

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนแบบเคมีสีเขียวโดยใช้สารสกัด
จากเปลือกมังคุดเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using
Garcinia mangostana Linn. for Antibacterial

ปวีณา ปรวัฒน์กุล* มณฑกานต์ ทองสม** พรไพลิน ชาวสุข*** และ ตอยิบ๊ะ ดอละหะหมิ***

Paweena Porrawatkul*, Montakarn Thongsom**, Pornpailin Khaosuk***
and Toyibah Dolohmi***

บทคัดย่อ

มีการรายงานการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนแบบเคมีสีเขียว(AgNPs) ในสภาวะต่างๆ โดยใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดเป็นตัวรีดิวซ์ สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ คือสารละลายมี pH เท่ากับ 7 และใช้เวลาในการสังเคราะห์ 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ผลการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนยืนยันได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย และเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry ซึ่งปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 420 นาโนเมตร ที่เป็นลักษณะเฉพาะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ องค์ประกอบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนยืนยันได้ด้วยเทคนิค FTIR และ SEM-EDXA และผลจาก SEM แสดงถึงขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 100-200 นาโนเมตรและพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ดีอีกด้วย

คำสำคัญ: อนุภาคซิลเวอร์นาโน, มังคุด, ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

* อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
e-mail: paweena.n@gmail.com

** อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

*** นักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

Abstract

The Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) at a different condition using rind extract of *Garcinia mangostana* Linn. (Mangosteen) as reducing agent is reported. Optimum nanoparticle production was achieved at pH 7, a reaction temperature 80 °C and reaction time 5 hour. The synthesized AgNPs were confirmed by color transformation and UV-visible spectrophotometry. The UV-visible spectroscopic analysis showed the absorbance peak at 420 nm which indicated the synthesis of silver nanoparticles. Composition analysis obtained from FTIR and SEM–EDXA confirmed the presence of elemental signature of silver. SEM showed that the sizes of the synthesized AgNPs ranged from 100 to 200 nm. In addition, the synthesized AgNPs showed a moderate antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: Silver nanoparticles, *Garcinia mangostana* Linn. Antibacterial activity

1. บทนำ

ปัจจุบันนาโนเทคโนโลยีของโลหะเป็นที่สนใจของนักวิจัยหลายกลุ่ม เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารชนิดเดียวกันที่มีขนาดใหญ่ (Song, Kwon & Kim, 2010) ขนาดของอนุภาคนาโนที่นำไปประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1–100 นาโนเมตร ซึ่งเป็นระดับขนาดที่มีความน่าสนใจทางนาโนเทคโนโลยีเป็นอย่างมาก (Dahl, Mqddux & Hutchison, 2007) และมีโลหะมากมายที่นำมาสังเคราะห์ให้มีขนาดระดับนาโนเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น โลหะเงิน (Silver, Ag) โลหะทอง (Gold, Au) โลหะทองแดง (Copper, Cu) เป็นต้น (Albrecht, Evans & Raston, 2006, Smith, *et al.*, 2006)

การสังเคราะห์เคมีสีเขียว (Green synthesis) เป็นวิธีที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทางชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยใช้สารจากธรรมชาติเป็นตัวรีดิวซ์ และใช้ตัวทำละลายที่ไม่เป็นพิษ (Anstas & Warner, 1998) โลหะที่สังเคราะห์ให้มีขนาดระดับนาโนโดยวิธีเคมีสีเขียวจะมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์ทางเคมีและทางชีวภาพที่ดีกว่าโลหะที่มีขนาดใหญ่ และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ เช่น การประยุกต์ใช้ทางอิเล็กทรอนิกส์ ออปติก และทางสิ่งแวดล้อมได้ดี (Hussain, *et al.*, 2004; Burtleson, Driessen & Penn, 2004)

อนุภาคนาโนเงินหรือซิลเวอร์นาโน (Silver nanoparticles) ปัจจุบันมีการนำมาประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้าน ไม่ว่าจะเป็นทางด้านสุขภาพ โดยมีการทดสอบแล้วว่าปลอดภัยต่อร่างกาย เนื่องด้วยปริมาณที่น้อยมากนี้จึงไม่มีผลข้างเคียงใดๆ ต่อร่างกาย เนื่องจากซิลเวอร์เป็นธาตุเฉื่อยที่มีอยู่ในธรรมชาติ จึงนำมาใช้งานกับมนุษย์ได้ เช่น ใช้ซิลเวอร์ผสมในน้ำยาบ้วนปาก เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ใช้เป็นส่วนผสมในวัสดุทำหน้ากากปิดปาก ปิดจมูก และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในสีทาบ้าน และเป็นส่วนผสมของเส้นใยในแผ่นกรองอากาศ

(Xiu, *et al.*, 2012) ดังนั้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็นหัวข้อวิจัยที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากประโยชน์ของซิลเวอร์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายและเห็นผลชัดเจน โดยเฉพาะคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Rajakannu, Shankar, & Subramanian, 2015; Baghizadeh, *et al.*, 2015)

วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนมีหลายวิธี ได้แก่ การสังเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ปฏิกิริยาทางเคมีและเคมีโฟโตเคมีคัล (Chemical and photochemical reaction) การสลายตัวโดยใช้ความร้อน (Thermal decomposition method) กระบวนการทางอิเล็กโทรเคมีคัล (Electrochemical method) และการใช้ไมโครเวฟในการสังเคราะห์ (Microwave assisted synthesis) เป็นต้น (Rajakannu, Shankar & Subramanian, 2015) ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนดังกล่าวจะใช้เวลาไม่มาก และได้อนุภาคนาโนที่มีคุณภาพดี แต่ใช้สารเคมีที่มีราคาแพง มีพิษเป็นรีดิวซ์เชิงเอเจนต์ เพื่อให้ขนาดของอนุภาคนาโนมีความเสถียร เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) โซเดียมโบรมไฮไดรด์ (Sodiumbromohydride) และไตรโซเดียมซิเตรท (Trisodiumcitrate) เป็นต้น ดังนั้นความต้องการในการใช้วิธีเคมีสีเขียวเพื่อสังเคราะห์ทางนาโนเทคโนโลยีจึงเพิ่มมากขึ้น (Viswade, *et al.*, 2015) ซึ่งการสังเคราะห์ทางเคมีสีเขียวของอนุภาคนาโนจะใช้สารสกัดจากพืช ในการสังเคราะห์ พบว่าเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัด ไม่ต้องใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีนักวิจัยมากมายที่ได้รายงานการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้สารสกัดจากพืช เช่น เมล็ดคาแฟอราบิกา และเมล็ดและใบของดอกพิกการอง (Dhand, *et al.*, 2016; Manjamadha & Muthukumar, 2016)

ในบทความนี้มีเนื้อหาครอบคลุมเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) โดยใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) เนื่องจากเปลือกมังคุดมีสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญอยู่ในกลุ่มแซนโทน (Xanthones) และมีสารประกอบหลักเป็น α -mangostin ที่โมเลกุลมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่ซิลเวอร์ไอออนได้ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เป็นต้น และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี (Khumsupan & Gritsanapan, 2014) เป็นพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นตามฤดูกาล โดยใช้วิธีการสกัดแบบ Solid/Liquid Extraction (SLE) และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ได้แก่ pH อุณหภูมิของปฏิกิริยา และเวลา ด้วยเทคนิค UV-Visible spectroscopy ศึกษาลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscope (SEM) และศึกษาความบริสุทธิ์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDAX) รวมถึงศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) และ *Escherchia coli* (*E.coli*) ด้วยวิธีการแพร่สารละลาย ในวุ้น (Agar well diffusion method)

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 สารเคมี

ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) กรดไนตริก (HNO_3) สารละลายมาตรฐาน Mcfaland Standard No.0.5 ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) ตัวทำละลาย DMSO (Dimethyl Sulfoxide) เอทานอล (Ethanol) 70% และ 95% เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

และ *Escherichia coli* อาหารเชื้อ Natrient Broth (NB) Agar powder Bacteriological และ Mueller Hinton Broth(MHB)

2.2 เครื่องมือทางเคมี

UV-Visible Spectrophotometers (Thermo scientific) pH Meter, Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier transform Infrared Spectrometer (Perkin Elmer (Spectrum one)/Bruker) Laminar air flow cabinet (Bio-II-A) Incubator (Memert) Auto Clave (Tomy SS – 325) Hot Air Oven (Memert)

2.3 วิธีการวิจัย

2.3.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกมังคุด

เก็บตัวอย่างมังคุดผลสุกจาก ตำบลท่าจั่ว อำเภอพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม 2558 นำเปลือกมังคุดจากผลสุกซึ่งมีเปลือกมีลักษณะเกลี้ยงมีสีม่วงเข้มตัดขาวออก และล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเปลือกมังคุดแห้ง 2.5 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 100 มิลลิลิตร ในปีกเกอร์นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้จากการกรองไปใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

2.3.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

2.3.2.1 ศึกษาสภาวะความเป็นกรด - เบส

ปิเปตสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ได้จากการกรองใส่ในปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 95 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับค่า pH4.5 pH7 และ pH10 ตามลำดับ ด้วยสารละลาย 3 โมลาร์ NaOH และ 3 โมลาร์ HNO_3 โดยใช้ pH meter นำสารละลายไปให้ความร้อนโดยวางบนเตาให้ความร้อนที่ให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 250–750 นาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV – Visible Spectrophotometry

2.3.2.2 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์

ปิเปตสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ได้จากการกรองใส่ในปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 95 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับสภาวะความเป็นกรดเบสและเวลาในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม และนำไปให้ความร้อนบนเตาให้ความร้อนโดยเปลี่ยนแปลงเวลาที่ 15 นาที 1 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ อุณหภูมิของสารละลาย 80 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 250–750 นาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry

2.3.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการสังเคราะห์

ปิเปตสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ได้จากการกรองใส่ในปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 95

มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับสภาพความเป็นกรดเบสและเวลาในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม และนำไปให้ความร้อนบนเตาให้ความร้อนโดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสารละลายเป็นอุณหภูมิห้อง 60 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 250-750 นาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry

2.3.3 การทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุด อนุภาคซิลเวอร์นาโน และสารละลาย $AgNO_3$

เตรียมสารสกัดจากเปลือกมังคุดแก่ อนุภาคซิลเวอร์นาโน และสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร ให้ได้ 5 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้น

2.3.4 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบสำหรับการทดลอง

นำแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* จากหลอดเชื้อบริสุทธิ์ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak Plate บนอาหารวุ้น Nutrient Agar (NA) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะได้แบคทีเรียอยู่ในระยะ Stationary Phase โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 - 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ณัฐกานต์ วงศ์สีสม จามจรี จินะตา และบุษบา มะโนแส, 2557) นำแบคทีเรียที่บ่มไว้มาปรับค่าความขุ่นให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน Mcfarland 0.5 จากนั้นเจือจางแบคทีเรียที่ได้นั้น 10 เท่า (มีจำนวนเซลล์ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) (สุคนธ์ ต้นดิไพบูลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี และเพชรลดา เดชาฮีนยง, 2012)

2.3.5 ขั้นตอนการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย

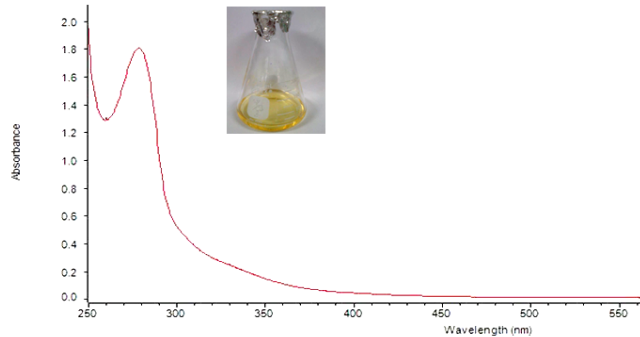
ก่อนนำอาหาร Mueller Hinton Agar มาใช้ในการทดสอบกับเชื้อ ควรนำ plate ไปทำให้แห้ง ไม่มีหยดน้ำหรือไอน้ำ โดยนำไปวางในตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30-37 °C หรือในตู้ laminar flow ไม่เกิน 30 วินาที (ประสาทร บิริสุทธิ, เพ็ชรพิทย กาญจบุตร และสาธิต พรตระกูลพิพัฒน์, 2551) จากนั้นนำเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ที่เตรียมไว้มา swab ให้เจริญบน Mueller-Hinton agar ใช้ Cotton Swabs ที่ปลอดเชื้อจุ่มเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ให้ชุ่ม และบิดให้หมาดๆ มา swab ให้ทั่วบนอาหาร MHA และตั้งทิ้งไว้ไม่ให้ขึ้นประมาณ 15 วินาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจาะหลุมด้วยปลาย Tip ขนาด 200 ไมโครลิตร และเชียวุ่นที่เจาะทิ้งด้วยไม้จิ้มฟัน จากนั้นปิเปตตัวอย่างใส่หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้น 100 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลุม Negative Control, Positive Control

3. ผลการวิจัย

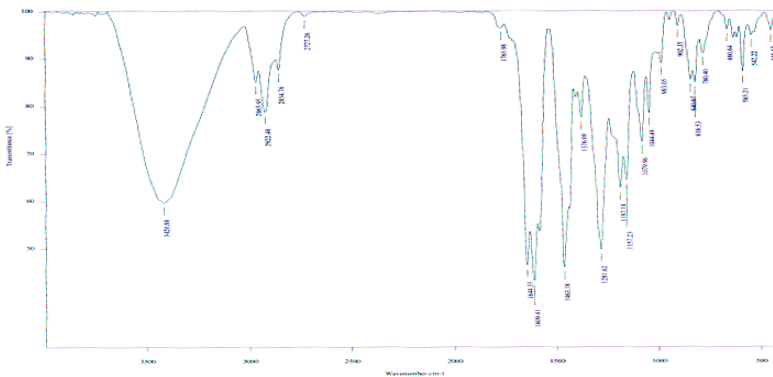
3.1 ผลการสกัดเปลือกมังคุดและการพิสูจน์ลักษณะของสารสกัด

สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เป็นสารละลายสีเหลืองใส และนำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry ที่ความยาวคลื่นในช่วง 250 -750 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ระเหยตัวทำละลายออก

ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำของแข็งหนักที่ได้ไปศึกษาการสั่นของพันธะในองค์ประกอบของสารสกัดด้วย FTIR spectroscopy ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 1



(ก)

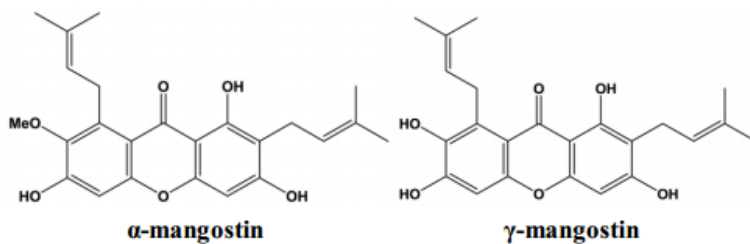


(ข)

ภาพที่ 1 (ก) UV-Visible สเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

(ข) FTIR สเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

จาก UV-Visible สเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกมังคุดปรากฏที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 258 และ 276 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่สอดคล้องกับสารประกอบกลุ่ม Xanthones ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในมังคุดที่มีรายงานว่ามีการดูดกลืนแสงในช่วง 200-300 นาโนเมตร (Limei, *et al.*, 2007) และจากงานวิจัยของ Khumsupan & Gritsanapan (Khumsupan & Gritsanapan, 2014) ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acne* ของสารสกัดส่วนต่างๆ ของมังคุด ได้แก่ ผล เปลือก และเมล็ดใน ตัวทำละลายเอทานอล พบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ มีสารประกอบกลุ่ม Xanthone โดยเฉพาะสารกลุ่ม *mangostin* และจากผลของ FTIR สเปกตรัมปรากฏพีกที่ช่วงเลขคลื่นต่างๆ ที่สอดคล้องกับโครงสร้างของ Xanthone ข้อมูลแสดง ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Orozco & Failla (Orozco & Failla, 2013) ที่กล่าวถึงสเปกตรัมของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของมังคุดที่เป็นสารกลุ่ม *mangostin* โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2



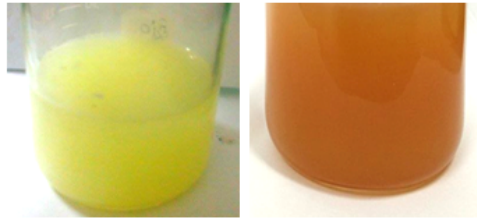
ภาพที่ 2 โครงสร้างของ α -mangostin และ γ -mangostin ในมังคุด
ที่มา: Orozco & Failla, 2013.

ตารางที่ 1 ค่าเลขคลื่นที่ปรากฏใน FTIR สเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

เลขคลื่น (cm ⁻¹)	แถบการดูดกลืนแสงหมู่ฟังก์ชัน
3420.88	แถบการยืดของหมู่ OH
2965.95 – 2854.76	แถบการยืดของ C – H ของ alkanes
1765.98 – 1609.41	แถบการยืดของ C = O
1644.55 – 1609.41	แถบการยืดของ C = C บนวงแหวนเบนซีน
902.35 – 818.53	แถบการงอของหมู่ OH
780.40	แถบการงอของ C – H ของ Ethyl

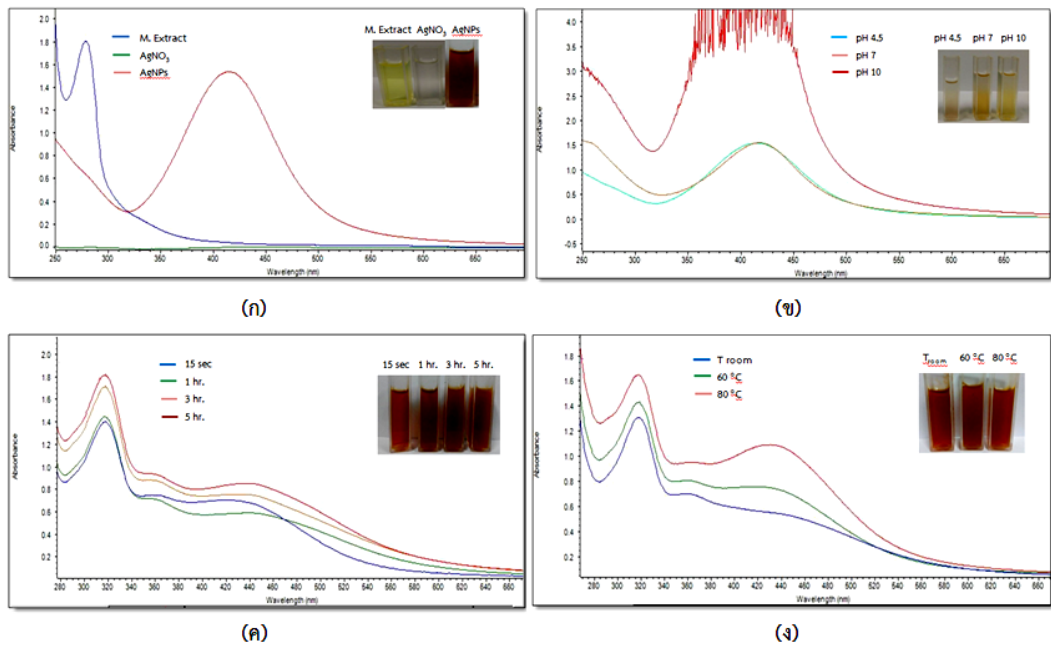
3.2 ผลการศึกษาปัจจัยในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

งานวิจัยนี้ได้นำสารสกัดจากเปลือกมังคุดมาสังเคราะห์ทางชีวภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ได้จากการกรองมา 10 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย AgNO₃ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 95 มิลลิลิตร จะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย AgNO₃ จากใสไม่มีสีเป็นเหลืองน้ำตาลเข้ม ดังภาพที่ 3 เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของซิลเวอร์ไอออน (Ag⁺) เกิดเป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโน (Khandelwal, *et al.*, 2010) ซึ่งติดตามการเปลี่ยนแปลงได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง ความยาวคลื่นในช่วง 250-750 นาโนเมตร ผลแสดงดังภาพที่ 4 (ก) สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น AgNO₃ และ สารสกัดจากเปลือกมังคุด พบว่าวิธี-วิธีเบิลสเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 420 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajakannu และคนอื่นๆ (Rajakannu, Shankar, & Subramanian, 2015) ที่แสดง UV-Visible สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 430 นาโนเมตร



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนสีของสารละลาย $AgNO_3$ เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับสารสกัดจากเปลือกมังคุด

จากการศึกษาปัจจัยของความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยาที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy ผลแสดงดังภาพที่ 3 (ข) – (ง)



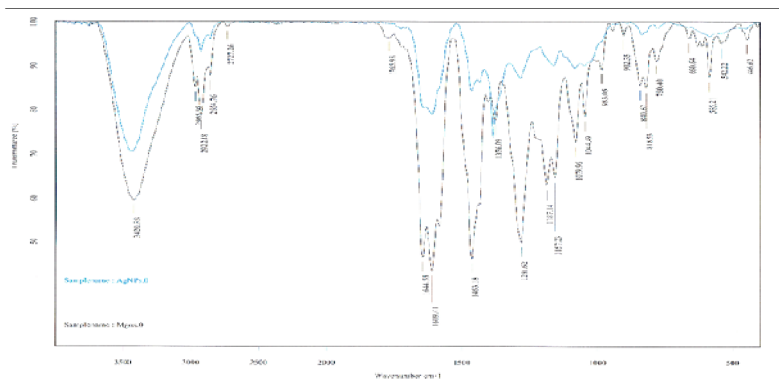
ภาพที่ 4 (ก) UV-Visible สเปกตรัมของสารสกัดมังคุด อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) และ $AgNO_3$
 (ข) UV-Visible สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ pH4.5 pH7 และ pH10
 (ค) UV-Visible สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนสังเคราะห์ที่เวลา 15 นาที 1 ชั่วโมง 3 ชั่วโมงและ 5 ชั่วโมง
 (ง) UV-Visible สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนสังเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง 60 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส

จาก UV-Visible สเปกตรัมในภาพที่ 4 (ข) (ค) และ (ง) สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดคือที่ pH7 ซึ่งเป็นสภาวะที่เป็นกลาง ซึ่งที่ pH10 จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด แต่สเปกตรัมไม่สมบูรณ์เนื่องจากที่ pH10 มีความเข้มข้นของไฮดรอกไซด์ OH^- มากอาจไปตกตะกอนกับ Ag^+ เกิดเป็น $AgOH$ ซึ่งจะเห็นเป็นตะกอนขาวพุ่งเกิดขึ้นในขณะนำ

สารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และจากผลของอุณหภูมิและเวลา จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 80 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 5 ชั่วโมง

3.3 ผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค FTIR และ SEM-EDAX

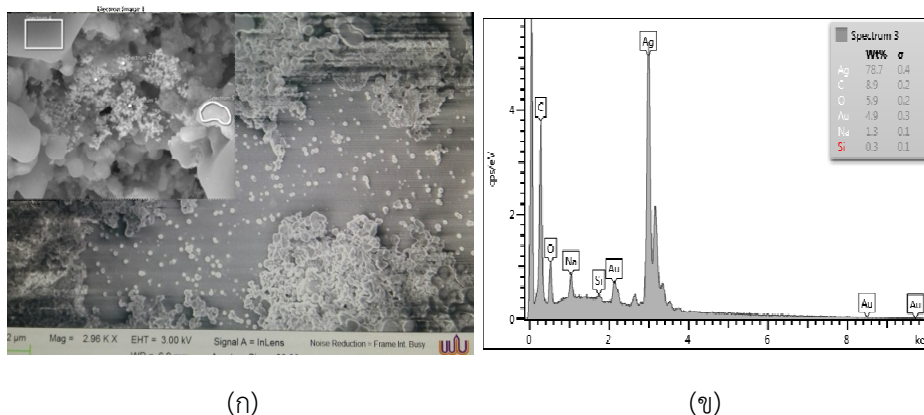
ในการศึกษาลักษณะอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR พบว่า FTIR สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมเมื่อเปรียบเทียบกับ FTIR สเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกมังคุดแสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 FTIR สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนเปรียบเทียบกับ FTIR สเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

จากภาพที่ 5 FTIR สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโน มี %Transmittance ที่ตำแหน่งเลขคลื่นต่างๆ ลดลง เมื่อเทียบกับสเปกตรัมของสารสกัด และตรงตำแหน่งแถบการยืดของ O-H มีแนวโน้มที่สเปกตรัม broad มากขึ้น แสดงให้เห็นถึงการรีดิวซ์ไอออนของสารสกัดไปยังซิลเวอร์ไอออน (Manjamadha & Muthukumar, 2016) และสเปกตรัมในตำแหน่งเลขคลื่นช่วง 400–1300 cm^{-1} สเปกตรัมมี %Transmittance ต่ำมาก ซึ่งเกิดจากการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของหมู่ฟังก์ชันในสารสกัดซึ่งให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ahmed (Ahmed, *et al.*, 2015)

ในการศึกษาขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค SEM ที่ 3.00kV กำลังขยาย 2,960 เท่า พบว่าลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดอยู่ในช่วง 100–200 นาโนเมตร ผลแสดง ดังภาพที่ 6 (ก)

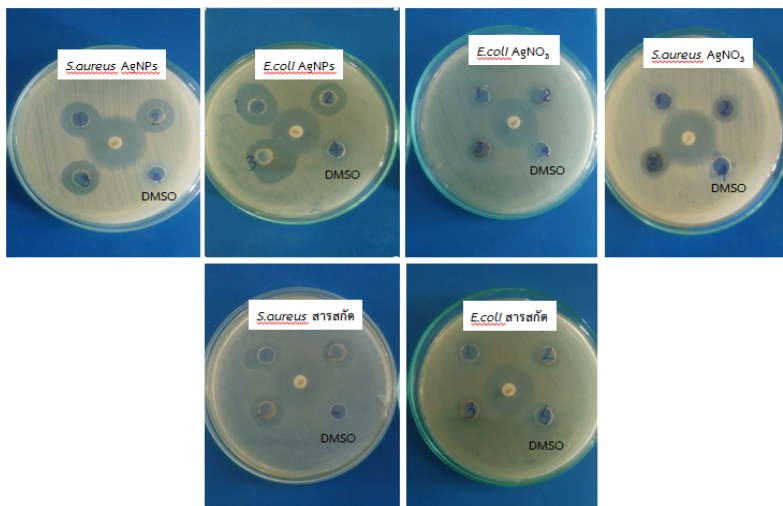


ภาพที่ 6 (ก) ลักษณะและขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ศึกษาด้วยเทคนิค SEM
(ข) EDAX สเปกตรัมของ AgNPs

จากผล EDAX สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้ดังภาพที่ 6(ข) แสดง optical สเปกตรัมอยู่ในช่วงประมาณ 3 keV ซึ่งเป็นช่วงของซิลเวอร์ที่เกิดจาก surface plasmon resonance (SPR) (Kalimuthu, *et al.*, 2008) และเครื่องมือนี้สามารถคำนวณปริมาณของธาตุองค์ประกอบของอนุภาคของแข็งของซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งพบว่ามีปริมาณซิลเวอร์ร้อยละ 78.7 และ C, O ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากเปลือกมังคุดร้อยละ 8.9 และ 5.9 ตามลำดับ ดังนั้นจากผล EDAX สามารถยืนยันได้ว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้เป็นอนุภาคของซิลเวอร์ (Ag)

3.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli* ด้วยสารสกัดจากเปลือกมังคุด อนุภาคซิลเวอร์นาโน และ $AgNO_3$ ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* และ *E.coli* ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ สารสกัดจากเปลือกมังคุด และ $AgNO_3$ ดังแสดงในภาพที่ 7 ซึ่งดูได้จากขนาดของวงใสในการยับยั้ง เมื่อศึกษาขนาดของวงใสในการยับยั้งของสารสกัดจากเปลือกมังคุด อนุภาคซิลเวอร์นาโน และ $AgNO_3$ ที่ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีค่าเฉลี่ยของวงใสการยับยั้ง *S.aureus* และ *E.coli* สูงสุด รองลงมาคือ ซิลเวอร์ไนเตรต และสารสกัดจากเปลือกมังคุด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 7 ผลการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli* ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด, $AgNO_3$ และ AgNPs ในตัวทำละลาย DMSO

ขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.aureus* และ *E.coli* แสดงดังตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่า สารละลาย $AgNO_3$, สารสกัด และ AgNPs สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* โดย AgNPs ที่เตรียมจากสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีค่า Inhibition Zone เท่ากับ 35.25 ± 5.80 มิลลิเมตร ของเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* และ 34 ± 4.70 มิลลิเมตร ของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ซึ่งมีค่ามากกว่าสารละลาย $AgNO_3$ และสารสกัดจากเปลือกมังคุด ในขณะที่สารละลาย $AgNO_3$ มีค่า Inhibition Zone มากกว่าสารสกัด

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดอนุภาคซิลเวอร์นาโน และสารละลาย $AgNO_3$ ในตัวทำละลาย DMSO เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion method

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	ขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญ (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, มิลลิเมตร)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
สารสกัดจากเปลือกมังคุด	DMSO	30.75 ± 9.70	28.20 ± 8.80
ซิลเวอร์ไนเตรต	DMSO	31.00 ± 13.80	30.33 ± 11.10
อนุภาคซิลเวอร์นาโน	DMSO	35.25 ± 5.80	34.00 ± 4.70

4. สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากการใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดในตัวทำละลายเอทานอลเป็นรีดิคซิงเอเจนต์ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางแบบเคมีสีเขียว โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ ได้แก่ ความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิใน

การทำปฏิกิริยาและเวลา และติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์คือสารละลายที่สภาวะ pH เท่ากับ 7 โดยใช้เวลาในการสังเคราะห์ 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้ได้อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีปริมาณมากกว่าสภาวะอื่นๆ โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสง และจากการศึกษาลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry และ FTIR สามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดสามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ เมื่อศึกษาขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค SEM พบว่าขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 100-200 นาโนเมตร และจากผลของ EDAX ยืนยันได้ว่าของแข็งที่สังเคราะห์ได้มีองค์ประกอบของ Ag

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดโดยวิธีการสกัดเย็นด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* (อุดมลักษณ์ สุขอัครตะ และคนอื่นๆ, 2549) และจากการศึกษาของ สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี และเพชรดา เดชาเย็นง (สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี และเพชรดา เดชาเย็นง, 2012) พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยอะซีโตนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus*, *Bacillus subtilis*, *E.coli*, และ *Salmonella typhimurium* ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด อนุภาคซิลเวอร์นาโน และ $AgNO_3$ ต่อการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* และ *E.coli* พบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rajakannu, Shankar, & Subramanian (Rajakannu, Shankar & Subramanian, 2015) ซึ่งพบว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่นำมาสังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *S.aureus* และ *E.coli* ได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยน้ำได้อย่างมีนัยสำคัญ

เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้จากการสังเคราะห์แบบเคมีสี่เหลี่ยมทำให้อนุภาคซิลเวอร์มีขนาดเล็ก (100-200 นาโนเมตร) จึงมีความสามารถในการที่จะเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีมากขึ้น ซึ่งอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีประจุบวก (Ag^+) เมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จะสามารถแพร่ประจุบวกไปเกาะตามผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดการการรวมตัวของ DNA เกิด DNA condensation และยับยั้งกระบวนการทำงานของการขนส่งสารเข้าออกระหว่างเซลล์ การหายใจระดับเซลล์ และหลังจากนั้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนจะเกิดการสลายตัว และปลดปล่อย silver ion (Ag^+) ที่มีขนาดเล็กและจำนวนมากออกมาฆ่าแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว (Rai, et al., 2009) ดังนั้นจากการทดลองครั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่จะนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ทางชีวภาพ ไปใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารและเภสัชเคมี รวมถึงการนำพืชชนิดอื่นๆ ที่มีในท้องถิ่นไปสกัดเพื่อเป็นรีดิคซ์เชิงเอเจนต์ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการดำเนินงานจากสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช และขอขอบคุณ ดร.รุ่งนภา พิมเสน อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช สำหรับคำปรึกษาในการทำวิจัยครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- ณัฐกานต์ วงศ์สีสม จามจุรี จินะตา และบุษบา มะโนเส. (2557). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น. **วารสารวิจัยและพัฒนาจร.** 37(1), 1-14.
- ประสาธ พรวริสุทธิ์เพ็ชร พิทย กัญบุตร และสาธรร พรตระกูลพิพัฒน์. (2551). การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ, ในรายงานการประชุมวิชาการสัตวแพทย์ศาสตร์ มข. ครั้งที่ 9 วันที่ 11-12 มิถุนายน พ.ศ. 2551 (หน้า 91-101). ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุคนธ์ ต้นตีโพบูลย์วุฒิ เทียนชัย น่วมเศรษฐี และเพชรลดา เดชาเย็นง. (2012). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด. **KKU Res. J.** 17(6), 880-894.
- อุดมลักษณ์ สุขอิตตะ ประภัสสร รักษาวร พจมาน พิศเพียงจันทร์ และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. (2549). การสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด, ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 วันที่ 30 มกราคม ถึง 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549 (หน้า 250-257). กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ahmed, M.; Murtaza, G.; Mehmood, A. & Bhatti, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Skimmia laureola*: Characterization and antibacterial activity. **Materials Letters**, 153, 10-13.
- Albrecht, M. A.; Evans, C. W. & Raston, C. L. (2006). Green chemistry and the health implications of nanoparticles. **Green Chemistry**, 8, 417-432.
- Anstas, P. T. & Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. New York: Oxford University Press, 30.
- Baghizadeh, A.; Ranjbar, S.; Gupta, V. K.; Asif, M.; Pourseyedi, S.; Karimi M. J. & Mohammadinejad, R. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. **Journal of Molecular Liquids**, 207, 159–163.
- Burleson, D. J.; Driessen, M. D. & Penn, R. L. (2005). On the characterization of environmental nanoparticles, **J Environ Sci Health**, A(39), 2707.
- Dahl, J. A.; Maddux, B. L. & Hutchison, J. E. (2007). Toward greener nanosynthesis. **Chem Rev**, 107, 2228-2269.
- Dhand, V.; Soumya, L.; Bharadwaj, S.; Chakra, S.; Bhatt, D. & Sreedhar, B. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. **Materials Science and Engineering**, 58, 36–43.

- Hussain, I.; Brust, M.; Papworth, A. J. & Cooper Al. (2003). Preparation of Acrylate-Stabilized Gold and Silver Hydrosols and Gold-Polymer Composite Films, **Langmuir**, 19(11), 4831-4835.
- Jung, H. A.; Su, B. N.; Keller, W. J.; Mehta, R. G. & Kinghorn, A. D. (2006). Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54(6), 2077-2082.
- Kalimuthu K.; Suresh, B. R.; Venkataraman, D.; Bilal, M. & Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 65(1), 150-153.
- Khandelwal, N.; Singh, A.; Jain, D.; Upadhyay, M. K. & Verma, H.N. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their activity. **Digest. J. Nanomater. Biostruct.**, 5, 483-489.
- Khumsupan, P. & Gritsanapan, W. (2014). Anti-acne activity of *Garcinia mangostana* L, **A review, Plant Science Today**, 1(3): 147-150.
- Limei, Y.; Mouming, Z.; Bao, Y.; Qiangzhong, Z. & Yueming, J. (2007). Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, 104, 176-181.
- Manjamadha, V. P. & Muthukumar, K. (2016). Ultrasound assisted green synthesis of silver nanoparticles using weed plant, **Bioprocess Biosyst Eng.**, 39, 401-411.
- Orozco, F. G. & Failla, M. L. (2013). Biological Activities and Bioavailability of Mangosteen Xanthenes: A Critical Review of the Current Evidence. **Nutrients**, 5, 3163-3183.
- Rai, M. K.; Deshmukh, S. D.; Ingle, A. P. & Gade, A. K. (2009). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **J. Appl. Microbiol.**, 112(5), 841-852.
- Rajakannu, S.; Shankar, S. & Subramanian, S. (2015). Original Research Article Biosynthesis of silver Nanoparticles using *Garcinia mangostana* Fruit Extract and their Antibacterial, Antioxidant Activity. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, 4(1), 944 – 952.
- Smith, A. M.; Duan, H.; Rhyner, M. N.; Ruan, G. & Nie, S. A. (2006). A systematic examination of surface coatings on the optical and chemical properties of semiconductor quantum dots. **Phys Chem Chem Phys.**, 8, 3895-3903.
- Song, J. Y.; Kwon, E. Y. & Kim, B. S. (2010). Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract. **Bioprocess Biosyst Eng.**, 33, 159-64.

- Viswade, V. A.; Posa, V. R.; Uppara, V. G.; Jorepalli S. & Somola, A. R. (2015). Facile Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Limonia Acidissima* Leaf Extract and its Antibacterial Activity. **BioNanoSci**, 5, 97-103.
- Xiu, Z. M.; Zhang, Q. B.; Puppala, H. L.; Colvin, V. L. & Alvarez, P. J. (2012). Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. **Nano Lett.**, 12, 4271–4275.