



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การศึกษากลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันในไบโอดีเซล

EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON THE OXIDATIVE STABILITY OF
BIODIESEL

โดย

อุทุมพร กันแก้ว

2553



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันในไบโอดีเซล
EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON THE OXIDATIVE STABILITY OF
BIODIESEL

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2552

จำนวน 100,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

อุทุมพร กันแก้ว

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30/ก.พ./2553

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ท่านอุดหนุนการวิจัย จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร
ปีงบประมาณ 2551 ที่ให้การสนับสนุนทางด้านทุนการทำวิจัย ทำให้รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง
ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์บัณฑิตเคมี ที่ให้ทุนสนับสนุน และ
ให้ความอนุเคราะห์ในด้านต่างๆตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากร คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์บัณฑิตเคมี มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อำนวยความสะดวกทางด้าน เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งช่วยประสานงานใน
ด้านเอกสารราชการในการติดต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการทำวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมือวิเคราะห์และอุปกรณ์สำหรับกร
วิเคราะห์ในด้านการดำนอนุผลอิสระ

อุทุมพร กันแก้ว



การศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันในไบโอดีเซล

EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON THE OXIDATIVE STABILITY OF BIODIESEL

อุทุมพร กันแก้ว

UTHUMPORN KANKEAW

คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์บัณฑิตเคมี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

บทคัดย่อ

ไฮโดรควิโนนเป็นสารอะโรมาติกที่ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนโดยใช้อัลดีไฮด์ชนิดต่างๆโดยสังเคราะห์ผ่าน ปฏิกิริยาอัลดอล คอนเดนเซชันระหว่าง 1,4-cyclohexanedione กับอนุพันธ์ของอัลดีไฮด์ 5 ชนิด ได้แก่ 2,3,4-ไตรไฮดรอกซีเบนซัลดีไฮด์ 3-ไนโตรเบนซัลดีไฮด์ 3,4-ไดไฮดรอกซีเบนซัลดีไฮด์ 2,4 ไดไฮดรอกซีเบนซัลดีไฮด์ และ 3,5-เมทอกซี-4-ไดไฮดรอกซีเบนซัลดีไฮด์ โดยมีลิเทียมคลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีไพริดีนเป็นตัวทำละลาย นำสารที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจสอบเชิงคุณภาพวิเคราะห์โดยวิธี DPPH radical scavenging assay จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารเคราะห์ทั้ง 5 ชนิดแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี Spectrophotometric Assay และคำนวณค่า IC_{50} พบว่า สารสังเคราะห์ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.11 mg/ml ซึ่งได้ผลดีกว่า BHT ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ

Abstract

Hydroquinone (HQ) is an antioxidant and this study was to synthesis hydroquinone derivatives *via* aldol condensation between 1,4-cyclohexanedione and varieties of aldehydes (2,4-dihydroxybenzaldehyde, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde, 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde and 3-nitrobenzaldehyde) in the presence of lithium chloride as a catalyst in pyridine solvent. The synthesized products were explored for the structure and antioxidant activity relationship using DPPH radical scavenging assay results pointed out that all synthesized hydroquinones exhibited high scavenging activity against DPPH radical. Then the synthesized products were explored by using Spectrophotometric Assay method and found that the 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone was exhibited the

highest scavenging activity against DPPH radical with IC_{50} 0.11 mg/ml which higher than standard BHT



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ช
สารบัญคำย่อและสัญลักษณ์	ฎ
บทที่	
1 คำนำ	1
1.1 ไฮโดรควิโนน	3
1.1.1 คุณสมบัติของสารไฮโดรควิโนน	3
1.1.2 ความคงตัวและการเกิดปฏิกิริยา (Stability and Reaction)	4
1.1.3 อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน	4
1.2 อนุมูลอิสระ	5
1.2.1 ชนิดของอนุมูลอิสระ	7
1.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	8
1.3.1 สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ : ฟลาโวนอยด์ (flavonoid)	8
1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	8
1.4.1 เป็นสารคีเลต (chelating agent)	9
1.4.2 เป็นสารต้านออกซิเดชัน	9
1.4.3 ทำหน้าที่ Regenerate	9
1.5 โครงสร้างพื้นฐานที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	9
1.5.1 โครงสร้าง catechol หรือ ortho – diphenolic group ในวง B	9
1.5.2 พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2-3 คอนจูเกต (conjugate) กับหมู่ 4 - Oxo ในวง C	10
1.5.3 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และฟลาโวนอลมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 5	10

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
1.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน	10
1.6.1 การทดสอบฤทธิ์ที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี thiobarbituric reactive substances	10
1.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี ferrous oxidation-xylenol orange	10
1.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี antilipid peroxidation	10
1.6.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay	11
1.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
1.8 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	13
2.วิธีการทดลอง	14
2.1 สารเคมี	14
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	15
2.3 วิธีการทดลอง	16
2.3.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน	16
2.3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน	16
2.3.3 การสกัดสารสังเคราะห์	16
2.3.4 การแยกสารบริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี	17
2.3.5 การวิเคราะห์โดยเทคนิค FT – IR Spectroscopy	18
2.3.6 การวิเคราะห์โดยเทคนิค ^1H – NMR Spectroscopy	18
2.3.7 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย เทคนิค DPPH radical scavenging assay	18
2.3.8 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย เทคนิค spectrophotometric assay	19
3.ผลการทดลอง	20
3.1 ผลของตัวทำละลายที่มีต่อการสังเคราะห์ 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone	20
3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 ผลการศึกษาเอกลักษณ์ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนด้วยเทคนิค furrier transform infrared spectroscopy และเทคนิค $^1\text{H-NMR}$	23
3.3 การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay	34
3.4 วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี spectrophotometric assay	36
4.สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	46
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก	51
ภาคผนวก ก	51
ภาคผนวก ข	52
ภาคผนวก ค	54
ภาคผนวก ง	55



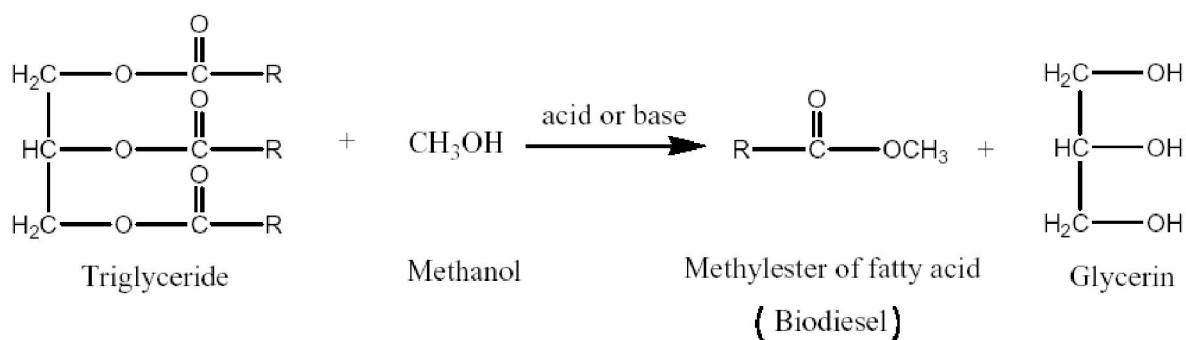
คำนำ

เมื่อเกิดวิกฤตพลังงาน การมองหาพลังงานทดแทนเป็นทางเลือกใหม่ของการแก้ปัญหาของเชื้อเพลิง เช่นน้ำมันที่จะหมดลงเรื่อยๆในปัจจุบัน พลังงานชนิดใหม่ที่นำมาใช้ในเครื่องยนต์ปัจจุบัน ได้แก่ แก๊สโซฮอล์ แก๊สเอ็นจีวี และที่นิยมใช้ในปัจจุบันอีกชนิดหนึ่ง คือ ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเป็นที่รู้จักมานานแล้วในสมัยสงครามโลกครั้งที่2 อาฟริกาได้นำน้ำมันพืชมาเคลือบเครื่องยนต์ แต่ในช่วงนั้นน้ำมันปิโตรเลียมยังหาง่าย และราคาถูก จึงไม่ได้รับความสนใจ จนใน

ปี 2513 เกิดวิกฤตการณ์น้ำมันหลายหน่วยงานในภาครัฐรวมทั้งสถาบันต่างๆของกลุ่มประเทศผู้ใช้น้ำมันจึงได้ทำการวิจัย และพัฒนาเชื้อเพลิงชนิดนี้ จนกระทั่งสามารถผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ การใช้ไบโอดีเซลสามารถใช้ได้ในหลายรูปแบบ เช่นใช้ไบโอดีเซลบริสุทธิ์ 100% (B100) หรือในมาผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่างๆ เช่น 10% (B10), 20% (B20) ตามความเหมาะสมในการใช้งานอย่างแพร่หลาย ส่วนในประเทศไทยใช้ผสมในอัตราส่วน 5 % ซึ่งสามารถใช้กับรถโดยไม่ต้องปรับแต่งเครื่องยนต์

ไบโอดีเซล คือ เชื้อเพลิงเหลวที่ได้จากการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ หรือแม้แต่ไขมันที่เหลือจากการทอดอาหารมาผ่านกระบวนการทางเคมี (transesterification) โดยในกระบวนการผลิตนั้นจะผสมน้ำมันพืชหรือ น้ำมันสัตว์กับ แอลกอฮอล์ ทำปฏิกิริยากันจนได้เชื้อเพลิง ดังสมการ เพื่อใช้กับเครื่องยนต์ดีเซล



น้ำมันพืชที่นำมาศึกษามีมากมายหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม ตลอดจนน้ำมันที่เหลือจากการทอด ส่วนแอลกอฮอล์ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาการผลิตสามารถใช้ได้ทั้งเมทานอล และ เอทานอล แต่อย่างไรก็ตามการทำปฏิกิริยาต้องใช้เวลา

ปฏิกิริยาพวก กรด หรือเบส ปัจจุบันโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเบสที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากมีราคาถูก การศึกษาถึงปฏิกิริยา และการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซลจึงมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากไบโอดีเซล มีคุณสมบัติที่เหมือนกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด แต่ให้การเผาไหม้ที่สะอาดกว่า ไอลีมีคุณภาพดีกว่าเพราะออกซิเจนให้การสันดาปที่สมบูรณ์กว่า น้ำมันดีเซล จึงทำให้เกิดคาร์บอนมอนนอกไซด์ น้อย และในไบโอดีเซลไม่มีกำมะถัน จึงไม่มีปัญหาระง่อนซ่น นอกจากนี้น้ำมันยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย จึงไม่ทำให้เกิดการอุดตันของระบบไอลี แอมยังช่วยยืดอายุการทำงานของเครื่องยนต์ได้อีกด้วย

องค์ประกอบของน้ำมันพืชที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลประกอบไปด้วยไตรกลีเซอไรด์ที่มีคาร์บอนเป็นสายยาว แบบไม่อิ่มตัวทำให้ง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ อากาศ น้ำ และแสงแดดมากกว่าสายโซ่คาร์บอนที่อิ่มตัว เมื่อเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้คุณสมบัติของไบโอดีเซลเปลี่ยนไป ดังนั้นจึงมีการทดลองและวิเคราะห์เกี่ยวกับการป้องกันการเกิดออกซิเดชันในไบโอดีเซล

การทดสอบสภาวะต่างๆที่มีต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิสูง หรือออกซิเจนมีผลต่อค่าความเป็นกรดในไบโอดีเซล และการศึกษาผลกระทบของปฏิกิริยาออกซิเดชันของไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองมีผลต่อค่าความเป็นกรด และความหนืด ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพของเครื่องยนต์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันในไบโอดีเซล เช่นการใช้ *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), butylated hydroxytoluene (BHA) และ propyl gallate (PrG) เป็นต้น ซึ่งผลการทดลองสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไบโอดีเซลได้

ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันในไบโอดีเซลเพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเกิดจาก แสง ออกซิเจน และอุณหภูมิ เพื่อยืดระยะเวลาในการเก็บน้ำมัน และสภาวะเสี่ยงต่างๆโดยเน้นใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ได้ง่าย และราคาไม่แพง และทดลองกับไบโอดีเซลที่ใช้น้ำมันพืชหลายชนิด เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันละหุ่ง น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา

1.1 ไฮโดรควิโนน (hydroquinone)



รูป 1.1 สารไฮโดรควิโนน

ไฮโดรควิโนนเป็นสารฟีนอลชนิดหนึ่งที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็น hydroxyl groups สองกลุ่มเชื่อมต่อกับ benzene ring ในลักษณะการเชื่อมต่อเป็นแบบ para แสดงดังรูป 1.2



รูป 1.2 โครงสร้างไฮโดรควิโนน

1.1.1 คุณสมบัติของสารไฮโดรควิโนน

สูตรโมเลกุล	$C_6H_6O_2$
น้ำหนักโมเลกุล	110.12 กรัมต่อโมล
จุดเดือด	276.0 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	182.0 องศาเซลเซียส
ลักษณะ	ลักษณะผลึกรูปเข็มหรือลิ้ม
ความสามารถในการละลาย	ละลายในแอลกอฮอล์และตัวทำละลายที่มีขั้ว

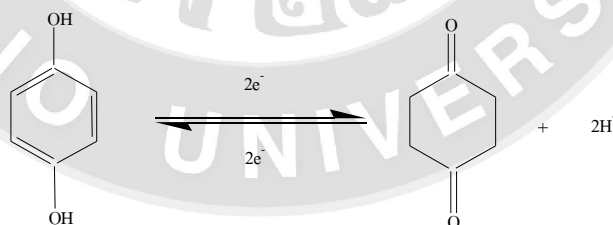
1.1.2 ความคงตัวและการเกิดปฏิกิริยา (stability and reaction)

ความคงตัว และการเกิดปฏิกิริยาแสดงในตาราง 1.1

ตาราง 1.1 ความคงตัวและการเกิดปฏิกิริยาของสารไฮโดรควิโนน

สภาวะ	การเกิดปฏิกิริยา
ความคงตัวทางเคมี	สารนี้ไวต่ออากาศ สารละลายของสารนี้จะกลายเป็นสีน้ำตาลในระหว่างที่เกิดการออกซิเดชันในอากาศ และจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในขณะที่มีด่าง
สารที่เข้ากันไม่ได้	เบสเข้มข้น, สารออกซิไดซ์รุนแรง
สภาวะที่ควรหลีกเลี่ยง	อากาศ, แสงสว่าง, ประจุไฟฟ้า, อุณหภูมิที่มากกว่า 165 องศาเซลเซียส
การกัดกร่อนโลหะ	กัดกร่อนทองแดงและทองเหลือง
อันตรายจากการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์	ไม่เกิดขึ้น

ถ้านำไฮโดรควิโนนมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชันจะได้ *p*-benzoquinone ซึ่งอาจทำได้โดยใช้ oxidizing agent อย่างอ่อน ปฏิกิริยาโดยรวมจะเป็นการดึงอิเล็กตรอนออก 2 ตัวและโปรตอนอีก 2 ตัวออกจากไฮโดรควิโนน ดังรูป 1.3

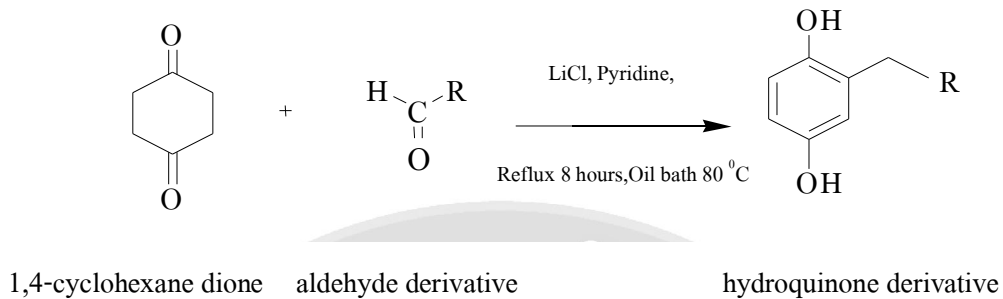


รูป 1.3 แสดงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรควิโนน

1.1.3 อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาอัลดอลคอนเดนเซชันระหว่าง 1,4-cyclohexanedione และอนุพันธ์อัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ ซึ่งปฏิกิริยาอัลดอลคอนเดนเซชันเป็น

ปฏิกิริยาคอนเดนเซชันในตัวเอง (self condensation) ของอัลดีไฮด์หรือคีโตน โดยมีกรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังแสดงในรูป 1.4



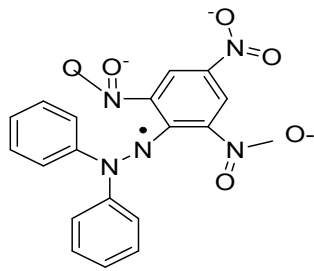
รูป 1.4 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

1.2 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมโมเลกุล หรือสารที่ไม่เสถียรเนื่องจากมีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง ซึ่งรวมไปถึงอิเล็กตรอนของทรานซิชั่นส่วนใหญ่ และอะตอมของไฮโดรเจน นอกจากนี้โมเลกุลของออกซิเจนก็จัดว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอน ซึ่งแต่ละอิเล็กตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล ทั้งนี้การหมุนรอบตัวเอง (spin) ของอิเล็กตรอนทั้งสองจะหมุนแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน

อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสถานะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า ($R^\cdot$) และในสถานะที่มีประจุไฟฟ้า ($R^{\cdot-}$, $R^{\cdot+}$) อนุมูลที่มีน้ำหนักต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากขาดอิเล็กตรอนและพยายามที่จะจับคู่อิเล็กตรอนกับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น โดยสารที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนไป จะเกิดความไม่เสถียรจึงต้องการอิเล็กตรอนเข้ามาเพิ่มเพื่อให้ตนเองเสถียร จึงต้องแย่งสารอื่นไปเป็นทอด ๆ

อย่างไรก็ตาม ยังมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร เช่น DPPH radical (1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl radical) รูปที่ 1.5 เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($\cdot OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^\cdot$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ส่วนอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวรองลงมา ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (NO) หรืออนุมูลไนตริกออกไซด์ ($\cdot NO$) อนุมูลวิตามินอีและอนุมูลวิตามินซี



รูป 1.5 โครงสร้างของ DPPH radical (1,1-diphenyl 2- picrylhydrazyl radical)

การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกแตกต่างกัน ดังนี้

A. การแตกพันธะของโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส (homolysis)



B. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลาง (ทางไฟฟ้า)



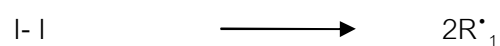
C. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลาง (ทางไฟฟ้า)



โดยหลักการทางเคมีอนุมูลอิสระเกิดได้โดย ปฏิกริยาพอลิเมอร์ไรเซชันแบบลูกโซ่เรดิคัล ซึ่งมีขั้นตอนการเกิด 3 ขั้นตอนดังนี้

A. ขั้นริเริ่ม (Initiation step) เป็นขั้นที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ และสามารถแบ่งได้อีก 2 ขั้นตอน คือ

- การสลายตัวของตัวริเริ่มปฏิกริยา (decomposition of Initiator)



เมื่อ I = ตัวริเริ่มปฏิกริยา, $R_1^\cdot$ = free radical

-การริเริ่ม (Actual initiation step)

B. ขั้นแผ่ขยาย (propagation step) เป็นขั้นที่มีการขยายออกของโมเลกุลพอลิเมอร์ โดยมีการเติมมอนอเมอร์เข้าไปที่ free radical มี 2 แบบ คือ

- แบบหัวต่อหาง (head to tail)
- แบบหัวต่อหัว (head to head)

ปฏิกิริยาการเติมมอนอเมอร์จะเกิดขึ้นเรื่อย ๆ จนเป็นพอลิเมอร์ยาวที่มีส่วนปลายเป็น free radical (head to head)

C. ขั้นสิ้นสุด (termination) เป็นการทำปฏิกิริยาของพอลิเมอร์ที่มีส่วนปลายเป็น free radical ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งต่อไปนี้

- การรวมตัว หรือการจับคู่ (combination or coupling) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากการรวมตัวกันเองของโมเลกุลที่มี free radical ปฏิกิริยาเลยสิ้นสุดลง
- การแยกส่วน (disproportionation) เป็นปฏิกิริยาที่มีการย้ายไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง ซึ่งจะได้พอลิเมอร์ 1 โมเลกุลที่มีพันธะคู่ตรงปลายโมเลกุล
- การย้ายสายโซ่ (chain transfer) เป็นปฏิกิริยาที่มีการเติมสารที่สามารถให้โปรตอน (Chain transfer agent) แก่พอลิเมอร์ที่มีส่วนปลายเป็น free radical ได้

เมื่อ TX = สารที่อะตอมของ X ว่างต่อปฏิกิริยา (active atom) ซึ่งอาจเป็นมอนอเมอร์ พอลิเมอร์ หรือ ตัวทำละลายก็ได้

1.2.1 ชนิดของอนุมูลอิสระ

สามารถแบ่งได้ ดังนี้

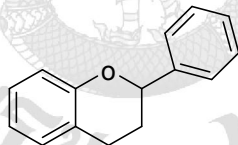
1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง
2. อนุมูลอิสระจากภายนอกในร่างกาย
3. การติดเชื้อ ทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส
4. การอักเสบโดยไม่ทราบสาเหตุ (autoimmune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ โรคเก๊าท์ เป็นต้น
5. รังสี
6. สิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และเขม่าจากเครื่องยนต์ คาร์บอนหรือ
7. การออกกำลังกายอย่างหักโหม

1.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

โรคหลายชนิดที่เกิดจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคในระบบหัวใจ หรือโรคมะเร็ง ซึ่งได้รับความสนใจในวงการแพทย์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นสารที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เพื่อสามารถนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ซึ่งมีการยืนยันว่าการบริโภคผักผลไม้ จะช่วยลดอัตราการเสี่ยง และเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ โดยจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) เคโรทีนอยด์ (carotenoids) รวมไปถึงสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก (polyphenolics) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) เป็นต้น

1.3.1 สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ : ฟลาโวนอยด์ (flavonoid)

สารฟลาโวนอยด์พบทั่วไปในพืชใบเขียว และพบในทุกส่วนของพืช ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสาระสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอลมีสูตรโครงสร้างเป็น 2-ฟีนิลเบนโซไพแรน (2-phenylbenzopyran) หรือ ฟลาเวน (flavan) ซึ่งโครงสร้างหลักที่ได้เหมือนโครงสร้างหลักของวิตามินอี ที่เป็นโครงสร้างแบบโครแมน (chroman) หรือ เบนโซไพแรน ดังรูป 1.6



รูป 1.6 โครงสร้างของฟลาเวน

1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

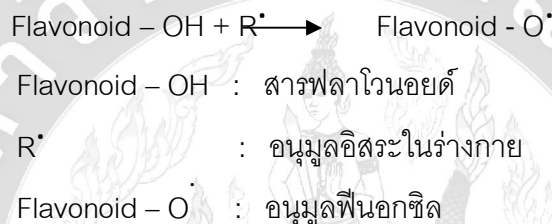
กลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์นั้น ได้มีการศึกษาค้นคว้าอย่างกว้างขวาง ทั้งฤทธิ์ในสารละลายน้ำ และฤทธิ์ในไขมัน ซึ่งกลไกหลักของสารออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้และรวมถึงโพลีฟีนอลอื่น ๆ มีกลไกดังนี้

1.4.1 เป็นสารคีเลต (chelating agent)

เป็นโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างเป็นออร์โธไดไฮดรอกซีฟีนอลิก ทำหน้าที่จับพันธะโคออร์ดิเนตกับโลหะหนัก โดยมีบทบาทในการกระตุ้นปฏิกิริยาถูกใช้ของอนุมูลอิสระ

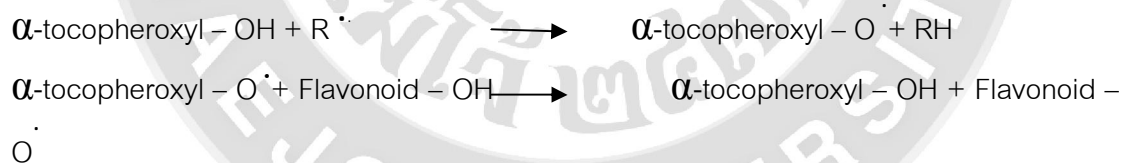
1.4.2 เป็นสารต้านออกซิเดชัน

โดยการหยุดปฏิกิริยาถูกใช้ (chain breaking antioxidant) ในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น lipid alkoxyl และ peroxy radical เป็นต้น โดยเป็นตัวทำให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น โดยจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลฟลาโวนอยด์ฟีนอกซิล ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรมากกว่าเนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ มีการ Delocalize ของอิเล็กตรอนตลอดเวลา ดังปฏิกิริยา



1.4.3 ทำหน้าที่ Regenerate

วิตามินอี (α-Tocopherol) โดยจะรีดิวซ์อนุมูล α-Tocopheroxyl กลายเป็น α-Tocopherol เหมือนเดิมทำให้สามารถทำหน้าที่เป็น antioxidant ได้ต่อไป ดังสมการ



1.5 โครงสร้างพื้นฐานที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ลักษณะโครงสร้างที่จำเป็นพื้นฐาน สำหรับการออกฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถสรุปได้ 3 ตำแหน่ง

1.5.1 โครงสร้าง catechol หรือ ortho – diphenolic group ในวง B

เป็นโครงสร้างที่สำคัญที่สุดสำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็น hydrogen donating และสามารถจับ หรือคีเลตโลหะหนักโดยเฉพาะทองแดง (CU) และเหล็ก (Fe) ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกาย

1.5.2 พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2-3 คอนจูเกต (conjugate) กับหมู่ 4 - Oxo ในวง C

ซึ่งจะเพิ่มความเสถียรของอนุมูล Flavonoid phenoxyl

1.5.3 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และฟลาโวนอลมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 5

ซึ่งทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล โครงสร้างจะมีลักษณะแบนราบ ในระนาบเดียวกัน ส่งผลให้การ delocalization ของอิเล็กตรอนผ่านพันธะคู่

1.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ของสารในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถตรวจสอบได้โดยการติดตามปริมาณผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ lipid hydroperoxides เช่น สารประกอบแอลดีไฮด์ เป็นต้น หรือ ทดสอบโดยตรงว่าสารตัวอย่างนั้นๆ สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้หรือไม่ ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้

1.6.1 การทดสอบฤทธิ์ที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี thiobarbituric reactive substances (TBARS) (Fauconneau et al., 1997)

วิธีนี้เป็นการติดตามปริมาณสารประกอบอัลดีไฮด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ low density lipoprotein (LDL) กับโลหะไอออน เช่น Fe^{2+} Cu^{2+} โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

1.6.2 การทดสอบฤทธิ์ที่ต้านปฏิกิริยาต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี ferrous oxidation-xylenol orange (FOX)(Jaffar et al., 1994)

เป็นวิธีที่วัดปริมาณ hydroxy peroxides ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ low density lipoprotein ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาด้วยโลหะไอออนโดยการเปลี่ยน hydrogen peroxide ให้เป็นสารประกอบที่มีสีด้วยการทำปฏิกิริยากับ xylenol orange [o-cresolsulfonphthalein -3,3-bis (methyliminodiacetic acid) sodium salt] สารประกอบที่เกิดขึ้นมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

1.6.3 การทดสอบฤทธิ์ที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี antilipid peroxidation (Tamura et al., 1990)

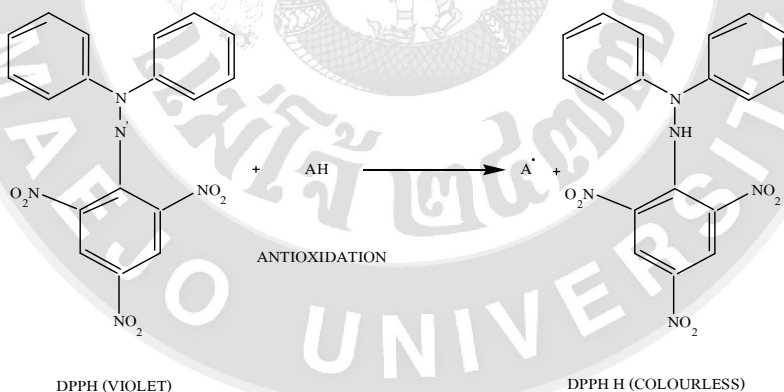
เป็นวิธีการวัดการเกิด lipid peroxidation ในไมโครโซมของหนูโดยเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาด้วยวิธีการเติม nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธี TBARS ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

1.6.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Yamasaki et al., 1994)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสาร DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง เมื่อ DPPH ได้รับ

อิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจน จะเปลี่ยนเป็น DPPH : H ติดตามผลการทดลองโดยวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

รูป 1.7 โครงสร้างของ DPPH radical (1,1-diphenyl 2- picrylhydrazyl radical)

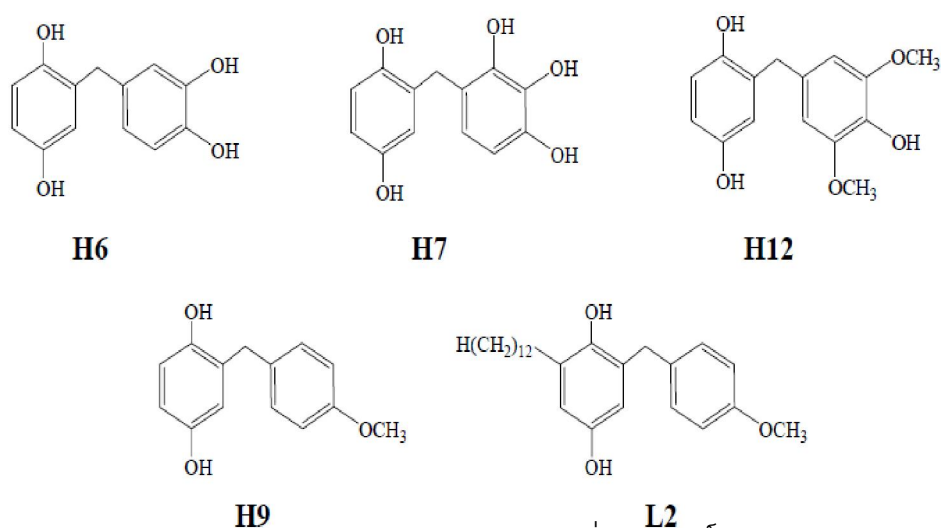


รูป 1.8 ปฏิกริยาต้านอนุมูลอิสระของสารกับ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

1.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สลิลทิพย์ และ วรินทร์ (2548) ได้สังเคราะห์ 2-แอลคิลไฮโดรควิโนน 21 ชนิด เพื่อใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันในน้ำมันหล่อลื่นพบว่าเป็นสารใหม่ 9 ชนิด จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าสารสังเคราะห์กลุ่มไฮโดรควิโนนทั้งหมดแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

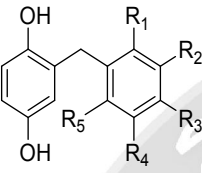
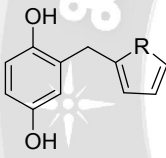
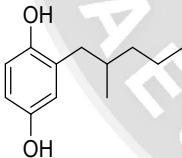
DPPH ในระดับสูง สารใหม่ 3 ตัว (H6, H7 และ H12) แสดงฤทธิ์สูงสุดต่อ DPPH โดยคาดว่าเป็นผลจากการเกิดอนุมูลอิสระ phenoxy ที่เสถียร และฤทธิ์ดังกล่าวดีกว่า TBHQ ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันในอุตสาหกรรม เมื่อทดสอบโดยวิธีการ RBOT สารที่มีศักยภาพสามชนิดดังกล่าว ยังคงแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่า TBHQ โดยสามารถชะลอการเกิดออกซิเดชันในน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานได้ยาวนานกว่า การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารเหล่านี้เกิดขึ้นได้ในระบบ heterogeneous โดยไม่ได้รับอิทธิพลจากการละลาย



รูป 1.9 โครงสร้างสารอนุพันธ์ไฮโดรควิโนนที่แสดงฤทธิ์สูงสุดต่อ DPPH

ต่อมา จิตตนันท์ และคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนที่มีหมู่แอลคิลเป็นหมู่แทนที่ตรงตำแหน่งที่สอง ทั้งหมด 13 ชนิด โดยอาศัยปฏิกิริยา aldol condensation ระหว่าง 1,4-ไซโคล-เฮกเซนไดโอน กับแอลดีไฮด์ที่น่าสนใจ โดยมีลิเทียมคลอไรด์เป็นสารตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายไพรีดีน แล้วทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ซึ่งผลการทดลองพบว่าได้อนุพันธ์ของไฮโดรควิโนนทุกชนิดจะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยที่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก 3,4-ไดไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ดังตาราง 1.2

ตาราง 1.2 ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารอนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

compound	substituents	IC ₅₀ (mM)
	R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ = -H	0.1585
	R ₃ = -OCH ₃ , R ₁ , R ₂ , R ₄ , R ₅ = -H	0.1588
	R ₁ = -OH, R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ = -H	0.2603
	R ₂ = -OH, R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ = -H	0.1540
	R ₃ = -OH, R ₁ , R ₂ , R ₄ , R ₅ = -H	0.1483
	R ₁ , R ₃ = -OH, R ₂ , R ₄ , R ₅ = -H	0.4420
	R ₂ , R ₃ = -OH, R ₁ , R ₄ , R ₅ = -H	0.0075
	R ₁ , R ₂ , R ₃ = -OH, R ₄ , R ₅ = -H	0.0423
	R ₂ , R ₃ = -OCH ₃ , R ₁ , R ₄ , R ₅ = -H	0.1885
	X = O	0.1289
	X = S	0.1627
	N = 6, R = -H	0.1655
	N = 1, R = -C ₂ H ₅	0.2496

1.8 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.8.1 เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนโดยใช้อัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ

1.8.2 เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของอนุพันธ์ไฮโดรควิโนนแต่ละชนิดด้วยเทคนิค furrier transform infrared spectroscopy และ เทคนิค ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy

1.8.3 เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของอนุพันธ์ไฮโดรควิโนนแต่ละชนิดด้วยเทคนิค DPPH scavenging test และเทคนิค spectrophotometric assay



อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. 1,4-cyclohexanedione	Aldrich chemistry	Germany
2. 2,2 – diphenyl -1-picrylhydrazyl	Fluka chemika	Switzerland
3. 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde	Aldrich chemistry	Germany
4. 3,4-dihydroxybenzaldehyde	Aldrich chemistry	Germany
5. 3-nitrobenzaldehyde	Aldrich chemistry	Germany
6. 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	Aldrich chemistry	Germany
7. dibutylamine	Fluka chemika	Switzerland
8. ethanol	J.T.Baker	USA.
9. ethyl acetate	Analytical univar A.R	Australia
10. hydrochloric acid	Analytical reagent A.R	Thailand
11. isopropylamine	Fluka chemika	Switzerland
12. lithium chloride	Ajix finechem	Australia
13. pyridine	Ajix finechem	Australia
14. silica gel GF ₂₅₄	Merck	Germany
15. sodium chloride	Merck	Germany
16. sodium sulphate	Ajix finechem	Australia

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ – อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
1. เครื่องกลิ้งผสมยาง (boll mill)	-	-
2. เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริเมตรี (differential scanning calorimetry, DSC)	Perkin Elmer	USA
3. เครื่องชั่งชนิด 4 ตำแหน่ง (analytical balance)	Mettler Toledo รุ่น AB304 – S	Switzerland
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV – lamp)	CA91786	USA
5. เครื่องระเหยความดันไอลต่ำ	Butachi U-2001	Switzerland
6. ชุดรีฟลักซ์		
7. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy)	Bruker AMX 400 MHz AVANCE	Australia
8. fourier transform infrared spectrometer	Perkin Elmer	USA
9. TLC plate (aluminium sheet)	Silica gel F ₂₅₀	Germany
10. TLC plate	-	-

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

2.3.1.1. นำ 1,4- cyclohexane dione 0.01 mol ผสม 2-(2, 4 - dihydroxy) benzaldehyde 0.01 mol และเติม lithium chloride 0.01 mol เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 ml

2.3.1.2. เติม pyridine, isopropylamine, dibutylamine ปริมาตร 20 ml เป็นตัวทำละลาย ตามลำดับ

2.3.1.3. ตั้งชุดรีฟลักซ์และให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จนเกิดปฏิกิริยาจนสมบูรณ์

2.3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

2.3.2.1 นำ 1,4- cyclohexanedione 0.01 mol, aldehyde ที่สนใจ 0.01 mol และ lithium chloride 0.01 mol ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 ml (aldehyde ที่สนใจในการวิจัยนี้คือ 2, 4- dihydroxybenzaldehyde 3, 4- dihydroxybenzaldehyde, 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde, 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde และ 3-nitrobenzaldehyde)

2.3.2.2 เติมตัวทำละลาย pyridine ปริมาตร 20 ml ลงในขวดก้นกลมที่บรรจุสารในข้อ 2.3.1.1 อยู่ และใส่แมกเนติกบาร์ลงไป

2.3.2.3 นำไปทำปฏิกิริยาในชุดรีฟลักซ์โดยให้ความร้อนที่ 80 °C ใน oil bath และคนสารด้วยแมกเนติกบาร์ตลอดการทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

2.3.3 การสกัดสารสังเคราะห์

2.3.3.1 นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปสกัดอย่างง่ายด้วย ethyl acetate ปริมาตร 20 ml กับ 10 % hydrochloric ปริมาตร 10 ml เขย่าประมาณ 10 นาทีและปล่อยให้สารแยกชั้นกันดี

2.3.3.2 แยกนำสารชั้นบนมาสกัดต่อด้วย sodium chloride อิ่มตัว ปริมาตร 10 ml เขย่าประมาณ 10 นาที และปล่อยให้สารแยกชั้นกันดี

2.3.3.3 แยกนำสารชั้นบนที่ได้ มาเติม sodium sulphate ที่มากเกินไป เพื่อดูดซับน้ำออก

2.3.3.4 นำสารสังเคราะห์ที่ผ่านกระบวนการสกัดไประเหยด้วยเครื่องระเหยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 80°C เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไปจนแห้ง แล้วเก็บสารที่ติดในขวดก้นกลมไว้ในที่แห้ง

2.3.4 แยกสารบริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)

2.3.4.1 การเตรียมคอลัมน์

- 1) ล้างคอลัมน์ให้สะอาด
- 2) นำสำลีบางๆ ใส่ลงไป
- 3) เตรียม ethyl acetate: hexane เพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่อัตราส่วน 10:90 ปริมาตร 500 ml
- 4) เตรียมซิลิกาเจลใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 ml โดยให้ซิลิกาเจลอยู่ที่ระดับ 200 ml ของบีกเกอร์
- 5) แบ่งสารละลาย ethyl acetate : hexane ที่เตรียมไว้มา 300 ml แล้วเทลงในบีกเกอร์ที่บรรจุซิลิกาเจลอยู่ คนให้ซิลิกาเจลกระจายทั่วในสารละลาย ethyl acetate: hexane แล้วเทลงในคอลัมน์ให้มีความสูงประมาณ 30 cm
- 6) ค่อยๆ ปล่อยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์จนมีระดับเหนือซิลิกาเจล 0.5 cm

2.3.4.1 การแยกสาร

- 1) ละลายสารสังเคราะห์ด้วย ethyl acetate 5 ml แล้วค่อยๆ เทลงในคอลัมน์
- 2) ค่อยๆ เทสารละลายเฟสเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane ตามลงไปจนเต็มคอลัมน์
- 3) เริ่มปล่อยสารออกจากคอลัมน์และเก็บสารที่ปล่อยออกมาในหลอดทดลองขนาด 20 ml
- 4) แล้วเติมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ ethyl acetate : hexane ที่อัตราส่วน 10 : 90 จนหมด ค่อยๆ ชะสารลงมา แล้วเพิ่มช่วงของเฟสเคลื่อนที่ขึ้นเรื่อยๆ โดยเปลี่ยนอัตราส่วนของ ethyl acetate : hexane เป็น 20 : 80, 30 : 70, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30, 80 : 20, 90 : 10, 100 : 0 หรือหยุดเพิ่มช่วงเมื่อสารแยกออกมาจากคอลัมน์หมดแล้ว

5) ทดสอบหาชนิดของสารสังเคราะห์ที่ปล่อยออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิค TLC chromatography โดยใช้ ethyl acetate: hexane ที่อัตราส่วน 1:9 เป็นเฟสเคลื่อนที่

6) รวมสารที่มีค่า R_f เดียวกันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุดไประเหยด้วยเครื่องระเหยความดันไอลำที่อุณหภูมิ 80°C เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไปจนแห้ง แล้วเก็บสารที่ติดในขวดกันกลมไว้ในที่แห้ง

2.3.5 การวิเคราะห์สารโดยเทคนิค fourier transform infrared spectroscopy

2.3.5.1 นำสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนปริมาณเพียงเล็กน้อยมาบดผสมกับ KBr

2.3.5.2 นำไปทดสอบด้วย เครื่อง fourier transform infrared spectrometer

2.3.6 การวิเคราะห์โดยเทคนิค ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy

2.3.6.1 นำสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน ประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่หลอด NMR sample ที่สะอาดและแห้งสนิท

2.3.6.2 ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ $\text{DMSO} - d_6$, CDCl_3 ใส่ลงในหลอดทดลอง NMR สูงประมาณ 2 เซนติเมตร

2.3.6.3 เขย่าเบา ๆ เพื่อให้สารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายแล้วนำไปทดสอบด้วย เครื่อง nuclear magnetic resonance spectroscopy

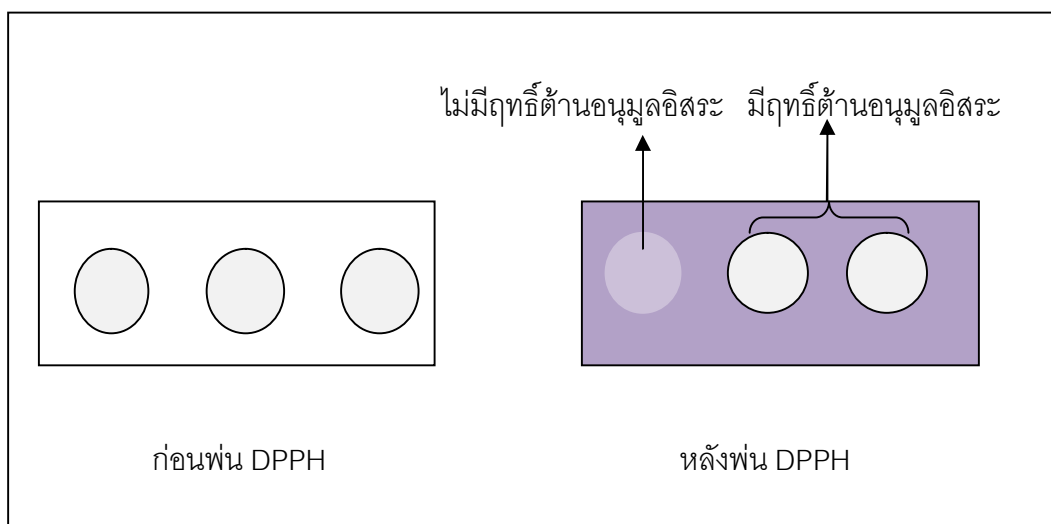
2.3.7 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค DPPH radical scavenging assay

2.3.7.1 เตรียมสารละลายของ 2,2 – diphenyl -1-picrylhydrazyl (DPPH) ในเมทานอล โดยชั่ง DPPH ปริมาตร 11.80 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลแล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรให้เป็น 100.00 ml และป้องกันสารที่เตรียมเสร็จแล้วไม่ให้โดนอากาศและแสง

2.3.7.2 จุด (spot) สารที่สนใจทดสอบลงบนแผ่น TLC

2.3.7.3 พ่นสารละลาย DPPH ซึ่งเป็นสารสีม่วงเข้มลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ให้ทั่วถึง พยายามพ่นให้เป็นละอองเล็ก ๆ และระวังอย่าให้แผ่น TLC เปียกโชกจนเกินไป

2.3.7.4 สังเกตผลที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC หากสารใดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการฟอกจางสีของ DPPH บนแผ่น TLC เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วงของ DPPH หายไป และควรมองเห็นสีของสารนั้นเป็นสีเดิม (สีก่อนพ่น DPPH ลงไป) ดังรูป 2.1



รูป 2.1 ลักษณะของแผ่น TLC ก่อนและหลังการพ่น DPPH

2.3.8 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค spectrophotometric assay

2.3.8.1 นำสารสังเคราะห์หอยนางรมไฮโดรควิโนน 1.00 mg มาละลายในตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 4 ml

2.3.8.2 ทำการเจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเป็น 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625 และ 0.007813 mg/ml

2.3.8.3 เติมสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.7.2 ลงในไมโครเพลต ปริมาตร 50 μ l โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.3.8.4 เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 200 μ l ใส่ในไมโครเพลตที่เติมสารตัวอย่างไว้

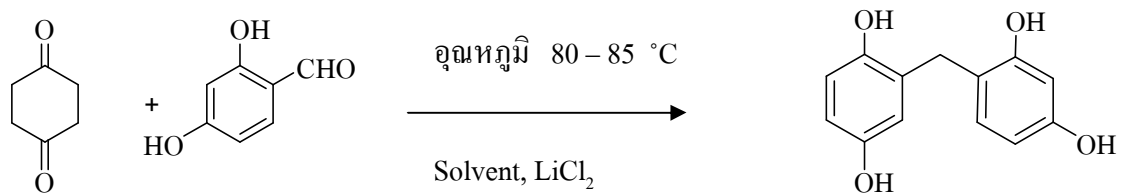
2.3.8.5 วางไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.3.8.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นสารมาตรฐานควบคุม

ผลการทดลอง

3.1 ผลของตัวทำละลายที่มีต่อการสังเคราะห์ 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone

จากการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone โดยเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมนำมาใช้ในปฏิกิริยา 3 ชนิด คือ ไพรีดีน ไอโซโพรพิลลามีน ไดบูทิลลามีน โดยใช้ปฏิกิริยา aldol condensation ระหว่าง 1-4, ไฮโดรควิโนน 0.01 mol กับ 2-(2,4-dihydroxy) benzaldehyde โดยใช้ ลิเทียมคลอไรด์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เกิดขึ้น ดังรูป 3.1 และผลการทดลองแสดงดังตาราง 3.1



1,4-cyclohexane dione + 2-(2,4-dihydroxy) benzaldehyde

derivatives of hydroquinone

รูป 3.1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(2,4-dihydroxy) benzaldehyde

ตาราง 3.1 เปรียบเทียบผลของตัวทำละลายที่มีต่อการสังเคราะห์ 2-(2,4-dihydroxy) benzaldehyde

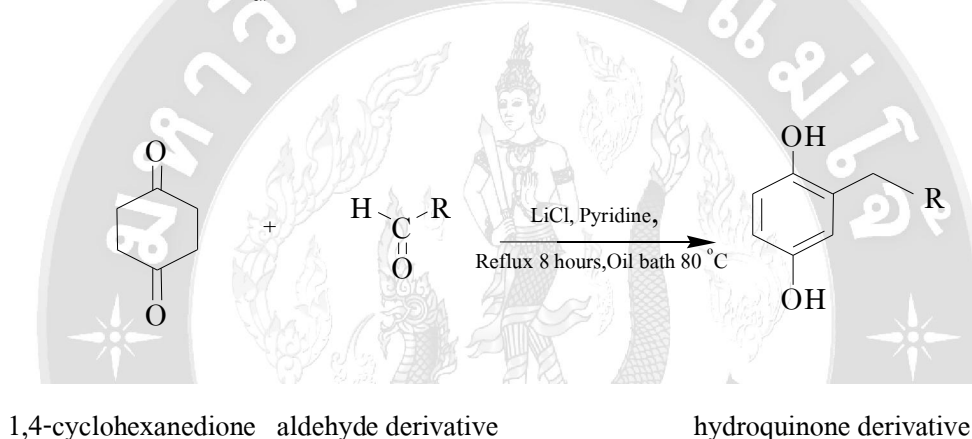
อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน	จุดหลอมเหลว (°C)	ตัวทำละลาย	เปอร์เซ็นต์ผลได้ของ ผลิตภัณฑ์ (%yield ^a)
		pyridine	81.66
2-(2,4-dihydroxy) benzaldehyde	134.80	isopropylamine	71.97
		dibutylamine	38.60

^a = isolated yield

จากการทดลองพบว่า 2-(2,4-dihydroxyl) benzaldehyde ทำปฏิกิริยากับ 1,4-cyclohexane dione โดยมีลิเทียมคลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีไพริดีนเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด และให้เปอร์เซ็นต์ผลได้มากที่สุด คือ 81.66 %

3.2 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

จากการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ไฮโดรควิโนนโดยใช้ปฏิกิริยาอัลดอลคอนเดนเซชันระหว่างสาร 1,4- cyclohexane dione 0.01 mol กับ aldehyde derivative 0.01 mol (2,3,4-trihydroxybenzaldehyde, 2,4-dihydroxybenzaldehyde, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 3-nitrobenzaldehyde และ 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde) โดยมี lithium chloride 0.01 mol เป็นสารตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายไพริดีน ดังรูป 3.2



รูป 3.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนด้วยปฏิกิริยาอัลดอลคอนเดนเซชัน

ผลการสังเคราะห์ พบว่า สารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 5 ชนิด มีสีที่เข้ม เมื่ออยู่ในสถานะของแข็งจะมีลักษณะผลึกที่คล้ายกันและแยกสีได้ยาก แต่จะเห็นความแตกต่างของสีได้ชัดเจนเมื่ออยู่ในสถานะของสารละลาย สามารถแยกออกได้สามกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) เป็นหมู่แทนที่ คือ สารสังเคราะห์ 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone และ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone เป็นของแข็งสีม่วงเข้มและสีส้มน้ำตาล ตามลำดับ กลุ่มที่สองคือสารสังเคราะห์ 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone เป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้ม และกลุ่มที่สามคือ สารสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone เป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง แสดงดังตาราง 3.2

ตาราง 3.2 ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนโดยใช้อัลดีไฮด์ชนิดต่างๆโดยใช้ปฏิกิริยาอัลดอลคอนเดนเซชัน

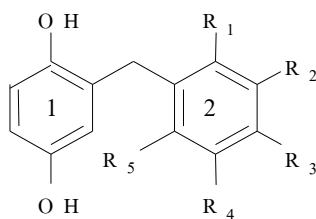
ชื่อสารผลิตภัณฑ์	ลักษณะผลึกและสี	ค่า R_f	melting point ($^{\circ}\text{C}$)	% yield ^a
2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone	 สีม่วงเข้ม	0.32	163-167	19.12
2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone	 สีส้มน้ำตาล	0.26	133-134	81.66
2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone	 สีส้มน้ำตาล	0.23	165-170	45.82
2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone	 สีน้ำตาลเข้ม	0.27	167-175	51.12
2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone	 สีน้ำตาลแดง	0.39	173-180	41.21

^a = isolated yield

จากผลการทดลองผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่า สารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone ให้ % yield มากที่สุด และ 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone ให้ % yield น้อยที่สุด เนื่องจาก 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde ซึ่งมีหมู่แทนที่ (-OH) ถึง 3 หมู่อาจส่งผลให้เกิดความเกะกะขณะเข้าทำปฏิกิริยาได้

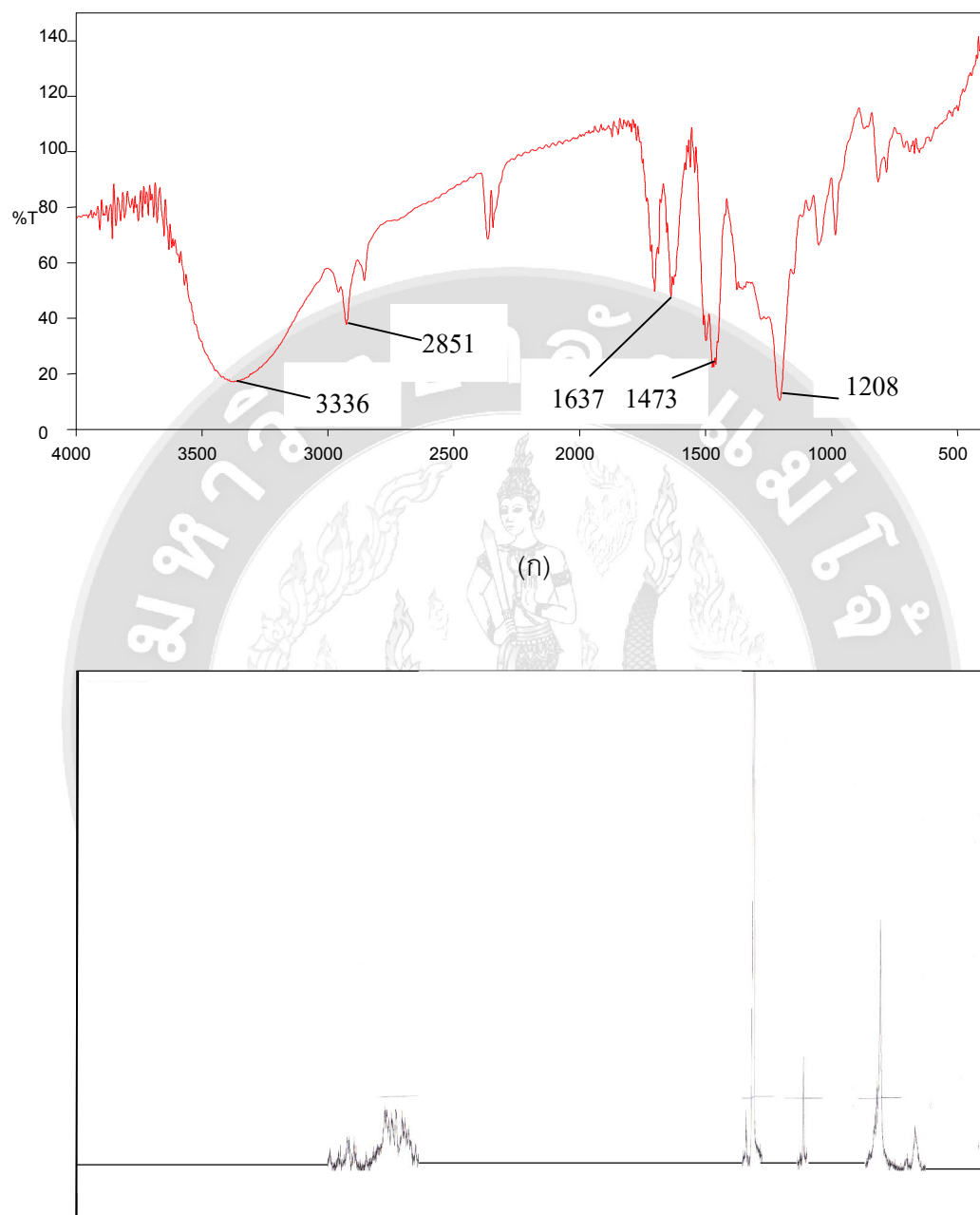
3.3 ผลการศึกษาเอกลักษณ์ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนด้วยเทคนิค furrier transform infrared spectroscopy และเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

จากการนำสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 5 ชนิด มาวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์เฉพาะด้วยเทคนิค furrier transform infrared spectroscopy พบว่า สเปกตรัมของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 5 ชนิด มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่จะแสดงหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญบ่งชี้ให้เห็นข้อแตกต่างได้ชัดเจนซึ่งแยกออกได้สามกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรกเป็นสารสังเคราะห์ 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone และ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone จะแสดงสเปกตรัมที่เด่นชัด คือ สเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซี (-OH) กลุ่มที่สองเป็นสารสังเคราะห์ 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone แสดงสเปกตรัมที่เด่นชัด คือ สเปกตรัมของหมู่ไนโตรเจนไดออกไซด์ ($-\text{NO}_2$) และกลุ่มที่สามคือ 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone แสดงสเปกตรัมที่เด่นชัด คือ สเปกตรัมของหมู่เมทอกซี ($-\text{OCH}_3$) และจากการวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์เฉพาะด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ ทำให้สามารถทราบตำแหน่งที่แน่นอนของสารองค์ประกอบและหมู่แทนที่ในโมเลกุล เมื่อวิเคราะห์สัญญาณที่ปรากฏแล้ว พบว่า โมเลกุลของสารสังเคราะห์ทั้ง 4 ชนิด ประกอบไปด้วยวงอะโรมาติก 2 วง เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคาร์บอน และจะมีเอกลักษณ์ที่แตกต่างกันออกไปตามหมู่แทนที่ของวงอะโรมาติกที่ 2 ดังรูป 3.3



รูป 3.3 ลักษณะโครงสร้างของสารอนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

3.3.1 สารสังเคราะห์ 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone



(ข)

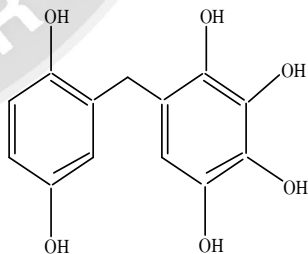
รูป 3.4 สเปกตรัมของสารสังเคราะห์ 2-(2,3,4-trihydroxyl) hydroquinone

(ก) furrier transform infrared spectroscopy

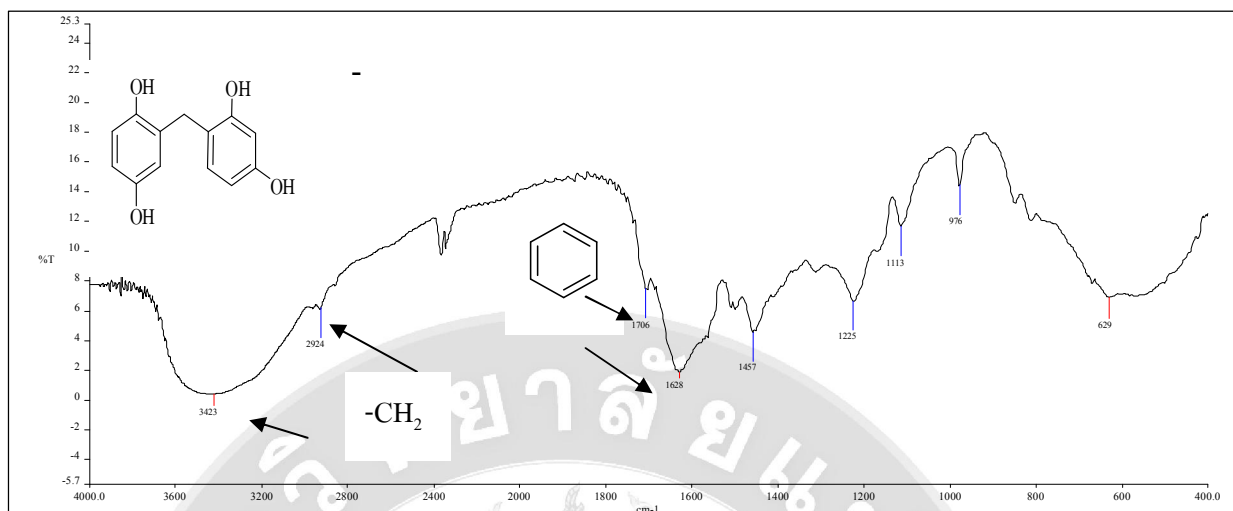
(ข) ¹H-NMR

จากสัญญาณสเปกตรัม fourier transform infrared spectroscopy พบสัญญาณที่สำคัญคือ FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3374 (br, O-H str), 2851 (w, C-H str of aromatic), 1473, 1637 (s, C=C str of aromatic) และ 1208 (s, C-O str) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสัญญาณสเปกตรัมของสารตั้งต้น แสดงดังภาคผนวก ก (รูป ก.1) พบว่า สัญญาณที่แสดงเอกลักษณ์หมู่ฟังก์ชัน (-CHO) ของสารตั้งต้นที่ประมาณ 1760-1670 (s, aldehyde stretch) หายไปจากสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ และเมื่อพิจารณาสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณที่สำคัญคือ $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) :, 6.87 (d, 1H, aromatic proton), 6.27-7.15 (m, 5H, aromatic protons) และ 3.69 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$) สรุปและวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของสารได้ดังตาราง 3.3

ตาราง 3.3 สัญญาณจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิค fourier transform infrared spectroscopy และ $^1\text{H-NMR}$ และแสดงลักษณะทางโครงสร้างของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(2,3,4- trihydroxybenzyl) hydroquinone

fourier transform infrared spectrometry		^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy		ลักษณะทางโครงสร้าง
ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน	δ (ppm)	หมู่	
3374	(br, O-H str)	9.83, 9.85	(s, 2H each, O-H)	
2851	(w, C-H str of aromatic)	6.87	(m, 5H, aromatic protons)	
1473, 1637	(s, C=C str of aromatic)	6.27-7.15	(s, 2H, $-\text{CH}_2-$)	
1208	(s, C-O str)	3.69	-	

3.3.2 สารสังเคราะห์ 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone



รูป 3.5 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารตั้งต้น 2-(2, 4 – dihydroxy) benzaldehyde



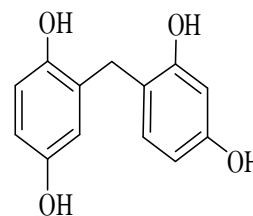
รูป 3.6 ^1H -NMR spectrum ของ 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone

จากสัญญาณสเปกตรัม furrier transform infrared spectroscopy พบสัญญาณที่สำคัญ คือ FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3423 (br, O-H str), 2924 (m, C-H str of aromatic) และ 1620, 1501 (s, C=C str of aromatic) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสัญญาณสเปกตรัมของสารตั้งต้น พบว่า สัญญาณที่แสดงเอกลักษณ์หมู่ฟังก์ชันก่ (-CHO) ของสารตั้งต้นที่ประมาณ $1760\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ (s, aldehyde stretch) หายไปจากสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ และเมื่อพิจารณาสเปกตรัม ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy พบสัญญาณที่สำคัญคือ ^1H -NMR (400MHz,

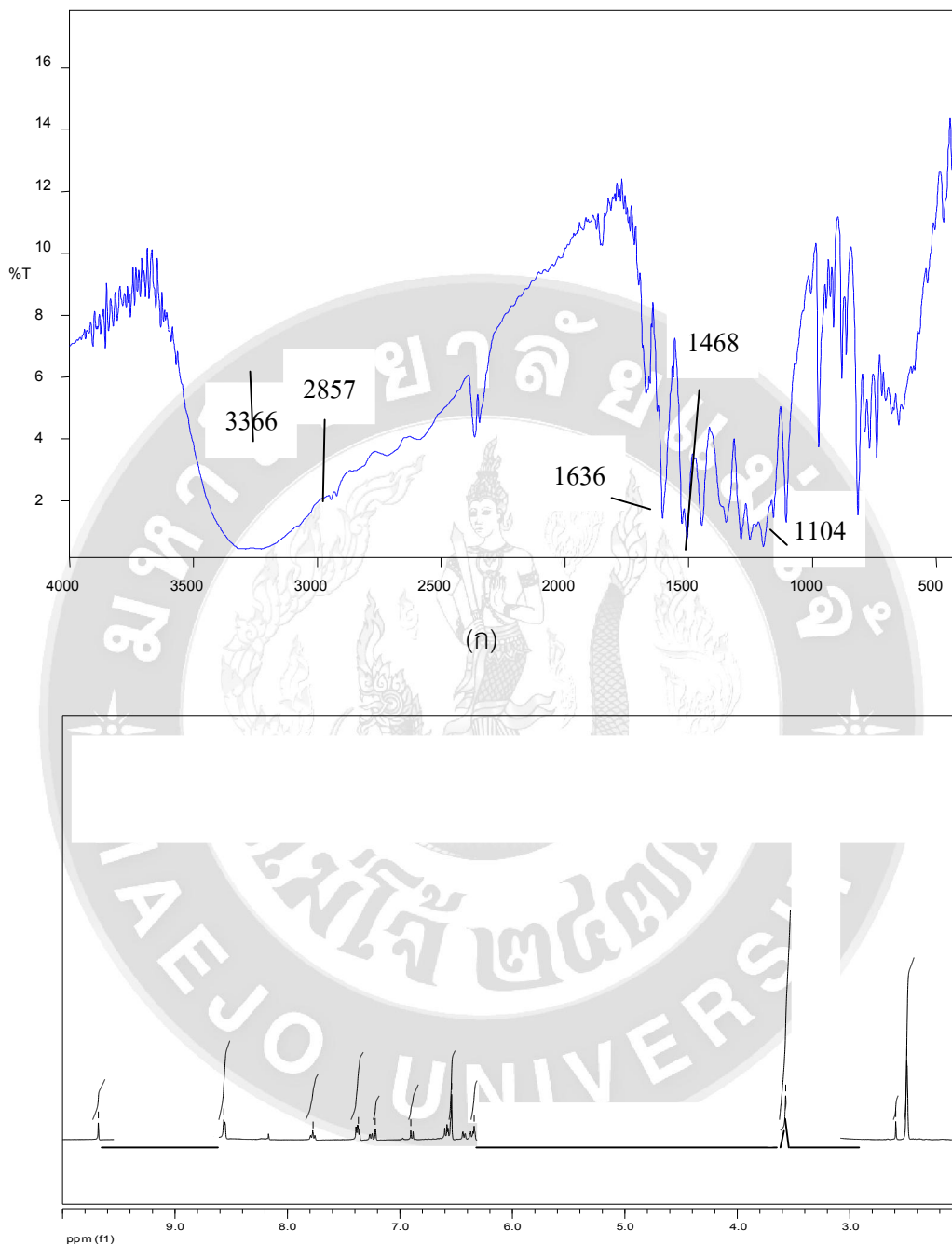
DMSO-d₆) δ (ppm) : 9.44, 9.16 (s, 4H, O-H), 6.37-6.98 (m, 6H, aromatic protons), และ 3.81 (s, 2H, -CH₂-) สรุปและวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของสารได้ดังตาราง 3.4

ตาราง 3.4 แสดงสัญญาณจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิค FT-IR spectroscopy และ ¹HMR spectroscopy และแสดงลักษณะทางโครงสร้างของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone

fourier transform infrared spectrometry		¹ H nuclear magnetic resonance spectroscopy		ลักษณะทางโครงสร้าง
$\nu_{\max}$ (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชัน	δ (ppm)	หมู่	
3423	(br, O-H str)	9.44, 9.16	(s, O-H)	
2924	(m, C-H str of aromatic)	6.37-6.98	(m, 6H, aromatic protons)	
1620, 1501	(s, C=C str of aromatic)	3.81	(s, 2H, -CH ₂ -)	



3.3.3 สารสังเคราะห์ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone



(ก)

รูป 3.7 สเปกตรัมของสารสังเคราะห์ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone

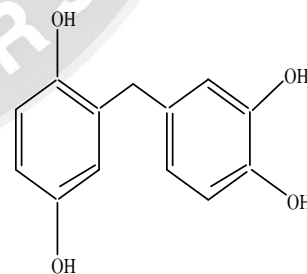
(ก) furrier transform infrared spectroscopy

(ข) $^1\text{H-NMR}$

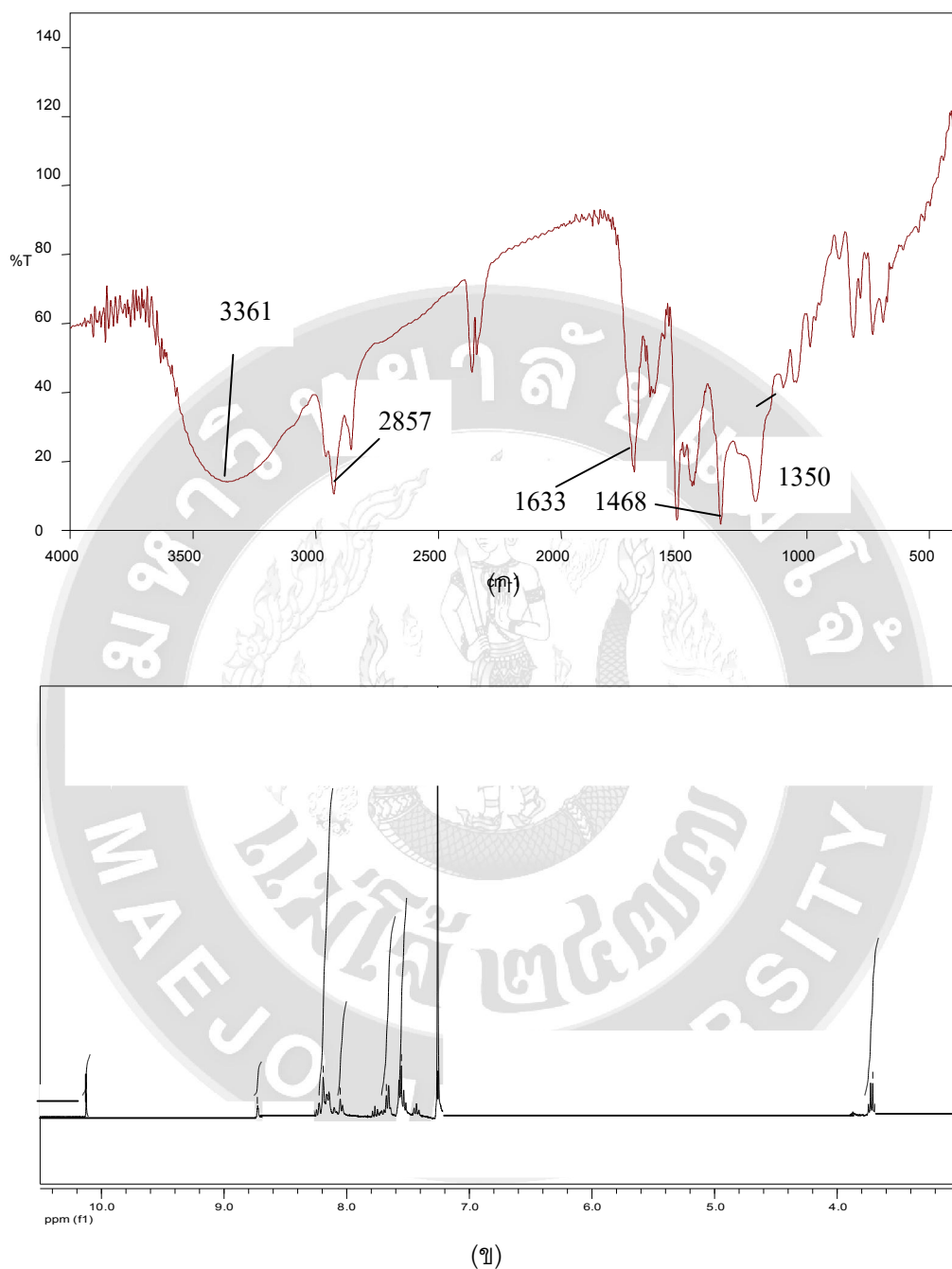
จากสัญญาณสเปกตรัม fourier transform infrared spectroscopy พบสัญญาณที่สำคัญคือ FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3366 (br, O-H str), 2857 (w, C-H str of aromatic), 1468, 1636 (s, C=C str of aromatic) และ 1104 (s, C-O str) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสัญญาณสเปกตรัมของสารตั้งต้น แสดงดังภาคผนวก ก (รูป ก.1) พบว่า สัญญาณที่แสดงเอกลักษณ์หมู่ฟังก์ชัน (-CHO) ของสารตั้งต้นที่ประมาณ 1760-1670 (s, aldehyde stretch) หายไปจากสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ และเมื่อพิจารณาสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณที่สำคัญคือ $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 8.56, 9.68 (s, 4H, O-H), 6.34-7.72 (m, 6H, aromatic protons), และ 3.57 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$) สรุปและวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของสารได้ดังตาราง 3.5

ตาราง 3.5 แสดงสัญญาณจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิค fourier transform infrared spectroscopy และ $^1\text{H-NMR}$ และแสดงลักษณะทางโครงสร้างของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(3,4- dihydroxybenzyl) hydroquinone

fourier transform infrared spectrometry		^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy		ลักษณะทางโครงสร้าง
ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน	δ (ppm)	หมู่	
3366	(br, O-H str)	8.56, 9.68	(s, 4H, O-H)	
2857	(w, C-H str of aromatic)	6.34-7.72	(m, 6H, aromatic protons)	
1468, 1636	(s, C=C str of aromatic)	3.57	(s, 2H, $-\text{CH}_2-$)	
1104	(s, C-O str)	-	-	



3.3.4 สารสังเคราะห์ 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone



รูป 3.8 สเปกตรัมของสารสังเคราะห์ 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone

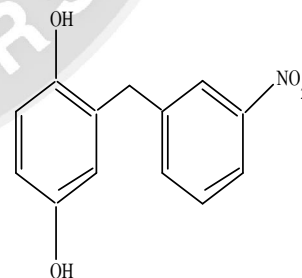
(ก) furrier transform infrared spectroscopy

(ข) $^1\text{H-NMR}$

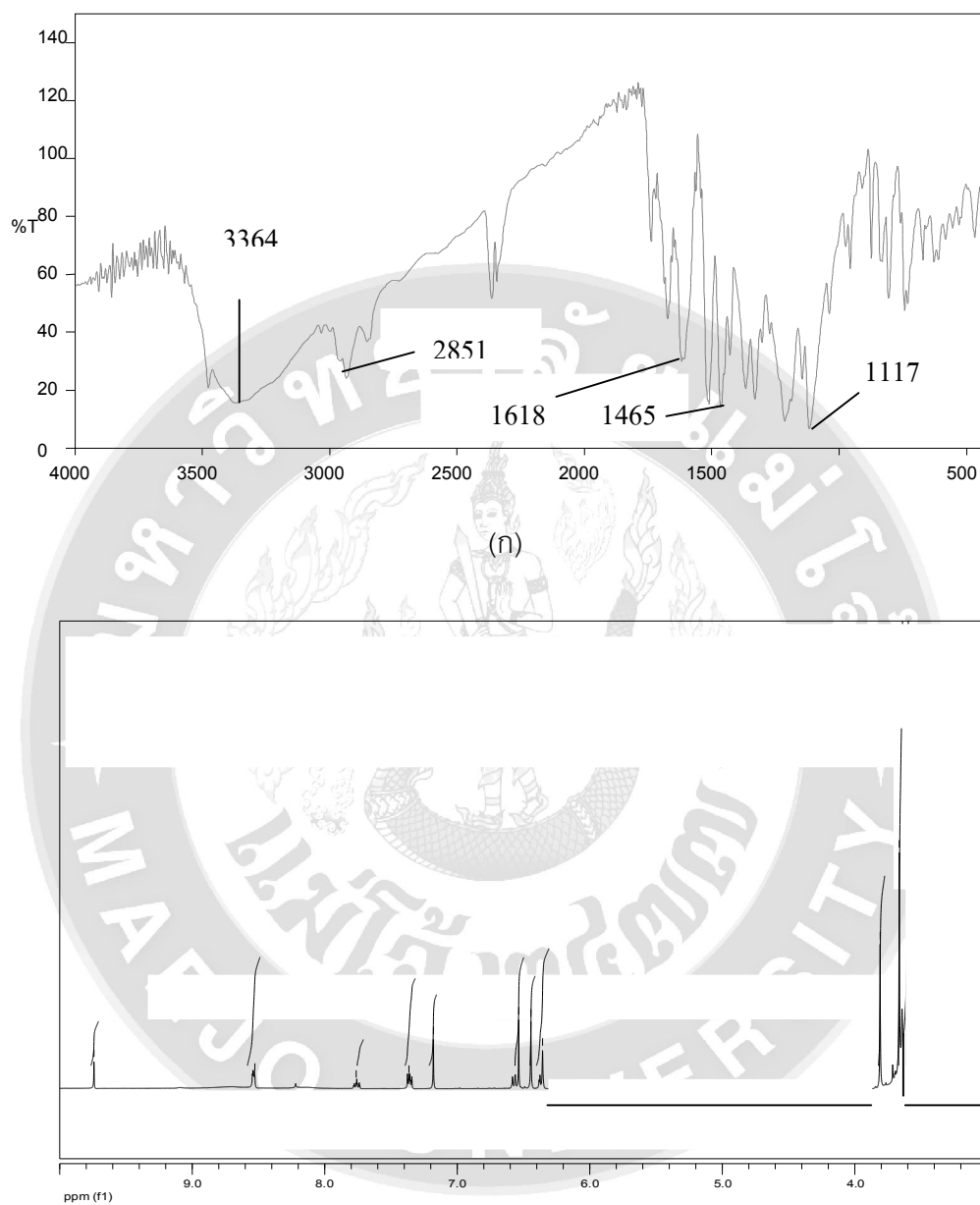
จากสัญญาณสเปกตรัม fourier transform infrared spectroscopy พบสัญญาณที่สำคัญคือ FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3361 (br, O-H str), 2857 (w, C-H str of aromatic), 1468, 1633 (s, C=C str of aromatic) และ 1350 (s, C-O str) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสัญญาณสเปกตรัมของสารตั้งต้น แสดงดังภาคผนวก ก (รูป ก.1) พบว่า สัญญาณที่แสดงเอกลักษณ์หมู่ฟังก์ชัน (-CHO) ของสารตั้งต้นที่ประมาณ 1760-1670 (s, aldehyde stretch) หายไปจากสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ และเมื่อพิจารณาสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณที่สำคัญคือ $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 9.87 (s, 1H each, O-H), 7.55-8.19 (m, 7H, aromatic protons) และ 3.85 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$) สรุปและวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของสารได้ดังตาราง 3.6

ตาราง 3.6 แสดงสัญญาณจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิค fourier transform infrared spectroscopy และ $^1\text{H-NMR}$ และแสดงลักษณะทางโครงสร้างของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone

fourier transform infrared spectrometry		^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy		ลักษณะทางโครงสร้าง
ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน	δ (ppm)	หมู่	
3361	(br, O-H str)	9.87	(s, 2H each, O-H)	
2857	(w, C-H str of aromatic)	7.55-8.19	(m, 7H, aromatic protons)	
1468, 1633	(s, C=C str of aromatic)	3.85	(s, 2H, $-\text{CH}_2-$)	
1350	(s, C-O str)	-	-	



3.3.5 สารสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone



(ก)

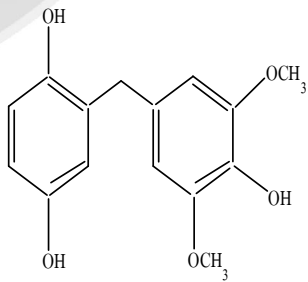
รูป 3.9 สเปกตรัมของสารสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone

(ก) furrier transform infrared spectroscopy

(ข) $^1\text{H-NMR}$

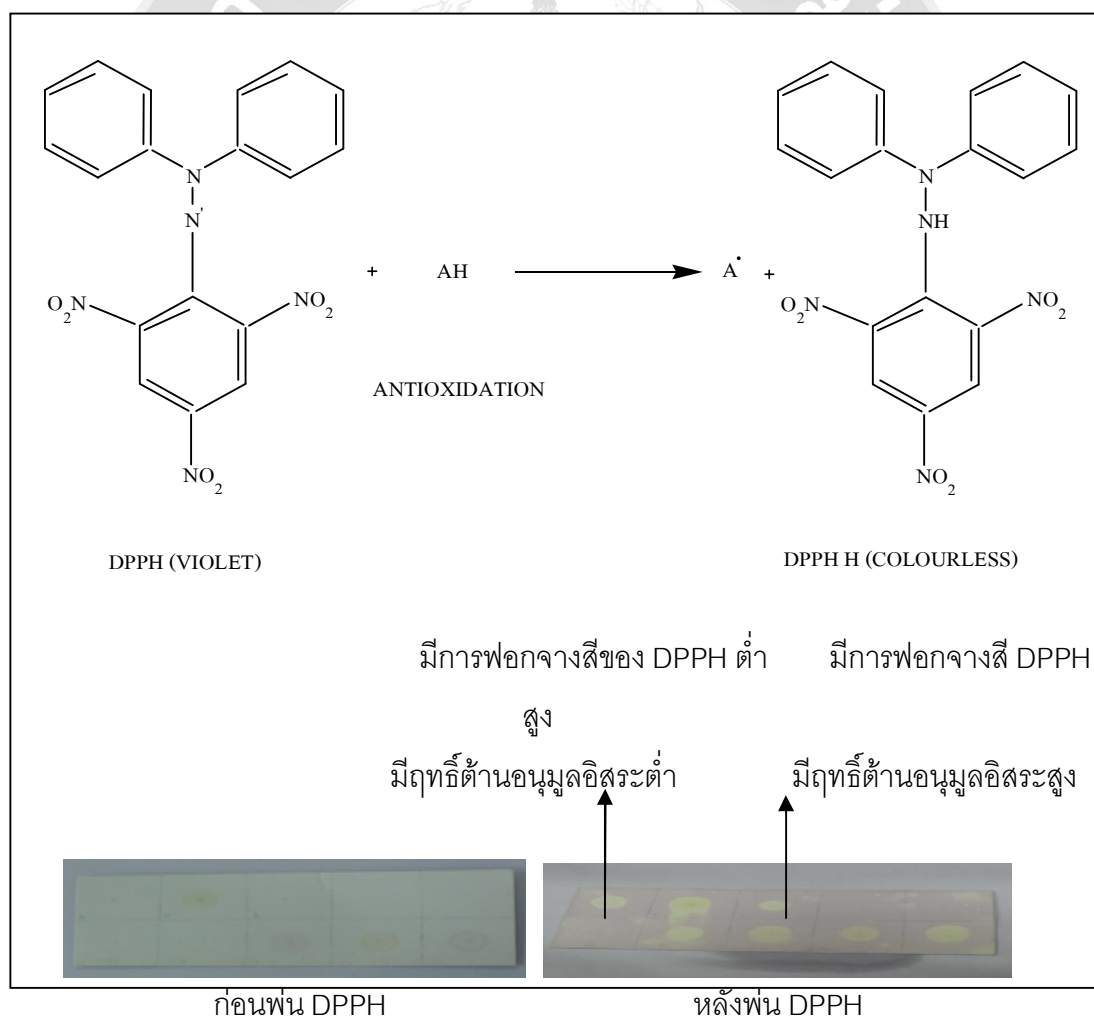
จากสัญญาณสเปกตรัม fourier transform infrared spectroscopy พบสัญญาณที่สำคัญคือ FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3364 (br, O-H str), 2851 (w, C-H str of aromatic), 1465, 1618 (s, C=C str of aromatic) และ 1117 (s, C-O str) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสัญญาณสเปกตรัมของสารตั้งต้น แสดงดังภาคผนวก ก (รูป ก.1) พบว่า สัญญาณที่แสดงเอกลักษณ์หมู่ฟังก์ชัน (-CHO) ของสารตั้งต้นที่ประมาณ 1760-1670 (s, aldehyde stretch) หายไปจากสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ และเมื่อพิจารณาสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณที่สำคัญคือ $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 9.12, 8.91, 8.49 (s, 1H each, O-H), 6.89-3.62 (m, 5H, aromatic protons), 3.75 (s, 6H, 2x-OCH₃) และ 3.81 (s, 2H, -CH₂-) สรุปและวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของสารได้ดังตาราง 3.7

ตาราง 3.7 แสดงสัญญาณจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิค fourier transform infrared spectroscopy และ $^1\text{H-NMR}$ และแสดงลักษณะทางโครงสร้างของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(4-hydroxyl-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone

fourier transform infrared spectrometry		^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy		ลักษณะทางโครงสร้าง
ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน	δ (ppm)	หมู่	
3364	(br, O-H str)	8.52, 9.74	s, 1H each, O-H)	
2851	(w, C-H str of aromatic)	6.35-7.36	(m, 5H, aromatic protons)	
1465, 1618	(s C=C str of aromatic)	3.80	(s, 6H, 2x-OCH ₃)	
1117	(s, C-O str)	3.66	(s, 2H, -CH ₂ -)	

3.4 การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงคุณภาพเบื้องต้นของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน โดยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยการเทียบเวลาที่สารสามารถฟอกจางสีของ DPPH จากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองอ่อนได้ พบว่า สารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 4 ชนิด สามารถแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยการฟอกจางสีของ DPPH ได้ โดยสารสังเคราะห์ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone สามารถฟอกจางสีได้ทันทีที่ทำการพ่นสาร DPPH ลงบนแผ่น TLC เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโลวินอกซ์และสารมาตรฐาน 2,6-Di-tert-Butyl-1-Hydroxy-4-Methylbenzene (BHT) แสดงปฏิกิริยาและลักษณะการฟอกจางสีของ DPPH ดังรูป 3.7 และผลการฟอกจางสีของ DPPH แสดงดังตาราง 3.10



รูป 3.10 แสดงแสดงปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระของสารกับ DPPH และลักษณะการฟอกจางสี DPPH ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

ตาราง 3.8 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

ชื่อสารผลิตภัณฑ์	การฟอกจางสี
2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone	++
2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone	++
2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone	++
2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone	++
2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyl) hydroquinone	+
2,6-Di- tert-Butyl-1- Hydroxy-4-Methylbenzene (BHT)	+
Lowinox	+

หมายเหตุ: (++) ฟอกจางสี 0-1 นาที, (+) เริ่มฟอกจางสีเริ่มจาก 1-5 นาที, (-) ไม่เกิดการฟอกจางสี

สำหรับผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงคุณภาพ พบว่า สารสังเคราะห์ชนิด 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone มีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุดโดยแสดงการฟอกจางสีของ DPPH ได้ทันที และสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone และ 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone สามารถฟอกจางสีของ DPPH ได้ที่เวลา 5 วินาที และ 7 วินาที ตามลำดับ สำหรับสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone สามารถฟอกจางสีของ DPPH ได้ที่เวลา 1.30 นาที ในขณะที่สารมาตรฐานโลวินอกซ์และ BHT สามารถฟอกจางสีของ DPPH ได้ที่เวลา 1 นาที

3.5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธีspectrophotometric assay

เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงคุณภาพของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนเบื้องต้นด้วยเทคนิค DPPH scavenging assay แล้วพบว่า สารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 4 ชนิด แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ หลังจากนั้นนำสารสังเคราะห์มาทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงปริมาณด้วยเทคนิค spectrophotometric assay ซึ่งเป็นเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer เพื่อนำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของสารมาคำนวณหา % inhibition จากสมการ 3.1

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \right) \right) \quad (3.1)$$

หลังจากนั้นนำข้อมูลค่า % inhibition มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของสารตัวอย่าง เพื่อนำไปเป็นข้อมูลในการคำนวณค่า IC_{50} ของสารจากสมการ 3.2

$$y = ax^2 + bx + c = 0 \quad (3.2)$$

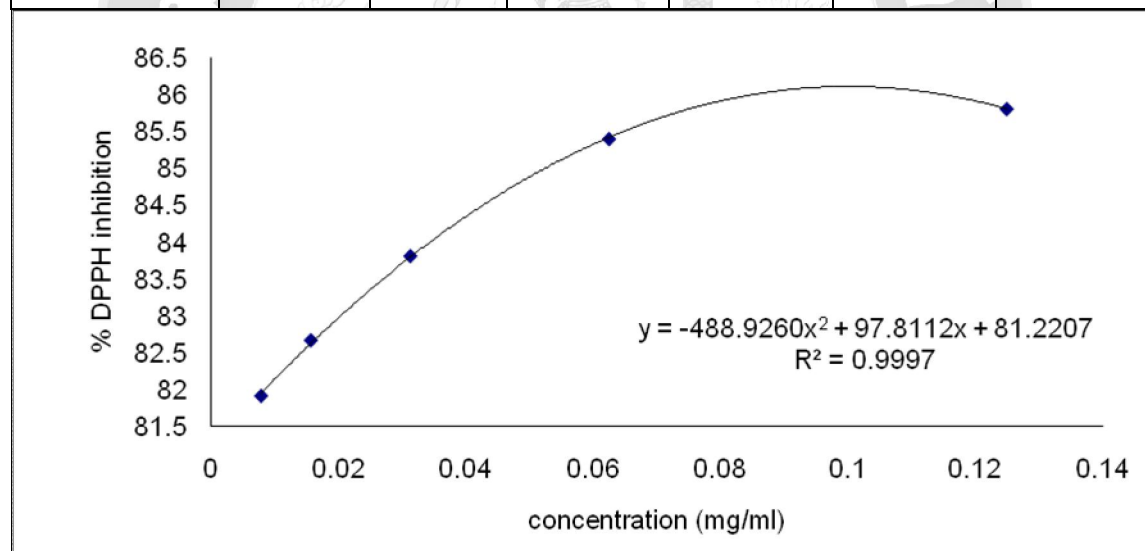
โดย y คือ เปอร์เซ็นต์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงปริมาณด้วยเทคนิค spectrophotometric assay ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 4 ชนิด เป็นดังนี้

3.5.1 สารมาตรฐาน BHT

ตาราง 3.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และค่า % inhibition ของสารมาตรฐาน BHT โดยวิธี spectrophotometric assay

ความเข้มข้น	0.1250	0.0625	0.03125	0.015625	0.007813	0.00 (control)
ครั้งที่	Absorbance (517 nm)					
1	0.243	0.251	0.278	0.297	0.310	1.789
2	0.244	0.250	0.279	0.299	0.312	1.750
3	0.245	0.252	0.278	0.298	0.311	1.620
Average	0.244	0.251	0.278	0.298	0.311	1.720
% inhibition	85.811	85.404	83.815	82.671	81.915	0.000



รูป 3.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของสารมาตรฐาน BHT

การคำนวณค่า IC_{50} จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของสารมาตรฐาน BHT

$$\text{จากสมการ } y = ax^2 + bx + c = 0$$

$$\text{จากรูป } y = -488.9260x^2 + 97.8112x + 81.2207$$

โดย y คือ เปอร์เซ็นต์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์

X คือ ค่า IC_{50} หน่วย mg/ml

$$\text{เมื่อหาว่า } y = ax^2 + bx + c = 0 \text{ จะได้}$$

$$y = -488.9260x^2 + 97.8112x + 81.2207 = 50$$

$$y = -488.9260x^2 + 97.8112x + 31.2207 = 0$$

$$\text{แทนค่า } a = -488.9260, b = 97.8112, c = 31.2207$$

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$$\text{จากสมการ } x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \text{ จะได้}$$

$$x = \frac{-97.8112 \pm \sqrt{(97.8112)^2 - 4(-488.9260)(31.2207)}}{2(-488.9260)}$$

$$x = \frac{-97.8112 \pm \sqrt{9567.030845 + 61058.4479}}{-977.852}$$

$$\text{กรณีที่ } \pm \text{ เป็นบวก (+) จะได้}$$

$$x = \frac{-97.8112 + 70625.47875}{-977.852}$$

$$x = \frac{-97.8112 + 265.754546}{-977.852}$$

$$x = \frac{167.943346}{-977.852}$$

$$x = -0.171747203 \approx -0.17$$

$$\text{กรณีที่ } \pm \text{ เป็นลบ (-) จะได้}$$

$$x = \frac{-97.8112 - 70625.47875}{-977.852}$$

$$x = \frac{-97.8112 - 265.754546}{-977.852}$$

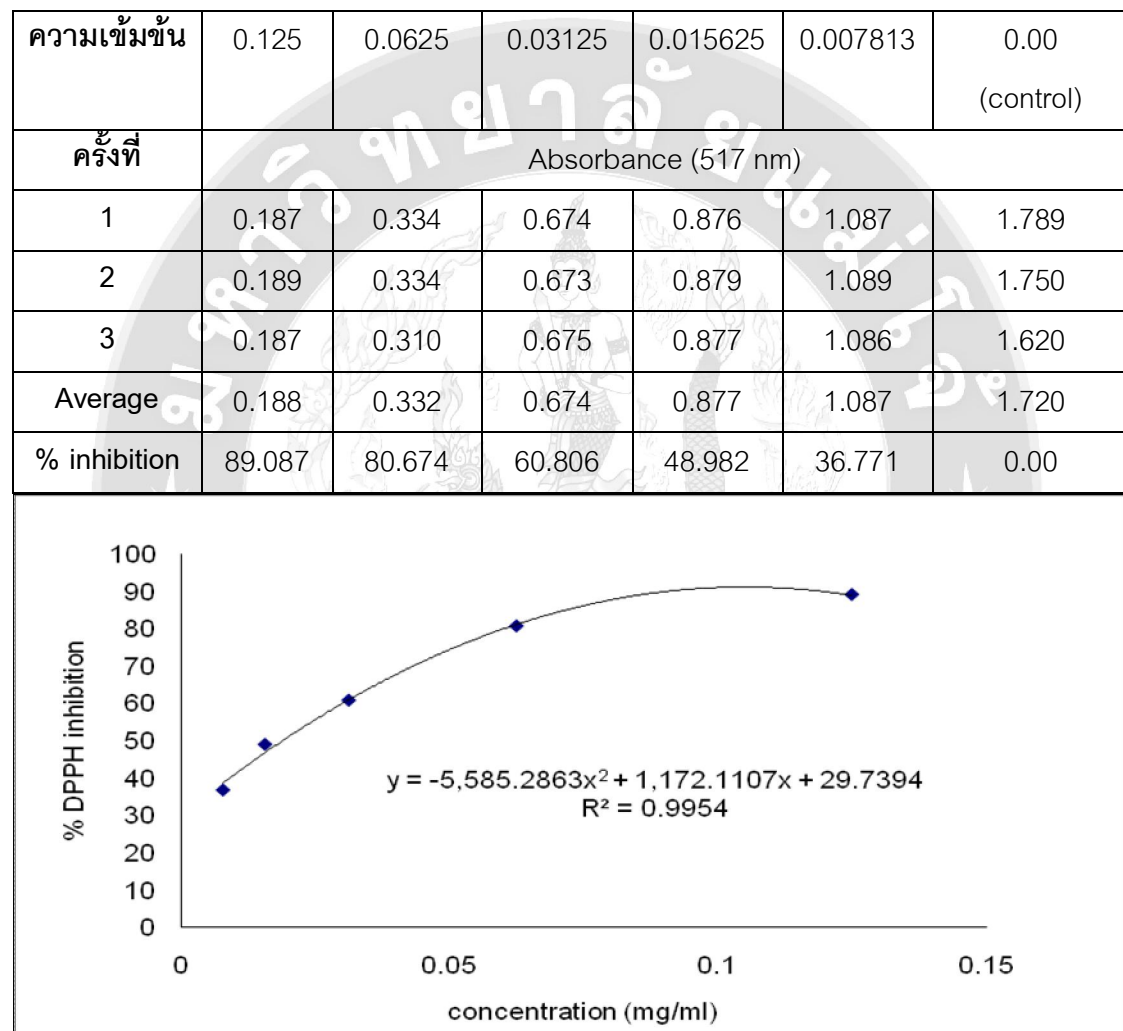
$$x = \frac{-363.565758}{-977.852}$$

$$x = 0.371586559 \approx 0.37$$

ผลการคำนวณจากสมการ $y = ax^2 + bx + c = 0$ ได้ค่า $x = -0.17$ และ 0.37 ในการนำค่าไปจะเลือกใช้กรณี $\pm$ เป็นบวก (+) ดังนั้นสารมาตรฐาน BHT มีค่า $IC_{50} = 0.37$

3.5.2 สารมาตรฐานไลวีนอกซ์

ตาราง 3.10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และค่า % inhibition ของสารมาตรฐานไลวีนอกซ์ โดยวิธี spectrophotometric assay

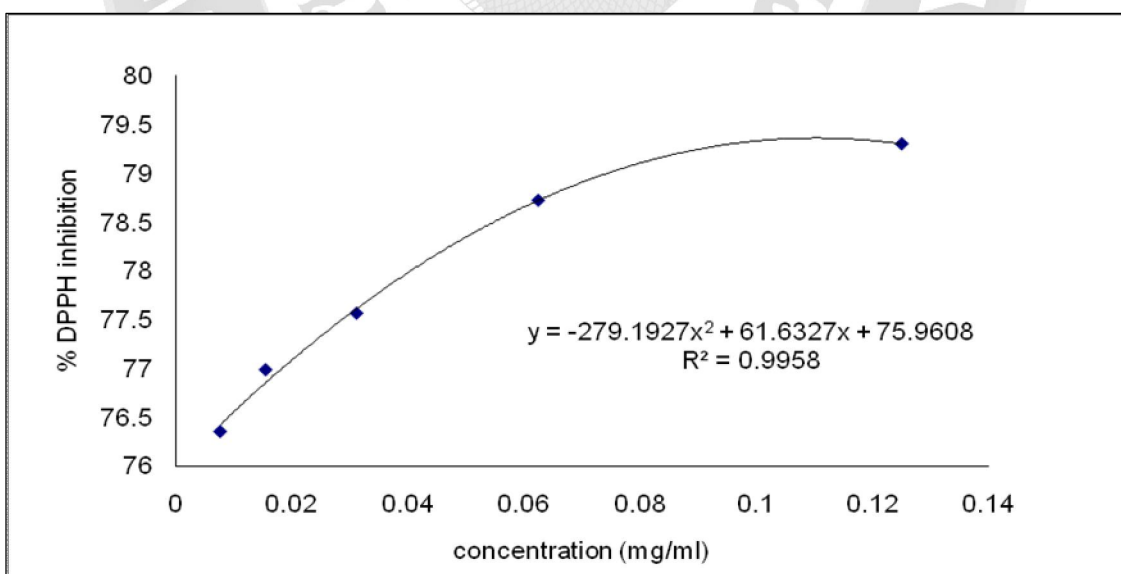


รูป 3.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของสารมาตรฐานไลวีนอกซ์

3.5.3 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone

ตาราง 3.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และค่า % inhibition ของสาร
สังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone โดยวิธี
spectrophotometric assay

ความเข้มข้น	0.125	0.062	0.03125	0.01562	0.00781	0.00
		5		5	3	(control)
ครั้งที่	Absorbance (517 nm)					
1	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249
2	0.25	0.261	0.283	0.291	0.303	1.75
3	0.25	0.26	0.28	0.293	0.304	1.62
Average	0.249	0.256	0.270	0.277	0.285	1.206
% inhibition	79.303	78.72	77.562	76.982	76.347	0.0

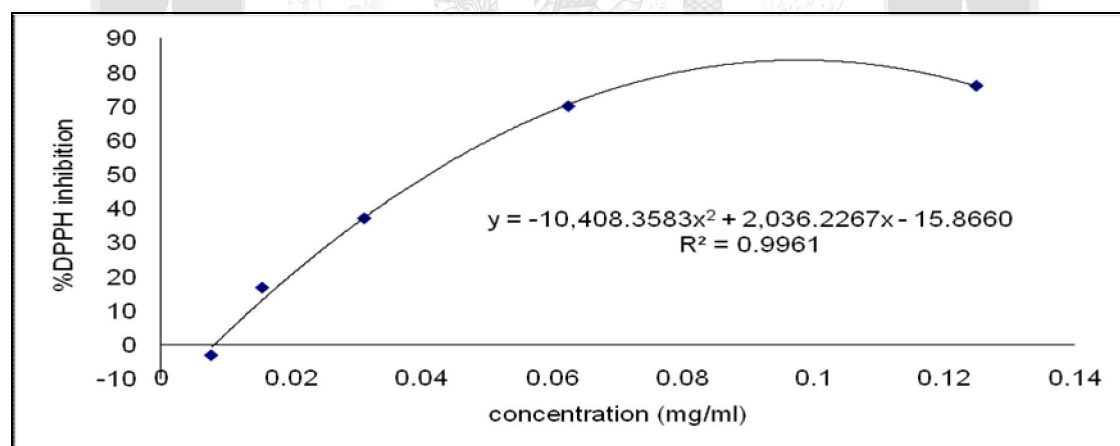


รูป 3.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของ
2-(2,3,4- trihydroxybenzyl) hydroquinone

3.5.4 2-(2,4-dihydroxyl) hydroquinone

ตาราง 3.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และค่า % inhibition ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(2,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone โดยวิธี spectrophotometric assay

ความเข้มข้น	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.007813	0.00
						(control)
ครั้งที่	ค่า Absorbance (517nm)					
1	0.408	0.153	1.079	1.430	1.772	1.789
2	0.412	0.512	1.080	1.431	1.774	1.750
3	0.410	0.514	1.082	1.432	1.773	1.620
Average	0.410	0.513	1.080	1.431	1.773	1.720
% inhibition	76.158	70.169	37.178	16.786	-3.101	0.00

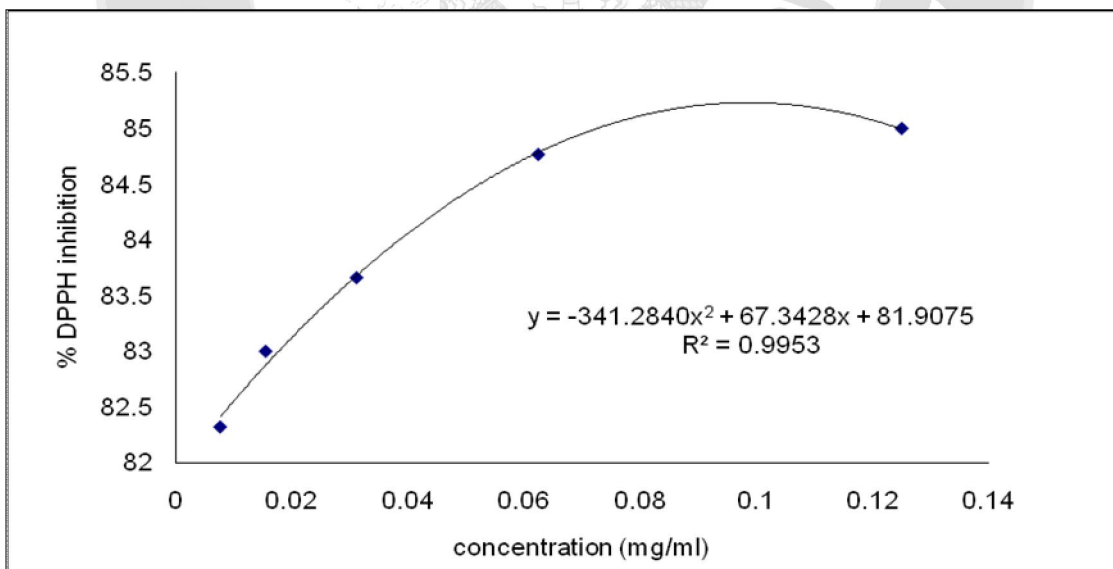


รูป 3.14 แสดงฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone

3.5.5 2-(3,4-dihydroxyl) hydroquinone

ตาราง 3.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และค่า % inhibition ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone โดยวิธี spectrophotometric assay

ความเข้มข้น	0.125	0.062	0.03125	0.01562	0.00781	0.00
		5		5	3	(control)
ครั้งที่	Absorbance (517nm)					
1	0.257	0.262	0.281	0.291	0.305	1.789
2	0.259	0.263	0.28	0.293	0.303	1.75
3	0.258	0.261	0.282	0.293	0.304	1.62
Average	0.258	0.262	0.281	0.292	0.304	1.719
% inhibition	84.997	84.76	83.659	83.000	82.322	0.0

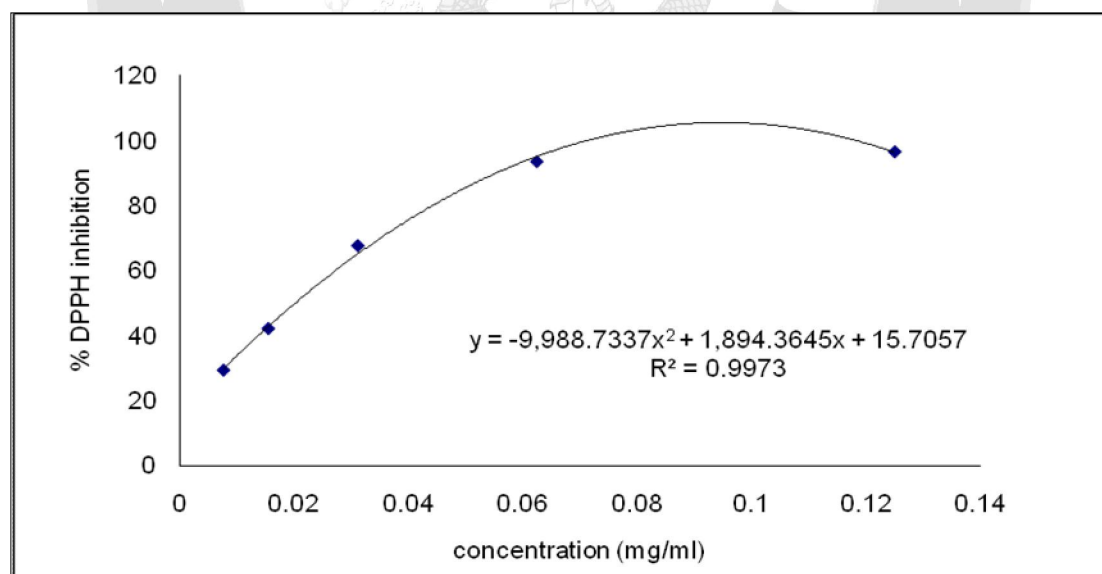


รูป 3.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone

3.5.6 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone

ตาราง 3.14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และค่า % inhibition ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(3-nitro) hydroquinone โดยวิธี spectrophotometric assay

ความเข้มข้น	0.125	0.062	0.03125	0.01562	0.00781	0.00
		5		5	3	(control)
ครั้งที่	Absorbance (517nm)					
1	0.056	0.109	0.553	0.991	1.215	1.789
2	0.059	0.11	0.557	0.995	1.215	1.75
3	0.058	0.11	0.556	0.999	1.217	1.62
Average	0.057	0.109	0.555	0.995	1.215	1.719
% inhibition	96.646	93.62	67.706	42.139	29.308	0.0

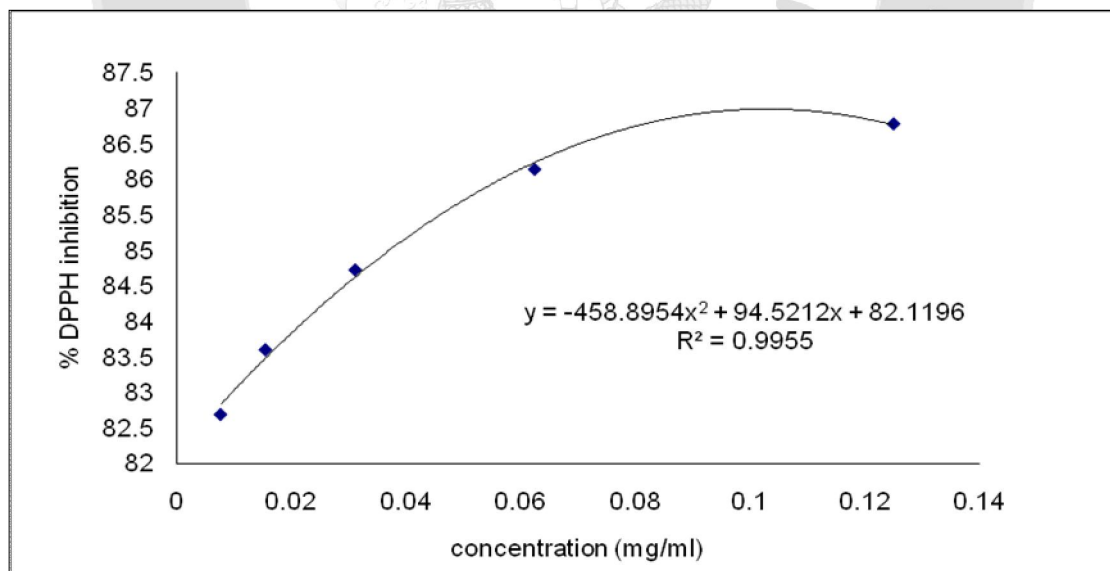


รูป 3.16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของ 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone

3.5.7 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone

ตาราง 3.15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และค่า % inhibition ของสาร
สังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl)
hydroquinone โดยวิธี spectrophotometric assay

ความเข้มข้น	0.125	0.062	0.03125	0.01562	0.00781	0.00
		5		5	3	(control)
ครั้งที่	Absorbance (517nm)					
1	0.227	0.239	0.267	0.285	0.298	1.789
2	0.229	0.237	0.265	0.281	0.298	1.75
3	0.226	0.239	0.256	0.28	0.297	1.62
Average	0.227	0.238	0.262	0.282	0.297	1.719
% inhibition	86.780	86.14	84.725	83.601	82.690	0.0



รูป 3.17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของ
2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone

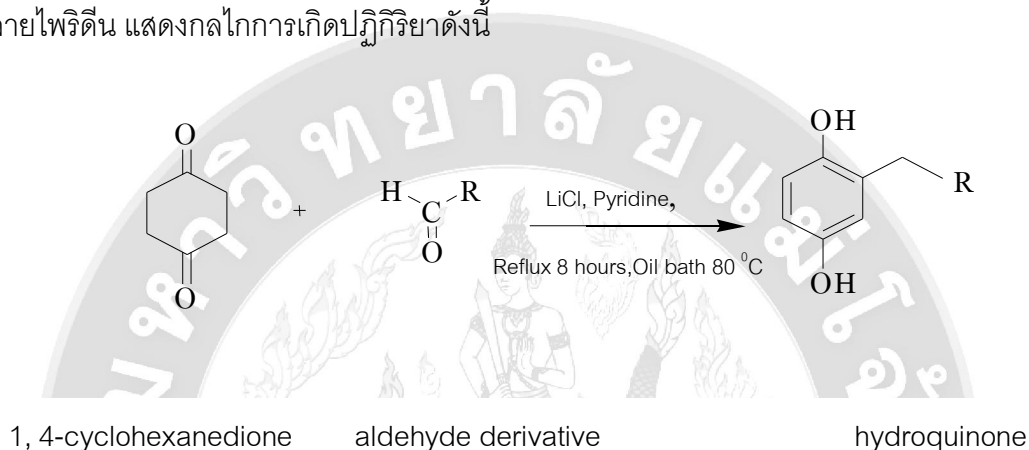
จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ concentration ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน และนำข้อมูลมาคำนวณหาค่า IC_{50} จากสมการ 3.2 ซึ่งแสดงตัวอย่างการคำนวณค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT ในข้อ 3.4.1 จากผลการคำนวณค่า IC_{50} ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 5 ชนิด พบว่า สารสังเคราะห์ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone มีค่า IC_{50} น้อยที่สุด หมายถึง ความสามารถของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงที่ปริมาณความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสารสังเคราะห์ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone จึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโลวินอกซ์และสารมาตรฐาน BHT ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค DPPH scavenging assay ที่สารสังเคราะห์ 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone มีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยสามารถแสดงการฟอกจางสีม่วงไปเป็นสีเหลืองอ่อนได้ทันทีที่ทำการพ่นสารละลาย DPPH ลงไปบนแผ่น TLC ตามด้วยสารสังเคราะห์ชนิด 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone, 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone และ 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone ตามลำดับ ผลการคำนวณค่า IC_{50} ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 4 ชนิด แสดงดังตาราง 3.16

ตาราง 3.16 แสดงผลการคำนวณค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH inhibition กับ ความเข้มข้นของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

ชื่อสาร	ค่า IC_{50} (mg/ml)
2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone	0.23
2-(2,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone	0.40
2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone	0.11
2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone	0.13
2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone	0.36
2,6-Di- tert-Butyl-1- Hydroxy-4-Methylbenzene (BHT)	0.17
Lowinox	0.21

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

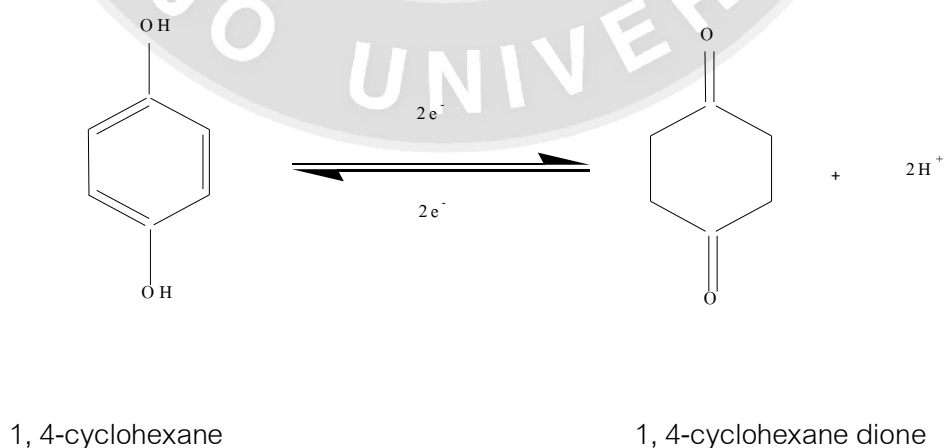
จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนโดยใช้ปฏิกิริยาลดออกซิเดชันของ 1,4-cyclohexanedione กับสารอนุพันธ์อัลดีไฮด์ ได้แก่ 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde, 2,4-dihydroxybenzaldehyde, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 3-nitrobenzaldehyde และ 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde โดยมี lithium chloride เป็นสารตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายไพริดีน แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังนี้



สามารถเขียนเป็นกลไกการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้

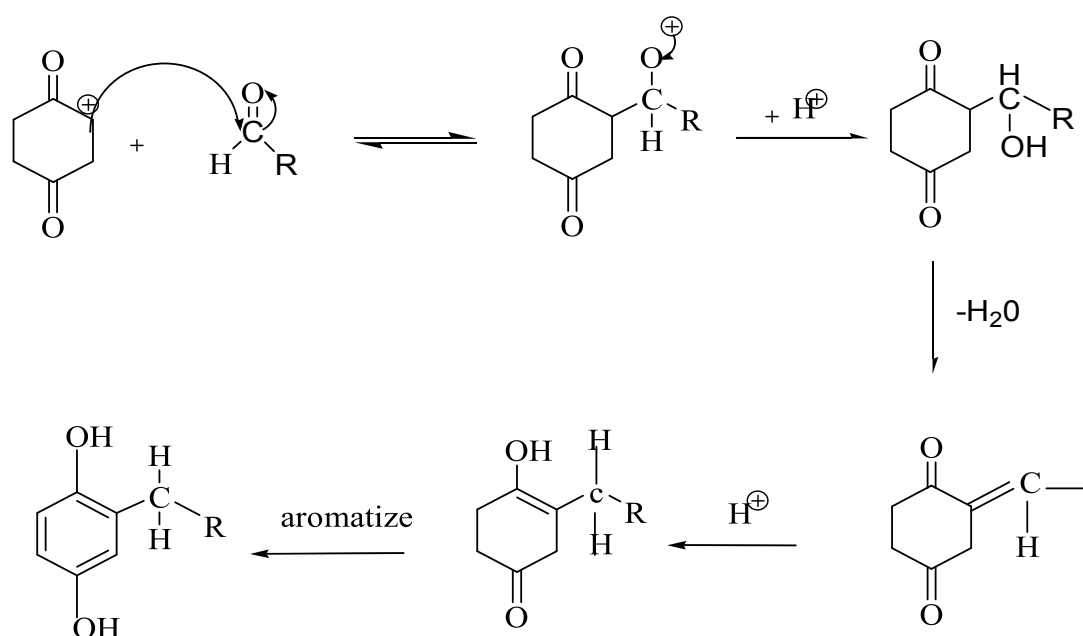
ขั้นที่ 1

โมเลกุลของสารไฮโดรควิโนนหรือ 1, 4-cyclohexane เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นเอง



ขั้นที่ 2

โมเลกุลของไฮโดรควิโนนอยู่ในสภาวะสูญเสียโปรตอนทำให้อยู่ในภาวะที่เป็นคาร์แบนไฮออน และเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของอัลดีไฮด์ตรงตำแหน่ง -C- ในหมู่คาร์บอนิล ของโมเลกุลสารอนุพันธ์อัลดีไฮด์



ผลการสังเคราะห์ พบว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 5 ชนิด เมื่ออยู่ในสภาวะของแข็งเป็นผลึกสีออกน้ำตาล และ เมื่อนำสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 4 ชนิด มาพิสูจน์เอกลักษณ์เฉพาะด้วยเทคนิค furrier transform infrared spectroscopy พบว่ามีสเปกตรัมที่แสดงหมู่ฟังก์ชันของสารที่ชัดเจน คือ ที่ประมาณ 3374-3361 cm⁻¹ (br, O-H str), 28572851 cm⁻¹ (w, C-H str of aromatic), 1473, 1637-1638 cm⁻¹ (s, C=C str of aromatic) และ 1100-1350 cm⁻¹ (s, C-O str) และเทคนิค ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy พบว่าให้สัญญาณที่สำคัญ คือ 9.10-10.15 (s, O-H), 5.27-8.79 (m, 1-7H, aromatic protons) และ 3.57-4.15 (s, 2H, -CH₂-)

เมื่อนำสารที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์ การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค DPPH scavenging test พบว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydroquinone, 2,4-dihydroxybenzaldehyde 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone และ 2-(3-nitrobenzyl) hydroquinone สามารถฟอกจางสีของ DPPH ได้ทันที แต่สารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone สามารถฟอกจางสีของ DPPH ได้ภายใน 5 วินาที เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไลวีนอกซ์และสารมาตรฐาน BHT (2,6-Di-tert,Butyl (-p-cresol)) ซึ่งผลนี้แสดงให้เห็นว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดนั้นแสดงฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เมื่อนำสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนทั้ง 4 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงปริมาณด้วยเทคนิค spectrophotometric assay ที่ความยาวคลื่น 517 nm พบว่าให้ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเชิงคุณภาพ คือ สารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(3,4-dihydroxybenzyl) hydroquinone มีค่า IC_{50} น้อยที่สุด ที่ 0.11 แสดงว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานไลวีนอกซ์

การที่สารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนชนิด 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl) hydroquinone ที่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า BHT และสารมาตรฐานไลวีนอกซ์นั้น น่าจะเป็นผลมาจากหมู่เมทอกซี (methoxy; OCH_3) ในโครงสร้างที่ทำให้ผลการต้านอนุมูลอิสระลดลง

เอกสารอ้างอิง

- แม่น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2534. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.
- ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์. 2543. เคมีวิเคราะห์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- โอภา วัชรคุปต์ และมารีรักษ์ อัดตสินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลสังเคราะห์. กรุงเทพฯ.
- Abderrahim, B.; M. Mercedes and A. Jose A. 2007. Fuel: article inpress.
- Barnwal, B.K.; M.P. Sharma; and S. Renew. 2004. Energ Rev.1:16.
- Chu, Y.H.; H.F. Hsu. 1999. Food Chem. 66:29.
- Daniele, F.; B. Valerio; N. Marcello and R. Franco. 2007. Fuel. 86:690.
- Dmytryshyn, S.L.; A.K. Dalai; S.T. Chaudhari; H.K. Mishra and M.J. Reaney. 2004. Bioresource Technol. 92: 55.
- Dorado, M.P.; E. Ballesteros; J. Lopez and M. Mittelbach. 2004. Energy Fuel.18: 77.
- Dossin, T.F.; M.F. Reyniers; G.B. Marin. 2006. Appl Catal B. 61: 35.
- Dunn, R.O. 2002. J.Am.Oil Chem. Soc. 79: 915.
- Dunn, R.O. 2005. Fuel Process Tech. 86:1071.
- Encinar, J.M; J.F. Gonzalez; and A.R. Rodriguez. 2007. Fuel Process Tech. 88:513.
- Freedman, B; T.L. Mounts. 1984. JAOCS. 61: 1638.
- Fukuda, H; A. Kondo; and H.J. Noda. 2001. Biosci Bioeng. 92: 405.
- Gunstone, F.D. 1995. Inform. 6: 1165.
- Jittinan M.; C. Warinthorn; P. Salinthip. 2001. Natural Products Research Unit. Department of Chemistry. Faculty of Science. Chulalongkorn University.
- Liang, Y.C.; C.Y. May; A.S. Foon A.S.; M.A. Ngan; C.C. Hock; and Y. Basiron. 2006. Fuel. 85: 867.
- Lihan, L.; J. Liping; and G. Chengyan. 2008. Chemico-Biological Interactions. 173: 1.

- Marchetti, J.M; V.U. Miguel; and A.Errazu.2007. Fuel. 86: 906.
- McCormick, R.L.; M. Ratcliff; L. Moens; and R. Lawrence. 2007. Fuel Process Tech. 88: 651.
- Plessis, L.M; and J.B.M. Villiers. 1985. J.Am.Oil Chem. Soc. 62: 748.
- Prathuangsuksri, S. 2005. M.S thesis, Chulalongkorn University.
- Ramadhas, A.S; S. Jayaraj; and C. Muraleedharan. 2005. Fuel. 84: 335.
- Salinthip, P; C. Warinthorn. 2005. Major petrochemistry and polymer science. Faculty of science. Chulalongkorn University.
- Tan, C.P; and Y.B. Che Man. 2002. Trends Food Sci. Technol. 13: 312.
- Thompson; J.C; C.L. Peterson; D.L. Reece. And S.M. Beck. 1998. ASAE. 41:931.
- Unchana, Y; P. Anucha. 2003. M.S thesis. Chiang Mai University.
- Zhenqiang, Y; X. Wenlei. 2007. Fuel Process. 88: 631.
- Google. "antioxidation". [online].
Available:<http://antioxidants.spaces.live.com/blog/cns/>. Retrieved: March 14, 2010.
- Google. "BHT". [online].
Available:[http:// http:// http://en.wikipedia.org/wiki/Butylated_hydroxytoluene](http://http://http://en.wikipedia.org/wiki/Butylated_hydroxytoluene).
Retrieved: March 2, 2010.
- Google. "Hydroquinone". [online].
Available:[http:// http://chemtrack.org/Chem-Abstract.asp](http://http://chemtrack.org/Chem-Abstract.asp). Retrieved: March 2, 2010.