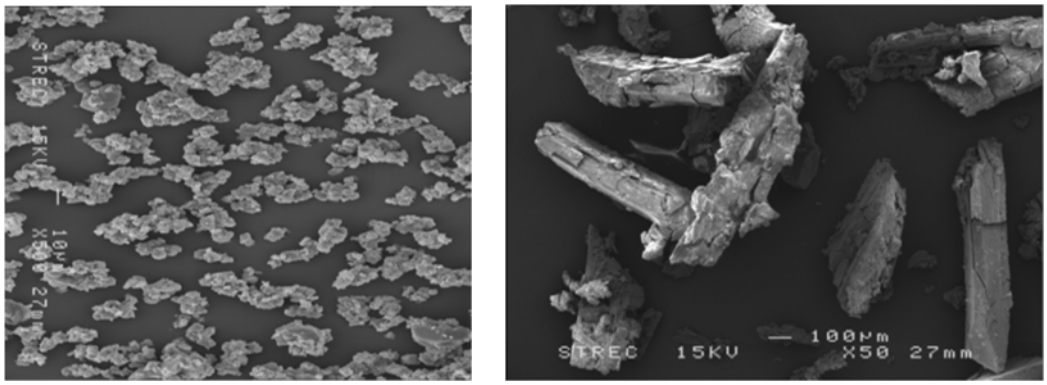
Trivial name	Code	Formular	melting point (°C)	colour	solvent
DMG	L1	$C_4H_8N_2O_2$	242.4	สีขาวใส	Methanol
DMG-Cu-Phen	C1	$[C_{16}H_{16}N_4O_2(CuCl_2)]$	345.1	สีเขียวใส	DMSO
DMG-Fe-Phen	C2	$[C_{16}H_{16}N_4O_2(FeCl_3)]$	332.4	สีดำ	Methanol
DMG-Ni-Phen	C3	$[C_{16}H_{16}N_4O_2(NiCl_3)]$	320.2	สีชมพู	Methanol

ตารางที่ 2 มวลโมเลกุลและการวิเคราะห์สารที่ได้จากการสังเคราะห์

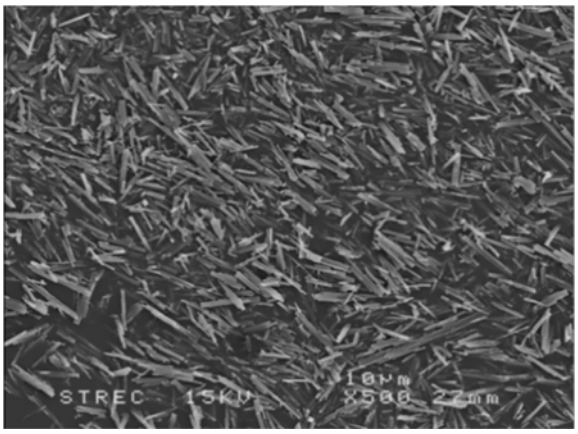
Code	% yield	MW	% C		% H		% N		% O	
			Calc.	Found	Calc.	Found	Calc.	Found	Calc.	Found
L1	75.89	116.00	41.38	41.20	6.89	6.58	24.13	24.16	27.58	27.62
C1	78.82	466.48	41.16	41.32	3.43	3.56	12.00	12.20	6.86	6.90
C2	81.11	566.30	33.90	33.86	2.82	2.80	9.88	9.78	5.65	5.75
C3	55.01	533.71	35.97	36.10	2.99	3.00	10.49	10.53	5.99	6.00

3. ผลการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะอนุภาคนาโนที่ได้จาก SEM (Scanning Electron Microscope) พบว่า C1 หรือ DMG-Cu-Phen ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 80 nm มีลักษณะอนุภาคเป็นแบบทรงกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ส่วน C2 (DMG-Fe-Phen) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 692 nm และ C3 (DMG-Ni-Phen) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 69 nm มีลักษณะรูปเข็ม โดยเฉพาะอนุภาค C3 มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ (รูปที่ 2)



C1 = DMG-Cu-Phen C2 =DMG-Fe-Phen



C3 = DMG-Ni-Phen

รูปที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสารประกอบ C1, C2 และ C3 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

4. ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยวิธี DPPH แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การจับอนุมูลอิสระ (% Scavenging effect) เป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับสารสังเคราะห์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 520 nm ซึ่งเป็นค่า Wavelength ที่สารละลาย DPPH สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH เปลี่ยนไปแสดงว่า สารมีสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนต์โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH โดย DPPH free radical ได้รับอิเล็กตรอนหรืออะตอมอิสระต่อไป ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 520 nm จะลดลง แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปซึ่งมีค่าเท่ากับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลการทดลอง (ตารางที่3)

ระดับความเข้มข้นของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ สารทั้งหมดสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง โดยเฉพาะ C1 (DMG-Cu-phen) เป็นสารที่มีฤทธิ์สูงสุดและเมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระก็จะเพิ่มขึ้น

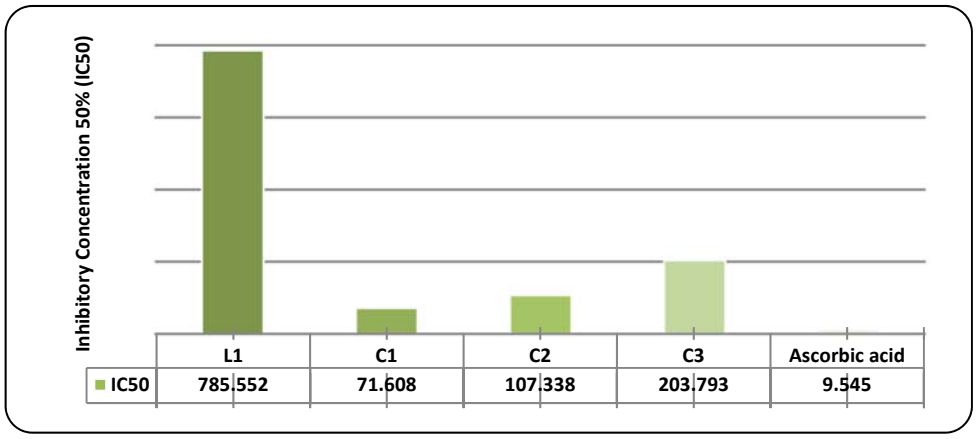
เมื่อนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50% ได้ผล (ตารางที่ 4) และพบว่าลิแกนด์ (L1) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อย แต่เมื่อทำการคอนจูเกตกับลิแกนด์ช่วยโดยมีโลหะร่วมอยู่ด้วยประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้น ดังนั้น สารตัวอย่างหรืออนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ในครั้งนี้นอกจากจะออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของมนุษย์ได้แล้วยังอาจป้องกันโรคอื่นๆ ได้อีกด้วย โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ เช่น ความจำเสื่อม มะเร็ง เบาหวาน และชะลอความแก่อีกด้วย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระจากการตรวจวัดด้วยวิธี DPPH

substance	Conc.(ppm)	absorbance 520 nm			$\bar{x}$+SD	Radical Scavenging activity (%)
		1	2	3		
L1	100	0.739	0.699	0.714	0.71±0.020	27.100
	80	0.732	0.736	0.748	0.739±0.008	24.932
	60	0.747	0.748	0.734	0.743±0.008	24.491
	40	0.751	0.735	0.734	0.740±0.010	24.796
	20	0.751	0.744	0.752	0.749±0.004	23.882
C1	100	0.277	0.274	0.152	0.234±0.071	57.471
	80	0.242	0.266	0.246	0.251±0.013	54.385
	60	0.272	0.257	0.273	0.267±0.009	51.482
	40	0.266	0.264	0. 428	0.319±0.094	42.044
	20	0.842	0.253	0.257	0.451±0.339	18.209
C2	100	0.407	0.365	0.424	0.399±0.030	41.715
	80	0.405	0.452	0.406	0.421±0.027	38.450
	60	0.414	0.407	0.509	0.443±0.057	35.185
	40	0.508	0.753	0.399	0.553±0.181	19.103
	20	0.702	0.393	0.866	0.654±0.240	4.434
C3	100	0.743	0.738	0.733	0.738±0.005	25.000
	80	0.736	0.775	0.770	0.760±0.021	22.730
	60	0.818	0.829	0.825	0.824±0.006	16.260
	40	0.874	0.872	0.872	0.873±0.001	11.314
	20	0.917	0.912	0.903	0.911±0.007	7.452

ตารางที่ 4 ระดับความเข้มข้นของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ

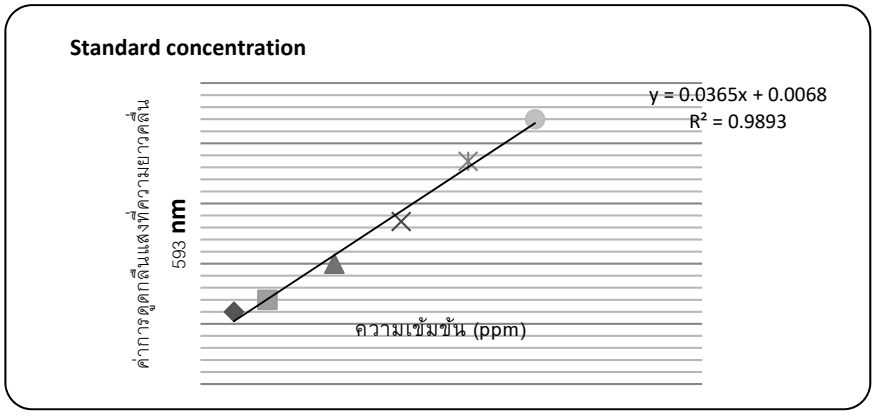
sample substance	IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%)
L1	785.552
C1	71.608
C2	107.338
C3	203.793
Ascorbic acid	9.545



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ IC_{50}

5. ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

เมื่อนำสารละลาย Iron (ll) sulphate ที่เตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 100, 80, 60, 40 และ 20 ppm ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นสารตัวอย่างด้วยวิธี FRAP

6. ผลการทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย (Antibacterial activities)

เมื่อนำสารที่สังเคราะห์แต่ละชนิดมาเตรียมในระดับความเข้มข้นต่างๆ เช่น 0.015, 0.013 และ 0.010 M เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* และ *E. coli* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง สามารถวัดเขตยับยั้งการเจริญเติบโต

สารแต่ละชนิดจะเริ่มต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นก็จะต้านเชื้อแบคทีเรียได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งวัดค่าการต้านเชื้อแบคทีเรียได้จากขนาดของเขตยับยั้งการเจริญเติบโต ที่สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่า ซึ่งสารที่มีความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดคือ สาร C1 และ C2 มีความสามารถในการออกฤทธิ์ได้ดีกว่า L1 และ C3 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย

substance	Conc. (Molar)	Clear zone (mm)			
		B. cereus	*S. aureus*	*Salmonella*	*E. coli*
L1	Control	-	-	-	-
	0.051	15	10	9	9
	0.025	12	9	9	8
	0.012	10	9	8	8
C1	Control	-	-	-	-
	0.015	27	30	25	25
	0.013	15	19	17	20
	0.010	9	11	10	12
C2	Control	-	-	-	-
	0.014	22	23	21	25
	0.012	15	21	20	24
	0.009	20	19	18	21
C3	Control	-	-	-	-
	0.011	15	10	12	11
	0.005	12	9	9	10
	0.002	9	8	8	10

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่า ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และ เทคนิค FRAP ที่มีความสัมพันธ์กันน้อย ทั้งนี้เป็นเพราะว่า สารสกัดที่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีอาจจะแสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนไม่ดี (โอภา, 2549) นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับความเข้นของสารตั้งต้น อุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง (กานต์พิมลและรินา, 2560) ดังนั้น การที่ลิแกนด์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ได้ดีเพราะมีความสามารถใน การละลายน้ำได้ดี และโมเลกุลไม่เกะกะ (Steric effect) จึงเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ดี แต่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้น้อยในเทคนิค FRAP

การทดสอบทางชีวภาพ พบว่า สารประกอบที่สังเคราะห์ได้สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี สังเกตพบว่าขนาดของเขตยับยั้งการเจริญเติบโต ที่สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่า ซึ่งสารที่มีความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ สาร C1 และ C2 ทั้งอนุภาคนาโนออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (*B. cereus.*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* และ *E. coli*) ก่อโรคของมนุษย์ได้ดี โดยเฉพาะอนุภาค C1 และ C2 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด แสดงให้เห็นว่าอนุภาคระดับนาโนที่สังเคราะห์ได้มีอนุภาคขนาดเล็กและสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* ได้ (ปวีณาและคณะ, 2559) เนื่องจากมีกลไกที่สำคัญคืออนุภาคนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์มีขนาดเล็กสามารถที่จะเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีมากขึ้น และยังรบกวนการทำงานของการขนส่งสารเข้าออกระหว่างเซลล์ การหายใจระดับเซลล์ได้ (Rai et al., 2009) นอกจากนี้อนุภาคทั้งหมดยังออกฤทธิ์แบบ Concentration dependence อีกด้วย ดังนั้นการทดลองครั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่จะนำอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ ไปใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น ๆ ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ Dimethyl glyoxime (DMG) เป็นตัวรีดิวซ์ (ลิแกนด์หลัก) และใช้ Phenanthroline เป็นลิแกนด์ช่วย เพื่อเตรียมอนุภาคนาโนของทองแดง เหล็กและนิกเกิล ได้ผลผลิตร้อยละของอนุภาคทั้งสามชนิดเท่ากับ 78.82 81.11 และ 55.01 ตามลำดับ โดยอนุภาคทองแดงที่เตรียมมีลักษณะเป็นทรงกลมกระจายตัวสม่ำเสมอ มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 80 nm ส่วนอนุภาคของเหล็กมีขนาดใหญ่ (692 nm) รูปเข็ม ส่วนอนุภาคนิกเกิลมีลักษณะรูปเข็ม ขนาด

69 nm มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า ทั้งลิแกนด์และอนุภาคนาโนที่เตรียมได้สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ทุกสาร แต่ประสิทธิภาพแตกต่างกัน โดยอนุภาคนาโนสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยเฉพาะ C1 (DMG-Cu-Phen) ออกฤทธิ์ได้สูงสุด รองลงมาคือ C2 (DMG-Fe-Phen) และ C3 (DMG-Ni-Phen) ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP พบว่า สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} เมื่อสารมีความเข้มข้นมากขึ้นความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้มาก สารที่มีความสามารถสูงในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคคือ L1 (Dimethyl glyoxime)

เอกสารอ้างอิง

กฤตพร ชูเส้ง, มัลลิกา จงจิตต์,วลัย หูตะโกวิท และเยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. (2555). รายงานวิจัยเรื่องผลการใช้นาโนเทคโนโลยีของเครื่องแต่งกายเชฟที่มีความปลอดภัยต่ออาหาร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. 106 หน้า

กานต์พิมล กรไกร และรินา ภัทรมานนท์. (2560). อนุภาคเงินนาโนสังเคราะห์ด้วยสารสกัดจากพืชและความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 45(1): 34-52.

จีรศักดิ์ ศรีโกศล และวัชรินกร เมฆลา. (2557). การสังเคราะห์วัสดุนาโนคอปเปอร์ออกไซด์โดยวิธีไฮโดรเทอร์มอล. วารสารบัณฑิตวิทยาลัย พิชญทรรศน์ 9(1): 105-113.

ชลดา ธีรการุณวงศ์. (2555). วัสดุนาโนไททาเนียมไดออกไซด์ : การสังเคราะห์ โครงสร้างและการประยุกต์ใช้. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 14(1): 44-53.

ชลธิชา แสงสุบัน, สุกานดา เจียรศิริสมบูรณ์, และพิศิษฐ์ สิงห์ใจ. (2554). การสังเคราะห์เส้นใยนาโนซิลิกอนคาร์ไบด์จากแกลบผสมแกรไฟต์โดยใช้เหล็กเป็นตัวคะตะลิสต์. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 14(3): 102-106.

ปวีณา ปรวัฒน์กูล, มณฑกานต์ ทองสม, พรไพลิน ขาวสุข และตอยิบ๊ะ ดอเลาะหมิ. (2559). การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนแบบเคมีสีเขียวโดยใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย วารสารวิชชามหาวิทยาลัยนครศรีธรรมราา. 35(1): 26-40.

มยุรัชฎ์ พิพัฒภาสาร, นิรันดร โถทองคำ, วิสาขะ ลิ่มวงศ์ และปทุมพรรณ พรมสินชัย. (2557) คุณสมบัติทางกายภาพของซีเมนต์อุดคลองรากฟันชนิดซิงค์ออกไซด์ยูจินอลนาโน. วารสารนเรศวรพะเยา 7(1): 65-75.

มัณฑนา ภานุมาภรณ์. (2552). เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ. กรุงเทพฯ: กรุงเทพเวชสาร

วีรชน ภูหินกอง, ฐิตา ภูเผ่า, และพุทธิธร แสงรุ่งเรือง. (2016). การสังเคราะห์วัสดุซิงค์ออกไซด์ คอปเปอร์ออกไซด์ นาโนคอมโพสิท เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำหรับการประยุกต์ใช้ในบรรจุภัณฑ์อาหาร. วารสารวิจัย มสด วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 9(2): 95-118.

สนอง เอกสิทธิ์. (2558). การวิจัยขึ้นห้าง : การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนแบบควบคุมสัณฐานวิทยา การจัดการความรู้เพื่อแปรรูปผลงานวิจัยพื้นฐานให้เป็นผลิตภัณฑ์นวัตกรรมทำกำไร. วารสารสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง 1(1): 1-16.

โอภา วัชรคุปต์. (2549). สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: พีเอสพริ้นท์.

Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70-76.

Chaloupka K. Malam Y. Seifalian, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trends Biotechnol. 28(11): 580-588.

Gan, P.P. and Li, S.F.Y. (2002). Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 11(2): 169-206.

Li, B., liu, x., Meng, F., Chang, J., and Ding, C. (2009). Preparation and antibacterial properties of plasma sprayed nano-titania/silver coatings. Materials Chemistry and Physics 118(1): 99-114.

Mokbel, M.S. and Hashinaga, F. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of banana (Musa,AAA cv. Cavendish) fruits peel. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 3: 125-131.

Montazer, M. and Seifollahzadeh, S. (2011). Enhanced self-cleaning, antibacterial and UV protection properties of nano TiO_2 treated textile through enzymatic pretreatment. Journal of Photochemistry and Photobiology 87(4): 877-883.

Rai, M. K., Deshmukh, S.D, A.P&Gade, A.K. (2009). Silvernanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. J.Appl.Microbiol 112(5): 841-852.

Singh, M., Kumer, M., Kalaivani, R., Manikandan, S. and Kumaraguru. A. K. (2013). Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. Bioprocess and Biosystems Engineering 36(4): 407-415.

Wang, J. C., Neogi, P., and Forciniti, D. (2006). On one-dimensional self – assembly of surfactant-coated nanoparticles. The journal of Chemical Physics 125(19): 194717-6.

❑❑❑❑❑