การสังเคราะห์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนาโนอินทรีย์และนาโนโลหะอินทรีย์

Synthesis and Biological Investigation of Nano-Organic and Nano-Organometallic Agents

สมหมาย ปะติตังโข[1] *และ กิ่งแก้ว ปะติตังโข*[2*]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ทดสอบสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนาโนอินทรีย์และนาโนโลหะอินทรีย์โดยมีผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติเป็นตัวรีดิวซ์ต้านเชื้อราโรคพืช อนุมูลอิสระ เพลี้ยแป้งและเพลี้ยกระโดด ผลการศึกษาพบว่า อนุภาคนาโนอินทรีย์มีรูปร่างเป็นทรงกลม และอนุภาคนาโนโลหะอินทรีย์มีรูปร่างแบบแท่ง สารตัวอย่างทั้งหมดสามารถออกฤทธิ์ต้านเพลี้ยแป้งได้ภายใน 30 นาที โดยสาร C4 ออกฤทธิ์กำจัดได้ 100 % ในเวลา 10 นาที สารตัวอย่างทั้งหมดยังสามารถออกฤทธิ์ต้านเพลี้ยกระโดดได้ภายใน 10 นาที โดยสาร C4 ออกฤทธิ์ต้านเพลี้ยกระโดด 100 % ในเวลาเพียง 2 นาที นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้นำสารตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราโรคพืชและต้านอนุมูลอิสระ ผลพบว่า สาร C2 และ C4 มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อราโรคพืชได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของอนุภาคนาโนโลหะและไอออนลบ และยังพบว่า สารซิฟฟ์เบส (L1 และ L2) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้น้อยกว่าอนุภาคนาโนโลหะอินทรีย์ (C1 C2 C3 และ C4) ส่วนการต้านอนุมูลอิสระเทคนิค DPPH พบว่า สารตัวอย่างทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่สารที่ต้านอนุมูลอิสระได้ดีด้วยค่า IC_{50} ที่ต่ำ คือ L1 C1 และ C3 สำหรับการต้านอนุมูลอิสระเทคนิค FRAP พบว่า สารที่รีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้ดีที่สุด คือ L2 รองลงมา คือ C4 ผลจากการวิจัยในครั้งนี้จึงมีประโยชน์ทั้งต่อกลุ่มเกษตรกรที่เผชิญกับปัญหาโรคและศัตรูของพืชเศรษฐกิจและยังเป็นประโยชน์ต่อวงการเภสัชที่จะต้องนำสารเหล่านี้ไปทดสอบกับโรคที่เกิดกับมนุษย์อีกด้วย

[1]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ 31000

[2]สาขาวิชาบรรณารักษศาสตร์และสารสนเทศศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ 31000

[*]Corresponding Author, E-mail: kingkaewpatitungkho@gmail.com

ABSTRACT

This research deals with physicochemical characterization and biological investigation of organic nanoparticles and organometallic nanoparticles using natural product as reducing agent against fungi of plant diseases, scavenging anti-free radical toxicity, *Pseudococcus* sp. and *Nilaparvata lugens* (Stal). The results showed that nano-organic particles are global–like structure and nano-organometallic particles are rod-like structures. All of them showed highest biological effect against *Nilaparvata lugens* (Stal) within 30 minutes by which sample C4 killed them with 100 % at 10 minutes. On the other hand, such compounds killed *Pseudococcus* sp. within 10 minutes but for C4 spent 2 minutes only. The research finding also revealed that all of six compounds inhibit fungi of plant diseases and anti-free radical toxicity in nature with C2 and C4. It indicated the highest activities to fungi diseases in responding to the influence of nanoparticles and anions in use. However, Schiff base compounds (L1, L2) are less active than their derivative particles. For free radical scavenging activities with DPPH technique revealed that all nanoparticles shown high potent antioxidant susceptibility which low IC_{50}, especially compounds exhibit highly potency effective are L1, C1 and C3, respectively. For FRAP technique, the such particles reduced Fe^{3+} to Fe^{2+} concentrated form like L2 and C4. This research work promises it to useful for agricultural groups that facing plant disease and also for chemist to screen them as drug for human being.

คำสำคัญ: เพลี้ยแป้ง เพลี้ยกระโดด เชื้อราโรคพืช สารต้านอนุมูลอิสระ

Keywords: *Pseudococcus* sp., *Nilaparvata lugens* (Stal), Fungi diseases, Free radical scavenging

บทนำ

จากผลิตภัณฑ์มวลรวม (GDP) ไตรมาสที่ 1/2553 ขยายตัว 12 % ซึ่งสูงสุดในรอบ 15 ปี โดยแยกเป็นส่วนของภาคเกษตร 0.2 % โดยสาขาประมงขยายตัว 2.5 % จากกุ้งแช่แข็งส่งออกที่เพิ่มขึ้น ส่วนสาขาเกษตรกรรมลดลง 0.3 % เป็นการลดลงในผลผลิตพืชที่สำคัญคือ ข้าว อ้อยและมันสำปะหลัง เนื่องจากส่วนของพืชเป็นสัดส่วนที่สำคัญที่สุด จากสภาวะการแข่งขันในตลาดโลกที่สูงขึ้นโดยเฉพาะสินค้าเกษตรและอาหาร ซึ่งเป็นสินค้าหลักของประเทศไทย อีกทั้งปัจจุบันประเทศคู่ค้าที่สำคัญได้มีการกำหนดมาตรการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืช (SPS agreement) ดังนั้น กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงได้ส่งเสริมให้ทำการเกษตรให้ได้ผลิตผลที่ปลอดภัยจากสารพิษและทำเกษตรอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น โดยกำหนดการปฏิบัติทางการเกษตรตามระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP; good agricultural practice) ซึ่งมีวิธีการควบคุมศัตรูพืชแบบพึ่งพาสารเคมีให้น้อยที่สุด (สภาที่ปรึกษาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2556) ใช้วิธีการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาทดแทนสารเคมีให้มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นสารพิษ ส่วนมากมีสมบัติในการ

ทำลายล้างสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์และจุลินทรีย์แทบทุกชนิด ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชนั้น ๆ แนวความคิดที่จะเลิกใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและเปลี่ยนมาใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่ไม่ส่งผลเสียต่อมนุษย์ สัตว์ สิ่งแวดล้อม ตลอดจนเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศเป็นสิ่งที่ทุกคนปรารถนา จากการศึกษาการสูญเสียของผลผลิตทางการเกษตรจากการทำลายของศัตรูพืช และวัชพืชเฉลี่ยของโลกพบว่าสูญเสียกว่า 40 % โดยเฉพาะสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น เช่น ประเทศไทยที่สามารถปลูกพืชได้ตลอดทั้งปี ศัตรูพืชสามารถแพร่พันธุ์และระบาดได้ทั้งปีเช่นกัน จึงสร้างความเสียหายอย่างมาก ดังนั้นการควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) ซึ่งเป็นการลดปริมาณประชากรและลดกิจกรรมของเชื้อโรคพืชที่จะก่อให้เกิดโรคจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืชโดยอาศัยสิ่งมีชีวิต (organism) ทั้งนี้หมายรวมถึงพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ตลอดจนสารพันธุกรรมหรือผลิตผลจากสารพันธุกรรม (genes or gene products) ของสิ่งมีชีวิต แต่ยกเว้นผลจากการกระทำต่อเชื้อโรคโดยตรงจากมนุษย์ ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชและแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในการเป็นปฏิปักษ์ (เยาวพา, 2553) ปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาวิธีการควบคุมโรคพืชใหม่ ๆ ทางชีวภาพเพื่อลดอันตรายจากการใช้สารเคมีทางการเกษตร โดยให้เกษตรกรหันมาใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งถือเป็นวิธีที่ยอมรับว่าใช้ได้ผลดี ได้มีการศึกษาถึงกลไกการควบคุมโรคและระบบการควบคุมโรคโดยวิธีต่าง ๆ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เชื้อแบคทีเรียมักเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคพืชโดยการแก่งแย่งอาหาร การยับยั้ง ทำลายและการเป็นปรสิต นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นอีก เช่น ให้เกษตรกรหันมาปลูกพืชแบบผสมผสาน แทนการปลูกพืชเชิงเดี่ยวก็ได้ผลดีในระดับหนึ่ง แต่โดยภาพรวมยังไม่เป็นที่น่าพอใจ ทั้งนี้เนื่องจาก GDP ที่ขยายตัวมาจากภาคนอกการเกษตร ส่วนภาคการเกษตร โดยเฉพาะพืชผลหดตัว 0.3 % (จิระเดช, 2550) โดยผลผลิตจากมันสำปะหลัง อ้อย ข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลดลงดังกล่าวแล้ว ทั้งนี้ด้วยสาเหตุที่สำคัญคือภัยแล้งและโรคระบาด รัฐบาลจึงมีนโยบายเร่งด่วนที่จะเพิ่มขีดความสามารถให้ภาคอาหารและเกษตร เพื่อให้การผลิตได้ทั้งปริมาณและคุณรูปที่มีความปลอดภัย ซึ่งจะเห็นได้จากการที่รัฐมนตรีว่าการกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้สั่งการให้ สวทช. เร่งเพิ่มขีดความสามารถให้อาหารและเกษตร เพื่อรองรับความต้องการของชุมชนและเอกชน หวังสร้างมูลค่าสินค้าไทยแข่งขันกับต่างชาติ เนื่องจากอาหารและเกษตรเป็นหัวใจสำคัญของประเทศไทย จึงต้องการให้นำความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นาโนเทคโนโลยี ไบโอเทคโนโลยี มาช่วยแก้ปัญหาหรือสร้างมูลค่าให้สินค้าของประเทศไทยในการแข่งขันกับต่างชาติ หรือแม้แต่แก้ปัญหาเฉพาะหน้า เช่น ภัยแล้งที่เกิดจากโลกร้อน ฝนทิ้งช่วงที่สร้างความเดือดร้อนให้ภาคการเกษตร ปุ๋ยนาโนที่จะควบคุมการปลดปล่อยสารอาหารออกมาในเวลาที่พืชต้องการ โดยให้เน้นงานยุทธศาสตร์เรื่องความปลอดภัยของอาหารและกระบวนการผลิตที่จะส่งผลกระทบต่อธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม โดยมองว่าตลาดสินค้าที่เน้นเรื่องความปลอดภัยทั้งกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมีแนวโน้มเติบโตได้ดีในอนาคต (วีระชัย, 2553)

นาโนเทคโนโลยี เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจัดการการสร้างการสังเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องจักรหรือสิ่งต่าง ๆ ที่มีขนาดเล็กมากประมาณ 1 ถึง 100 นาโนเมตร ดังนั้นความรู้ทางด้าน

นาโนเทคโนโลยีจึงสามารถนำมาใช้จัดเรียงอะตอมหรือโมเลกุลเข้าด้วยกันอย่างถูกต้องแม่นยำ ส่งผลให้โครงสร้างของวัสดุหรือสสารต่าง ๆ มีสมบัติที่พิเศษขึ้นทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้สอยและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีที่เป็นความหวังใหม่ของมวลมนุษยชาติ เพราะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายและหลากหลายมากขึ้น การนำนาโนเทคโนโลยีไปใช้ประโยชน์เป็นการ บูรณาการศาสตร์หลากหลายแขนงเข้าด้วยกัน เช่น อิเล็กทรอนิกส์ วัสดุศาสตร์ และเทคโนโลยีชีวภาพ (วิวัฒน์, 2550) ซึ่งกำลังพัฒนาอยู่อย่างต่อเนื่องและนับวันจะเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้น ไม่ว่าผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดโรคภัยไข้เจ็บ ผลิตภัณฑ์ในการชะลอความแก่ เครื่องสำอาง คอมพิวเตอร์ นาโนไบโอเซ็นเซอร์ เส้นใยนาโน อนุภาคนาโน นาโนเทคโนโลยีเกี่ยวกับพลังงาน นาโนเทคโนโลยีเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม และนาโนเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับการเกษตรและอาหาร เป็นต้น

จากเหตุผลและความจำเป็นดังกล่าวทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะนำสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมาผสานกับองค์ความรู้ทางด้านนาโนวิทยาศาสตร์และนาโนเทคโนโลยี เพื่อนำอนุภาคขนาดนาโนเมตรมาใช้ในการควบคุมโรคพืช เพลี้ยกระโดดในนาข้าวและเพลี้ยแป้งของมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับต้น ๆ ของพืชเศรษฐกิจทั้งหลาย

วิธีการดำเนินการวิจัย

การสังเคราะห์ตัวรีดิวซ์

ชั่ง 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (1 mol) ใส่ลงในขวดก้นกลมละลายด้วยเมทานอล (methanolic solvent) เติมตัวเข้าทำปฏิกิริยา เช่น salicylic hydrazide (1 mol) ให้ความร้อน (40 °C) พร้อมกับปั่นกวนสารอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สารทั้ง 2 ทำปฏิกิริยากัน ทดสอบความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่น TLC ดีเวลลอป (develop) ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม สังเกตผลภายใต้แสง UV ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในเวลา 2 วัน

การสังเคราะห์อนุภาค

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยวิธีที่คล้ายคลึงกันคือนำสาร Schiff base ligands มาทำรีดิวซ์ Ag^{+} ใน เมทานอล (methanolic solvent) ด้วยอัตราส่วนโดยโมล 1:1 ปรับความเป็นกรด-เบสของสารละลายให้ได้ pH ~6 ปั่นกวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่ 60 °C ส่วนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองแดงดำเนินการเช่นเดียวกัน (Juneyoung, 2012)

การศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารที่สังเคราะห์ได้

นำสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดไปศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ในด้านต่าง ๆ เช่น สีของสารตัวอย่าง จุดหลอมเหลวและการดูดกลืนแสง

การทดสอบฤทธิ์การต้านเพลี้ยแป้งและเพลี้ยกระโดด

สำหรับเพลี้ยกระโดดได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ส่วนเพลี้ยแป้งได้จากแปลงทดลองของเกษตรกร นำสารตัวอย่างมาเตรียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 100 80 60 40 และ 20 ppm ตามลำดับ แล้วนำไปพ่นใส่เพลี้ยที่เก็บไว้ในกล่อง ซึ่งป้องกันการแพร่กระจายของเพลี้ยไปยังท้องถิ่นอื่น ๆ

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรคพืช

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราของสารตัวอย่าง โดยนำสารตัวอย่างทั้ง 6 ชนิด เตรียมความเข้มข้นระหว่าง 0.010 0.008 และ 0.006 โมลาร์ เพื่อนำไปทดสอบการต้านเชื้อราโดยเทคนิค paper disc diffusion method กับเชื้อรา 3 ชนิด คือ *A. niger*, *C.*

circinans และ *S. sclerotiorum* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง วัดเคลียโซน (clear zone)

การวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ปิเปต 1 ml ของสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น ใส่ในขวด 3 ใบ เพื่อทำการทดสอบ 3 ครั้ง ปิเปตสารละลาย DPPH radical ในเมทานอล 2 ml ใส่ขวดสีชาในแต่ละความเข้มข้น เขย่าให้สารเข้าด้วยกัน นำขวดทั้ง 22 ใบ เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 nm ปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.000 โดยวัดจากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง คำนวณหาค่า % Radical scavenging (Sharma et al., 2007)

$$\% \text{ radical scavenging} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100$$

การวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ปิเปตสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นต่าง ๆ และสารละลายมาตรฐานปริมาตร 150 µl ใส่ในขวดสีชาที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้น แล้วเตรียมสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm นำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Iron(II)sulfate solution กับค่าการดูดกลืนแสง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells) โดยเติม Vero cells 45 µl (3.3×10^4 cells/ml) ลงในแต่ละหลุมของ 384-well plates ที่มีสารตัวอย่างอยู่ 5 µl เจือจางด้วย DMSO 0.5 % แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C มี CO_2 5 % เป็นเวลา 4 วัน แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนต์ (excitation ที่ 485 nm และ emission ที่ 535 nm) สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการตอบสนองของเซลล์เพื่อหา IC_{50}

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ของสารตัวอย่าง

จากตารางที่ 1 พบว่า สังเคราะห์สารที่เป็นลิแกนด์ทั้งหมดได้โดยนำ 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) เป็นสารกลุ่มไดคีโตนมาควบแน่นกับเอมีน ได้แก่ salicylic hydrazide และ isoniazid (isonicotinyl hydrazine, INH) ได้สารอินทรีย์หรือลิแกนด์ (ligand; schiff base) 2 ชนิด กำหนดเป็น L1 (NTN-Sal) และ L2 (NTN-INH) โดยสาร L1 มีจุดหลอมเหลวที่ 136 °C เป็นผลึกสีส้มแกมน้ำตาล สาร L2 มีจุดหลอมเหลวที่ 209 °C เป็นผลึกสีน้ำตาล เมื่อนำสารที่เป็นนาโนอินทรีย์หรือลิแกนด์ทั้ง 2 ชนิด ไปรีดิวซ์กับเกลือของโลหะ คือ ซิลเวอร์ไนเตรตและคอปเปอร์คลอไรด์ ได้สารโลหะอินทรีย์ 4 ชนิด คือ สาร C1 C2 C3 และ C4 โดยสาร C1 เป็นผงสีส้มแกมน้ำตาล จุดหลอมเหลวที่ 175 °C สาร C2 เป็นผงสีดำ มีจุดหลอมเหลวที่ 195.4 °C สาร C3 เป็นผงสีดำ มีจุดหลอมเหลวที่ 153.3 °C และสาร C4 เป็นผงสีดำ มีจุดหลอมเหลวที่ 155.9 °C เมื่อวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง laser scattering size distribution analyzer พบว่า ขนาดของอนุภาคที่ได้มีค่าเฉลี่ยเป็นดังนี้ สาร L1 158.94 สาร L2 174.52 สาร C1 119.70 สาร C2 78.60 สาร C3 67.00 และ สาร C4 226.79 nm ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพของสารตัวอย่าง

ชื่อสาร	รหัส	จุดหลอมเหลว (^{o}C)	λ_{max} (nm)	% yield	สีของสารตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคของสารตัวอย่าง (nm)
1. NTN-Sal	L1	136.0	379	93.4	สีส้มแกมน้ำตาล	158.94
2. NTN-INH	L2	209.0	480	75.7	สีน้ำตาล	174.52
3. NTN-Sal-Ag	C1	175.0	444	89.7	สีส้มแกมน้ำตาล	119.70
4. NTN-Sal-Cu	C2	195.4	440	76.9	สีดำ	78.60
5. NTN-INH-Ag	C3	153.3	390	75.3	สีดำ	67.00
6. NTN-INH-Cu	C4	155.9	418	69.4	สีดำ	226.79

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านเพลี้ยแป้งของสารตัวอย่าง

การออกฤทธิ์ต่อเพลี้ยแป้ง พบว่า สารตัวอย่างออกฤทธิ์แบบ concentration dependence หมายถึงสารที่มีความเข้มข้นมากจะกำจัดเพลี้ยแป้งได้มากและสารที่มีความเข้มข้นน้อยจะทำกำจัดได้น้อย และสารแต่ละชนิดจะออกฤทธิ์ต้านเพลี้ยแป้งได้ในเวลาที่แตกต่าง (time dependence) อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดเพลี้ยแป้ง พบว่า สาร C4 สามารถต้านเพลี้ยแป้งได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 0.010 โมลาร์ และสามารถกำจัดได้ 100 % ในเวลา 10 นาที

ผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดเพลี้ยกระโดดของสารตัวอย่าง

ผลการทดสอบ พบว่า สารตัวอย่างทั้ง 6 ชนิด สามารถกำจัดเพลี้ยกระโดดได้ทั้งหมดในเวลา 10 นาที นอกจากนี้ยังพบว่า สารแต่ละชนิดเมื่อมีความเข้มข้นมากจะใช้เวลาในการกำจัดเพลี้ยกระโดดน้อยและสารที่มีความเข้มข้นน้อยจะใช้เวลาในการกำจัดเพลี้ยกระโดดนานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทั้ง 6 ชนิด พบว่า สารตัวอย่าง C4 สามารถกำจัดเพลี้ยกระโดดได้ดีที่สุด และสาร C4 ยังสามารถกำจัดเพลี้ยกระโดดได้ 100 % ในเวลาเพียง 2 นาที ที่ระดับความเข้มข้น 0.010 โมลาร์ เท่านั้น

ผลการทดสอบความสามารถการต้านเชื้อรา

เมื่อนำสารตัวอย่างไปทดสอบการต้านเชื้อราโรคพืชโดยเทคนิค Paper disc diffusion method กับเชื้อรา 3 ชนิด คือ *A. niger*, *C. circinans* และ *S. sclerotiorum* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง วัดเคลียโซนได้ผลดังตารางที่ 2

สารตัวอย่างที่สามารถต้านชื้อรา *S. sclerotiorum* ได้ดี คือสาร C2 และ C4 ส่วนสารที่สามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* ได้ดีที่สุดคือสาร C4

ตารางที่ 2 ความสามารถในการต้านเชื้อราโรคพืชของสารตัวอย่าง

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (Molar)	เคลียโซนเฉลี่ย		
		A. niger	*C. circinans*	*S. sclerotiorum*
L1	Control	-	-	-
	0.006	8	-	7
	0.008	8	8	8
	0.010	11	10	10

หมายเหตุ: control ใช้เมทานอล

ตารางที่ 2 ความสามารถในการต้านเชื้อราโรคพืชของสารตัวอย่าง (ต่อ)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (Molar)	ขนาดเคลียโซนเฉลี่ย (mm)		
		A. niger	*C. circinans*	*S. sclerotiorum*
L2	Control	-	-	-
	0.006	8	-	7
	0.008	9	-	8
	0.010	11	-	9
C1	Control	-	-	-
	0.006	10	7	8
	0.008	12	8	9
	0.010	14	13	14
C2	Control	-	-	-
	0.006	-	7	8
	0.008	8	12	14
	0.010	15	20	17
C3	Control	-	-	-
	0.006	8	8	7
	0.008	10	10	8
	0.010	14	12	9
C4	Control	-	-	-
	0.006	17	15	11
	0.008	22	17	16
	0.010	23	18	17

หมายเหตุ: control ใช้เมทานอล

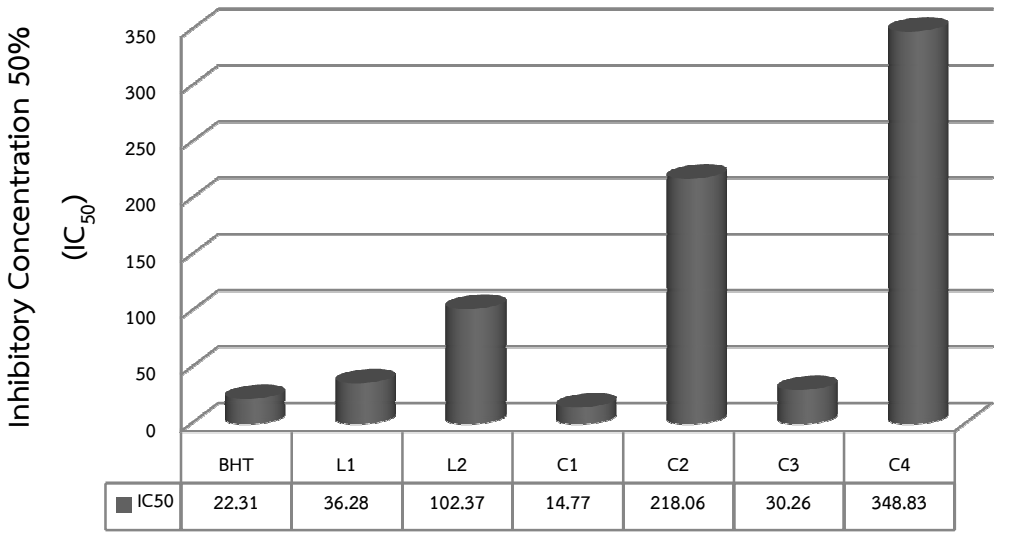
ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

เมื่อนำสารตัวอย่างมาเตรียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ได้ผลดังตารางที่ 3

พบว่า สารตัวอย่างทั้ง 6 ชนิด สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ppm ตามลำดับ และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง เมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพิ่มขึ้นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มมากขึ้น โดยสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุดคือ C3 และ C1 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ BHT และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระในรูปของ IC_{50} จะเห็นผลได้ชัดเจนดังรูปที่ 1

ตารางที่ 3 ผลต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างด้วยเทคนิค DPPH

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm			$\bar{x}$±SD	Radical scavenging activity (%)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
L1	20	0.214	0.209	0.212	0.211±0.003	46.414
	40	0.195	0.201	0.197	0.197±0.003	50.042
	60	0.169	0.171	0.175	0.171±0.003	56.540
	80	0.158	0.153	0.155	0.155±0.003	60.675
	100	0.129	0.133	0.132	0.131±0.002	66.751
L2	20	0.102	0.104	0.102	0.103±0.001	24.274
	40	0.107	0.108	0.103	0.106±0.003	32.650
	60	0.116	0.128	0.122	0.122±0.006	37.436
	80	0.134	0.125	0.135	0.131±0.006	45.641
	100	0.160	0.140	0.143	0.148±0.011	47.350
C1	20	0.308	0.297	0.302	0.302±0.006	49.188
	40	0.241	0.242	0.245	0.242±0.002	59.216
	60	0.202	0.213	0.198	0.204±0.008	65.658
	80	0.172	0.177	0.181	0.176±0.005	70.308
	100	0.152	0.158	0.158	0.156±0.003	73.782
C2	20	0.488	0.494	0.500	0.494±0.006	33.423
	40	0.453	0.475	0.478	0.469±0.014	36.837
	60	0.466	0.466	0.465	0.466±0.001	37.241
	80	0.456	0.463	0.470	0.463±0.007	37.601
	100	0.442	0.448	0.421	0.437±0.014	41.105
C3	20	0.900	0.885	0.891	0.892±0.008	44.075
	40	0.643	0.666	0.691	0.667±0.024	58.202
	60	0.595	0.552	0.579	0.575±0.022	63.928
	80	0.431	0.404	0.416	0.417±0.014	73.855
	100	0.153	0.167	0.144	0.155±0.012	90.303
C4	20	0.672	0.695	0.709	0.692±0.019	6.738
	40	0.695	0.674	0.691	0.687±0.011	7.457
	60	0.693	0.679	0.680	0.684±0.008	7.816
	80	0.656	0.655	0.649	0.653±0.004	11.949
	100	0.504	0.672	0.645	0.607±0.090	18.1941

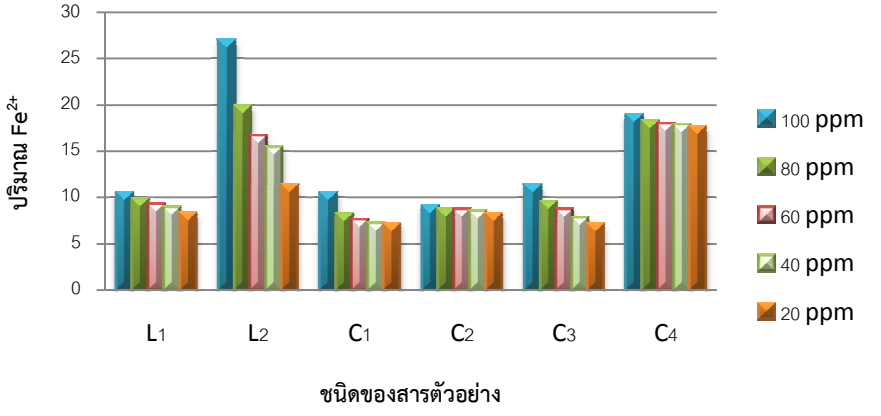


รูปที่ 1 กราฟเปรียบเทียบระหว่างค่า IC_{50} ของสารตัวอย่าง

จากรูปที่ 1 พบว่า สารที่มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT คือ L1 C1 และ C3 โดยเฉพาะ C1 มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน แสดงว่าสาร C1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสารมาตรฐาน

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP เป็นวิธีวัดความสามารถของสารในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการวัดประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สาร ferric ion (Fe^{3+}) ให้เป็นสาร ferrous ion (Fe^{2+}) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm เทียบกับสารละลายมาตรฐาน iron (II) sulphate ได้ผลดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณ Fe^{2+} สำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

จากรูปพบว่า สารตัวอย่างทุกชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและออกฤทธิ์แบบ concentration dependence และมีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สาร ferric ion (Fe^{3+}) ให้เป็นสาร ferrous (Fe^{2+}) ได้แตกต่างกัน โดยสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ ลิแกนด์ L2 (NTN-INH หรือ Lawsone-INH)

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

จากผลการทดลองพบว่า สารตัวอย่างที่นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติจะมีค่าเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต (% survival) มากกว่า 50 เช่น NTN-Sal และ NTN-INH และ 2) กลุ่มที่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติจะมีค่าเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต น้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ได้แก่ NTN-Sal-Ag และ NTN-INH-Ag

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งลิแกนด์และสารนาโนโลหะอินทรีย์ พบว่า ได้ผลผลิตในเปอร์เซ็นต์สูง และอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นผลึก (crystal) มีลักษณะรูปร่างแตกต่างกัน โดยสาร L1 L2 และ C4 มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม และสาร C1 C2 และ C3 มีลักษณะรูปร่างเป็นรูปเข็ม ขนาดของอนุภาคอยู่ระหว่าง 150 ถึง 226 nm โดยถ้าใช้ตัวรีดิวซ์ที่แรงจะได้ขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็ก แต่ถ้าตัวรีดิวซ์ที่อ่อนขนาดอนุภาคจะมีขนาดใหญ่ (Leonard et al., 2011) จุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 136 ถึง 209 °C ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) อยู่ระหว่าง 379-480 nm ซึ่งแตกต่างจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุมูลอิสระมาตรฐาน DPPH (λ_{max} 520 nm) สารตัวอย่างที่ได้จึงสามารถทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH method ได้

ผลการต้านเพลี้ยแป้ง พบว่า สารนาโนอินทรีย์สามารถออกฤทธิ์ต้านเพลี้ยแป้งได้ทันทีที่อนุภาคตกถึงตัวเพลี้ยแป้ง โดยแป้งที่อยู่ตามตัวเพลี้ยแป้งจะหลุดออก เพลี้ยแป้งหดตัวและตายทันที นอกจากนี้ยังพบว่าสารนาโนทองแดงมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารนาโนเงินและสารนาโน อนินทรีย์จะออกฤทธิ์ต้านเพลี้ยแป้งได้ดีกว่าสารนาโนอินทรีย์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ผลการต้านเพลี้ยกระโดด พบว่า อนุภาคของนาโนทองแดงที่มีตัวรีดิวซ์เป็น Lawsone isonicotinyl hydrazone (หรือสาร C4) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเพลี้ยกระโดดรองลงมาคือ อนุภาคของนาโนทองแดงที่มีตัวรีดิวซ์เป็น Lawsone salicylic hydrazone (หรือสาร C2) โดยอนุภาคทองแดงจะออกฤทธิ์ต่อเพลี้ยกระโดดได้ดีกว่าอนุภาคของเงิน

การต้านเชื้อราก่อโรคพืช พบว่า สาร C2 และ C4 สามารถต้านเชื้อรา *S. sclerotiorum* ได้ดี นอกจากนี้ C4 ยังออกฤทธิ์ต้าน *A. niger* ได้ดีอีกด้วย ซึ่งการออกฤธิ์ของอนุภาคนี้ขึ้นอยู่กับ ทั้งไอออนบวกและไอออนลบ (Jo et al., 2009) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของอนุภาคนาโน คือเข้าขัดขวางการทำงานของ DNA (Manash et al., 2011) ขัดขวางการสร้างโคโลนี (Young-Ki et al., 2009) นอกจากนี้อนุภาคนาโนยังเข้ารบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกระบวนการหายใจ (respiratory enzymes) โดยเข้าไปสร้างพันธะกับหมู่ไทออล (thiol group) (Rai et al., 2009) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) โดยอนุภาคของเงินจะเข้าไปรบกวนทั้งผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และเอนไซม์ดังกล่าว จึงส่งผลให้เซลล์ตายไปในที่สุด

เทคนิค DPPH method แสดงให้เห็นว่าอนุภาค C3 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดรองลงมาได้แก่ C1 จึงกล่าวได้ว่าอนุภาคของเงิน นาโนมีประสิทธิภาพสูงกว่าลิแกนด์และสูงกว่าอนุภาคทองแดงนาโนตามลำดับ ส่วนผลการต้านอนุมูลเทคนิค FRAP พบว่า อนุภาค L2 มีประสิทธิภาพ

ในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้สูงสุด รองลงมาคือ C4 ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ของสารที่สังเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และ เทคนิค FRAP ที่มีความสัมพันธ์กันน้อย ทั้งนี้เป็นเพราะว่า สารที่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีอาจจะแสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนไม่ดี (โอภา, 2550) นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายและขนาดของโมเลกุลของสารที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (มัณฑนา, 2552) ดังนั้น การที่ลิแกนด์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ได้ดีเพราะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีและโมเลกุลไม่เกะกะ (steric effect) จึงเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ดี แต่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้น้อยในเทคนิค FRAP

ผลการต้านเพลี้ยแป้งและเพลี้ยกระโดดที่ได้จากการวิจัยได้ถ่ายทอดให้กับกลุ่มเกษตรกรที่ปลูกมันสำปะหลังและปลูกข้าวของจังหวัดบุรีรัมย์ เพื่อลดการใช้ยากำจัดศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรงและตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยเรื่องการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนาโนอินทรีย์ นาโนโลหะอินทรีย์ต้านเพลี้ยแป้งและเพลี้ยกระโดดได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเครือข่ายอุดมศึกษาภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ประสาท สืบค้า ประธานเครือข่ายอุดมศึกษาภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างอย่างสูง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รองศาสตราจารย์โกวิท เชื่อมกลาง อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมเกียรติ กัลยพฤกษ์ รองอธิการบดี ฝ่ายวิจัยและประกันคุณภาพการศึกษา อาจารย์พิสมัย ประชานันท์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัย นางสาวสุรีพร ดัดถุยาวัตร ที่ช่วยเหลือและร่วมมือกับนักวิจัยในขั้นตอนต่าง ๆ ทั้งการสังเคราะห์ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและร่วมจัดเวทีถ่ายทอดสู่ชุมชนจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงอย่างดี

บรรณานุกรม

จิระเดช แจ่มสว่าง. (2550). การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี บนเส้นทางของการเกษตรยุคใหม่. กรุงเทพฯ: สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย.

มัณฑนา ภาณุมาภรณ์. (2552). เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร.

เยาวพา สุวัตถิ. (2553). การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมโรคพืช. กรุงเทพฯ: วิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ.

วิวัฒน์ ตัณฑะพานิชกุล. (2550). นาโนเทคโนโลยีกับเทคโนโลยีอนุภาคใครยิ่งใหญ่กว่า. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีระชัย วีระเมธีกุล. (2553, 21 มิถุนายน). “วท.รุกเพิ่มมูลค่าภาคอาหารเกษตร,” หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ. 15.

สภาที่ปรึกษาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. (2556). สรุปภาวะเศรษฐกิจรอบไตรมาสที่ 1 ของปี 2555. แหล่งข้อมูล: www.nesac.go.th/office/upload/modDocument/file_13-tn-13-12288266581768.pdf สืบค้นเมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2553.

โอภา วัชระคุปต์. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ Radical scavenging agents. กรุงเทพ: นิวไทยมิตรการพิมพ์.

Manash R. D., Rupak K. S., Rarul S., Vinayak S. K., Manjuahs V. S. and Pinaki S. (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.

Young-Ki Jo, Byung H. Kim and Geunhwa Jung. (2009). Antifungal activity of silver ions and

nanoparticles on phytopathogenic fungi. Plant Diseases. 93: 1037-1043.

Juneyoung Lee, Keuk-Jun Kim, Woo Sang Sung, Jong Guk Kim and Dong Gun Lee. (2012). The Silver Nanoparticle (Nano-Ag): a New Model for Antifungal Agents. แหล่งข้อมูล: www.Google.com สืบค้นเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2555.

Leonard K., Ahmmad B., Okamura H. and Kurawaki J. (2011). Insitu green synthesis of biocompatible ginseng capped gold nanoparticles with remarkable stability. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 82: 391-396.

Rai M., Yadav A. and Gade A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances. 27: 76-83.

Sharma N. K., Dey S. and Prasad R. (2007). Phamacol online. 1: 91-98.