การเตรียม DPPH และสารอนุพันธ์
Preparation of DPPH and Its Derivatives

วันเพ็ญ วสุพงษ์พันธ์[1]* และพรชัย เปรมไกรสร[2]

[1]อาจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพฯ 10160

[2]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพฯ 10160

บทคัดย่อ

บทความนี้ได้รวบรวมงานวิจัยที่แสดงขั้นตอนของการเตรียมอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และอนุพันธ์ของสารนี้ขึ้นมา ซึ่งสารรายทางที่สำคัญในขบวนการอันหนึ่ง คือ diarylhydrazine พร้อมกันนี้ยังได้รายงานแนวทางการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาและยังได้แสดงให้เห็นว่ามีการพัฒนาการเตรียม DPPH และสารอนุพันธ์ DPPH อื่น ๆ ขึ้นมาได้นอกเหนือจาก DPPH

Abstract

This article reviews literatures concerning preparation of stable free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and its derivatives. The key intermediate playing an important role is diarylhydrazine. The article reports solution methods for problems in each step of the reaction. In addition, it also shows the development of DPPH synthesis and other stable free radical DPPH derivatives, besides DPPH.

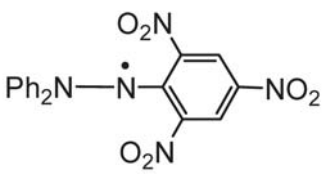
คำสำคัญ : อนุมูลอิสระ DPPH สารต้านอนุมูลอิสระ

Keywords : DPPH, Free Radical, Antioxidant

* *ผู้นิพนธ์ประสานงานไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ wanpwas@yahoo.com , pornchai.p@siam.edu โทร. 08 6644 9925*

1. บทนำ

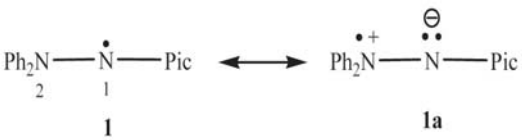
นับตั้งแต่ Stefan Goldschmidt และ Konrad Renn สังเคราะห์อนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 1 ภาพด้านล่าง) ขึ้นมาบนโลกครั้งแรกเมื่อเกือบศตวรรษที่แล้ว (ค.ศ. 1922) นักวิทยาศาสตร์ทั้งสองท่านได้เสนอโครงสร้างสารนี้ไว้อย่างน่าสนใจ และภายหลังมีการพิสูจน์โครงสร้างซึ่งก็สอดคล้องกับโครงสร้างเดิมที่ท่านทั้งสองเสนอไว้ (Williams, 1966; 1967) DPPH เป็นสารที่มีสีม่วงคล้ายด่างทับทิม ในทางการค้าจะเป็นผลึกผสม (จุดหลอมเหลว 135 °C, dec) (Sigma-Aldrich, 2012) สารนี้มีโครงสร้างผลึกได้หลายแบบ เช่น DPPH-I (จุดหลอมเหลว 106 °C) เป็น Orthorhombic, DPPH-II (จุดหลอมเหลว 137 °C) เป็น Amorphous และ DPPH-III (จุดหลอมเหลว 128-129 °C) เป็น triclinic เป็นต้น (Kiers et al., 1976; Zilić et al., 2010)



2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH (**1**)
(deep purple solid)

ค.ศ. 1952 Kaufmann และ Korfhage (Kaufmann and Korfhage, 1953) พบว่า DPPH สามารถทำปฏิกิริยากับ Tocopherol ได้ ต่อมา Blois (1958) ได้พัฒนาโดยนำ DPPH ไปใช้พัฒนาเป็นสารประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารที่มาจากสิ่งมีชีวิต (Biological Materials) โดยการเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อน จากนั้นก็มีรายงานในด้านนี้พร้อมกับรีวิวในด้านนี้ออกมาอีกจำนวนมาก (Sánchez-Moreno, 2002; Huang et al., 2005; Shahidi and Ho, 2007; Liu, 2010)

โดยธรรมชาติ DPPH เกิดการสลายตัวน้อย และสามารถต้านการเกิดการรวมตัวกันเองได้ (Dimerization) โดยเกิด Conconical Form **1a** ที่ช่วยทำให้โครงสร้างมีเสถียรภาพโดยคู่อิเล็กตรอนที่ N(1) ของ **1a** เกิด Delocalization ได้ดีกว่าโครงสร้างแบบ **1** (ดังรูปที่ 1) (Walter, 1966; Poirier et al., 1952)



1 **1a**

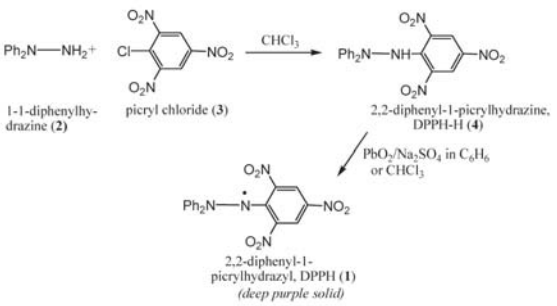
รูปที่ 1 แสดงการสร้างเสถียรภาพของ DPPH

ประโยชน์ของ DPPH ยังมีการนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานใน ESR (Electron Spin Resonance) (Chen et al., 1961a; Chen et al., 2009) และมีการเตรียม Diradical เพื่อนำไปใช้เป็น Molecular Ferromagnet (Kozaki et al., 1998) อีกด้วย เนื่องจาก DPPH ถูกใช้งานอย่างแพร่หลายตราบจนกระทั่งปัจจุบัน ในบทความนี้จะได้กล่าวถึงการเตรียม DPPH อย่างไรก็ตาม ในบทความนี้ได้รายงานการเตรียมสารอนุพันธ์ DPPH อื่น ๆ ด้วย ได้แก่ 2,2',-bis(4-methylphenyl) -1-pricryhydrazyl**(13)**, 2,2-diaryl-1-pricrylhydrazyl**(22)**, 2,2-diphenyl-1-(trifluoromethane-sulfonyl)-hydrazyl**(23a)** และ 1,1-diphenyl-2-(2,6-dinitrophenyl)-hydrazyl**(23d)** เป็นต้น ซึ่งเสถียรที่อุณหภูมิห้อง แต่กลับไม่มีรายงานการใช้งานของสารเหล่านี้

ซึ่งเป็นเรื่องน่าสนใจว่าสารเหล่านี้สามารถใช้งานทดแทน DPPH ได้หรือไม่ และจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร ซึ่งอาจนำไปสู่การลดข้อด้อยของการใช้งาน DPPH ลงได้

2. เนื้อหา

ค.ศ. 1922 Goldschmidt และ Renn (Goldschmidt and Renn, 1922) ทำการเตรียม 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, **1**) ขึ้นมาเป็นครั้งแรกของโลก (สมการ 2-1) โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่าง 1,1-diphenylhydrazine **(2)** กับ picryl chloride **(3)** นำไปสู่



...(2-1)

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H,**4**) จากนั้นสาร **4** จะถูกออกซิไดซ์ด้วยเลดไดออกไซด์ (PbO_2) ในเบนซีน หรือคลอโรฟอร์มได้สารผลิตภัณฑ์ DPPH **(1)** ตามลำดับ ในปฏิกิริยาจำเป็นต้องเติมโซเดียมซัลเฟต (ปราศจากน้ำ) ลงไปดูดน้ำที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเลดไดออกไซด์ดังสมการ 2-2 เพื่อป้องกันน้ำเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ DPPH คืนกลับไปเป็น 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine

$$PbO_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow PbO + H_2O$$

...(2-2)

2.1 การเตรียม DPPH-H (4) (Forrester et al. 1968)

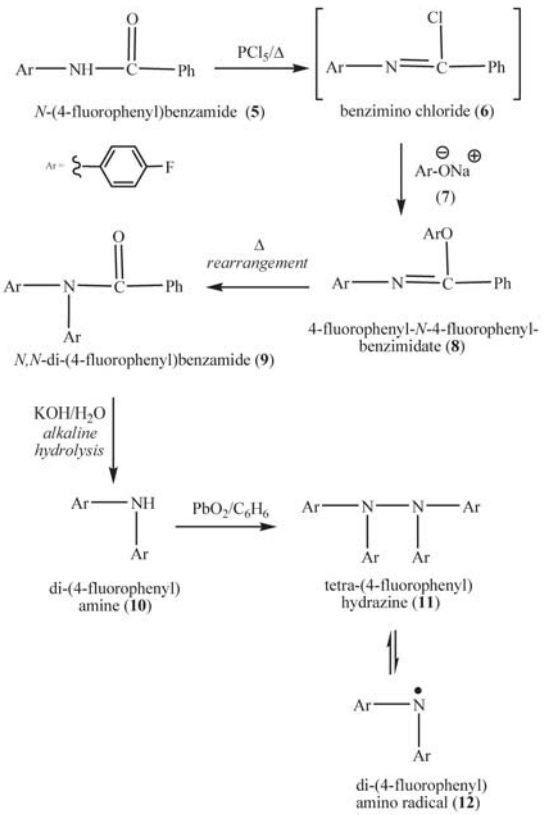
นำสารละลาย 1,1-diphenylhydrazine (22 กรัม, 0.1 โมล) ในเอธานอล (250 มล.) ไปผสมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต (21 กรัม, 0.25 โมล) จากนั้นเติม Picryl Chloride (24.8 กรัม, 0.1 โมล) ลงไปซึ่งจะเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นและสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง, อุ่นสารละลายต่อประมาณ 15 นาที จากนั้นเทคลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากันลงไป นำไปกรองเพื่อนำชั้น Filtrate ไปล้างด้วยน้ำ (2x250 มล.) แล้วทำการระเหยตัวทำละลายให้เหลือประมาณ 150 มล. เติมเอธานอลลงไป (150 มล.) ทิ้งไว้ข้ามคืน กรองตัวทำละลายออกจะได้ผลึก DPPH-H (37.1 กรัม, ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 97) นำสารที่ได้ไปตกผลึกใหม่ด้วยคลอโรฟอร์ม (90 มล.) ผสมกับเอธานอล (60 มล.) จะได้ผลึกปริซึม DPPH-H (จุดหลอมเหลว 170-172 °C)

2.2 การเตรียม DPPH (1) (Forrester et al. 1968)

ละลายสาร DPPH-H (5.1 กรัม, 0.013 โมล) ผสมกับเลดไดออกไซด์ (31.4 กรัม) และโซเดียมซัลเฟต (ปราศจากน้ำ) (5.1 กรัม) ในเบนซีน (100 มล.) ให้เข้ากัน ทำการเขย่าสารละลายให้เข้ากันต่อนาน 2 ชม. จากนั้นกรองตัวทำละลายทิ้งไป นำของแข็งสีม่วงไปขจัดตัวทำละลายที่เหลือโดยการลดความดัน *(in vacuo)* จะได้ของแข็งสีคล้ำ ทำการตกผลึกสารที่ได้ด้วยเบนซีนและไลต์ปิโตรเลียม (2:1) จะได้ปริซึมสีม่วงของสารเชิงซ้อน DPPH กับเบนซีน (1:1) (จุดหลอมเหลว 128-129 °C) ผลึกที่ได้หากนำไป

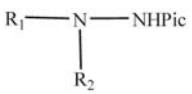
ขจัดตัวทำละลายต่อโดยการลดความดันที่ 80 °C นาน 16 ชม. จะได้ผลึกที่มีจุดหลอมเหลว 137 °C (การตกผลึกใหม่ของ DPPH สามารถใช้ตัวทำละลายผสมคลอโรฟอร์มและไดเอทิลอีเทอร์ได้เช่นกันโดยการขจัดตัวทำละลายที่ 80 °C ในสภาวะการลดความดัน)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1953 คณะนักวิจัยของ Benington (Benington et al., 1953) ได้ทำการเตรียมสารอนุพันธ์ hydrazyl ขึ้นมา ได้แก่ di-(4-fluorophenyl)amino radical **(12)** เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการรวมตัวกันเองของสารนี้ โดยมีการแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์สารนี้อย่างน่าสนใจ ดังในสมการ 2-3 โดยเริ่มจาก *N*-(4-fluorophenyl) benzamide **(5)** ทำปฏิกิริยากับ phosphorus pentachloride (PCl5) ในความร้อนนำไปสู่ crude ของ benzimino chloride **(6)** และดักจับสารนี้ด้วย 4-fluorophenoxide sodium salt **(7)** จะได้ 4-fluorophenyl-N-4-fluorophenylbenzimidate **(8)** สาร **8** จะเกิดการจัดตัวใหม่ที่ 280 °C จะได้ *N,N*-di-(4-difluorophenyl)benzamide **(9)** สาร **9** หลังจากทำไฮโดรลิซิสในด่างจะเกิดเป็น di-(4-fluorophenyl) amine **(10)** ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อด้วยเลดไดออกไซด์ในเบนซีนเกิดเป็น tetra-(4-fluorophenyl) hydrazine **(11)** ซึ่งสาร **11** สามารถเกิดการแตกตัว (dissociation) ไปสู่ di-(4- fluorophenyl) amino radical **(12)** และเกิดการรวมตัวกัน (dimerization) กลับมาสู่สาร **11** ได้ นอกจากนี้คณะนักวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษาสาร DPPH พบว่าไม่เกิดการรวมตัวกันเช่นเดียวกับสารอนุพันธ์ DPPH ที่กล่าวมาข้างต้น (Poirier et al., 1952)

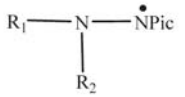


...(2-3)

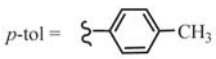
ในปีต่อมาคณะนักวิจัยเดิมยังได้รายงานการเตรียมอนุพันธ์ hydrazyl อื่น ๆ ออกมาอีก (Poirier, and Benington, 1954) และยังยืนยันว่าหมู่ R_1 และ R_2 ใน hydrazyl **(13)** มีผลต่อเสถียรภาพของอนุมูลอิสระ (free radical) ที่เกิดขึ้น กล่าวคือ หาก $R_1 = R_2 =$ Ph หรือ *p*-tol, อนุมูลอิสระที่เตรียมขึ้นมาจะมีเสถียรภาพดี แต่หากแทนที่ $R_1 =$ Ph, $R_2 = CH_3$ จะสามารถเตรียมอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร (Unstable Free Radical) ขึ้นมาได้ แต่หาก $R_1 = R_2 = CH_3$ จะไม่สามารถเตรียมอนุมูลอิสระนี้ขึ้นมาได้เลย นอกจากนี้ ยังได้รายงานค่าความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงใน UV-spectra ดังตารางที่ 1

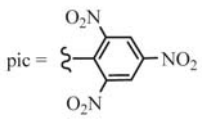


hydrazine (**14**)



hydrazyl (**13**)





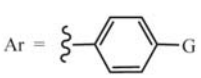
ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงยูวีของ hydrazine **(14)**[a] และ hydrazyl **(13)**[b]

Hydrazine, 14			Hydrazyl, 13		
R_1	R_2	(nm)	R_1	R_2	(nm)
Ph	Ph	319	Ph	Ph	332
p-tol	*p*-tol	320	*p*-tol	*p*-tol	347
Ph	Me	319	Ph	Me	334
Me	Me	319	Ph	Me	332[c]

[a]The 1 x 10^{-4} M and [b] 5 x 10^{-5} M prepared solution was as to be determined after standing unprotected daylight for 1 h

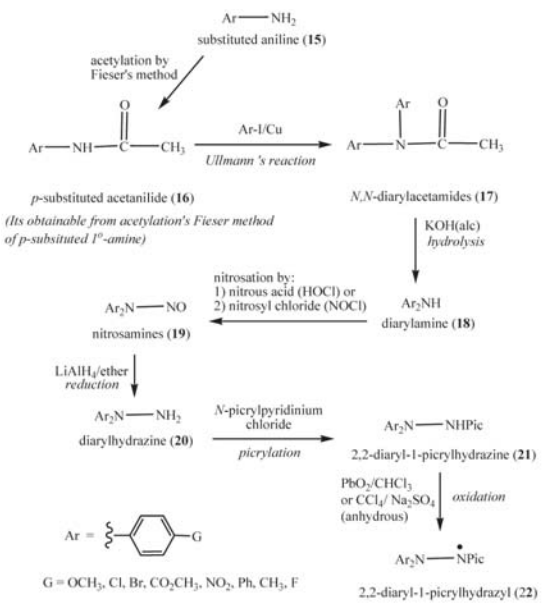
ค.ศ. 1961 Chen และคณะ (Chen et al., 1961b) ได้ทำการเตรียม 2,2-diaryl-1-picrylhydrazyl **(22)** ขึ้นมาดังสมการ 2-4 โดยการแทนที่ตำแหน่ง para- ของหมู่ phenyl ด้วยหมู่ -G (= OCH_3, Cl, Br, CO_2CH_3, NO_2 และ Ph) พบว่า อนุมูลอิสระที่เตรียมได้มีเสถียรภาพได้ที่ –8 °C นาน 3 เดือน

2,2-diaryl-1-picrylhydrazyl (**22**)



G is given by:
Group 1: G = OCH_3, Cl, Br, CO_2CH_3, NO_2, Ph
(The free radicals are stable at - 8°C for 3 months)
Group 2: G = CH_3, F
(These free radical are unstable and cannot prepared in pure states)

(ยกเว้น G = CH_3, F; อนุมูลอิสระไม่เสถียรแยกไม่ได้) ซึ่งนับเป็นอีกครั้งหนึ่งที่มีการเตรียม diarylpicrylhydrazyl อื่น ๆ ขึ้นมานอกจาก DPPH นอกจากนี้ คณะนักวิจัยยังได้พัฒนาการทำปฏิกิริยา picrylation และปฏิกิริยา N-nitrosation โดยในปฏิกิริยาแรกมีการนำ N-picrylpyridinium chloride มาใช้แทนการใช้ picryl chloride เพียงอย่างเดียวโดยจะทำให้ได้ร้อยละผลิตภัณฑ์สูงขึ้น เนื่องจากการใช้ picryl chloride อย่างเดียวจะทำให้ hydrazine ส่วนหนึ่งเกิดปฏิกิริยาไปเป็น hydrazine hydrochloride ส่วนปฏิกิริยา N-nitrosation ก็มีการใช้ nitrosyl chloride (NOCl) แทนการใช้ nitrous acid (HNO_2) โดยจะได้ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งปฏิกิริยาจะใช้ได้ดีหากหมู่ G = OCH_3, H, CO_2CH_3 หรือ NO_2 ส่วนเส้นทางการสังเคราะห์ diarylhdrazyl ทั้งหมดแสดงไว้ในสมการ 2-4 ส่วนตารางที่ 2 แสดง hydrazyl ที่เกิดขึ้น



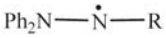
..(2-4)

ตารางที่ 2 แสดง hydrazyls **(22)** ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน hydrazines **(21)** ด้วย PbO_2

para-Group of 22	Solution Color	Recryst.	mp (°C)[a]
$-OCH_3$	blue	-	145-148
$-CH_3$	blue-purple	C_6H_6	108-118
-H	purple	CCl_4	127-129
-Cl	purple	CCl_4	154-15
-Br	purple	CCl_4	139-141
$-CO_2CH_3$	dull-purple	C_6H_6	90-100
$-NO_2$	brown-purple	EtOAc	204-207
-Ph	blue-purple	$CHCl_3$	140-150

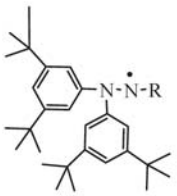
[a] mp after drying at RT are listed (Chen and Walter, 1961b)

ต่อมาคณะนักวิจัยต่าง ๆ ได้พยายามสังเคราะห์สารอนุพันธ์อื่น ๆ **(23-25)** ของ DPPH ขึ้นมาอีกดังภาพด้านขวาและยังมีการรายงานว่า 2,2-diphenyl-1-(trifluoromethanesulfonyl)-hydrazyl **(23a)** (Balaban et al., 1973a) ที่เกิดขึ้นมีเสถียรภาพในสารละลายที่อุณหภูมิห้องและทำการแยก 1-cyano-2,2-diphenylhydrazyl **(23b)** (Negoitá et al., 1974) และ 1,1-diphenyl-2-(2,6-dinitrophenyl)-hydrazyl **(23d)** (Balaban et al., 1961) ในรูปของแข็งออกมาได้



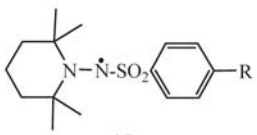
23

R = $-SO_2CF_3$ **(23a),** *stable solution at RT* (Balaban, *et al.*1973a),
-CN **(23b),** *black-violet solid* (Negoita, *et al.* 1974)
2,6-dinitrobenzene **(23c),** *violet unstable*
2,4-dinitrobenzene **(23d),** *black-violet* (Balaban, *et al.*1961)



24

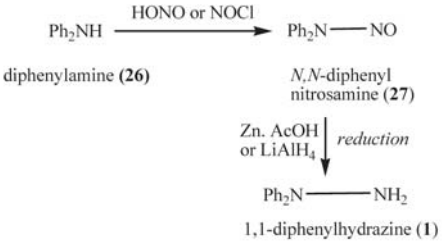
R = SO_2Ph **(24a),** (Balaban, *et al.* 1974),
2,4,6-trinitrobenzene **(24b),** (Balaban, *et al.*1977)
PhCO **(24c),** (Caproiu, *et al.* 1983)



25

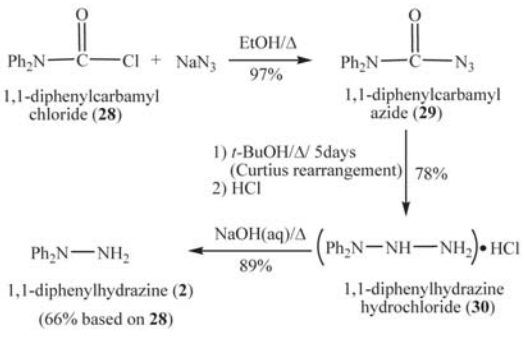
R = H **(25a),** NO_2 **(25b),** (Balaban, *et al.* 1973b)

เท่าที่ผ่านมา จะเห็นว่าสารตั้งต้น 1,1-diphenylhydrazine **(2)** สามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน diphenylamine **(26)** ด้วย nitrous acid (HONO) หรือ nitrosyl chloride (NOCl) ตามด้วยปฏิกิริยารีดักชัน *N,N*-diphenylnitrosamine **(27)** ที่เกิดขึ้นด้วย Zn/AcOH หรือ $LiAlH_4$ ดังสมการ 2-5 (Fischer, 1878).



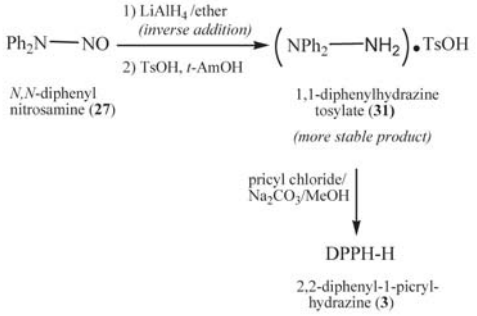
..(2-5)

อย่างไรก็ตาม สารตั้งต้น 1,1-diphenyl hydrazine **(1)** ในเส้นทางข้างต้นมีปัญหาในการแยกให้บริสุทธิ์ อีกทั้งในการทำปฏิกิริยารีดักชันสาร *N,N*-diphenylnitrosamine **(27)** จะเกิดปฏิกิริยาแทรกซ้อนเกิดแตกหักพันธะ N–N ทำให้ได้ diphenylamine แทน ดังนั้น Koga และ Anselme (Koga and Anselme, 1968) จึงได้พัฒนาการเตรียมสารนี้ให้มีร้อยละผลิตภัณฑ์ที่สูงและจัดการได้ง่ายขึ้น โดยเริ่มต้นจาก 1,1-diphenylcarbamyl chloride **(28)** ทำปฏิกิริยาแทนที่ด้วย sodium azide (NaN_3) เกิดเป็น 1,1-diphenylcarbamyl azide **(29)** นำสาร **29** ทำปฏิกิริยา การจัดตัวใหม่แบบ Curtius ตามด้วย deprotonation ด้วย NaOH(aq) จะได้สาร 1,1-diphenylhydrazine hydrochloride **(30)** และ 1,1-diphenylhydrazine (**2,** ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 66, คำนวณจาก **28**) ตามลำดับ (สมการ 2-6)



...(2-6)

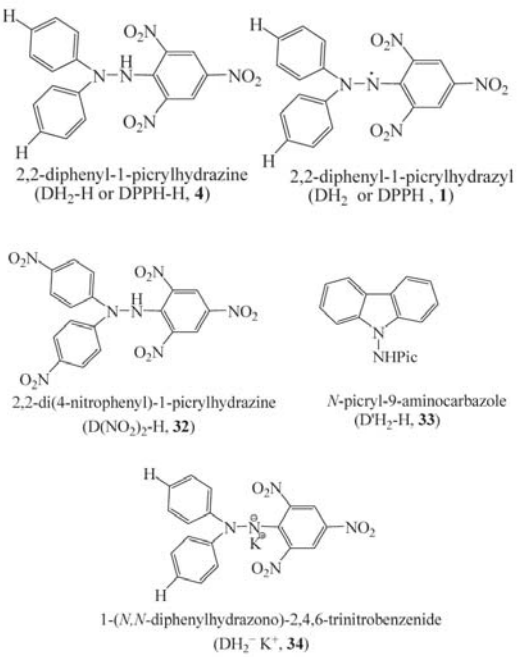
จากประสบการณ์ของ O'Connor และ Walter (O'Connor and Walter, 1977) พบว่าสาร 1,1-diphenylhydrazine **(2)** และ 1,1-diphenylhydrazine hydrochloride **(30)** ไม่เสถียรเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน ๆ คณะนักวิจัยจึงได้หาวิธีเก็บรักษาสารดังกล่าว โดยพบว่า หากเปลี่ยนสารนี้ไปอยู่ในรูป 1,1-diphenylhydrazine tosylate **(31)** จะทำให้สารมีเสถียรภาพดียิ่งขึ้น ดังนั้น จึงนำสารผลิตภัณฑ์ 1,1-diphenylhydrazine ที่เกิดขึ้นระหว่าง *N,N*-diphenylnitrosamine **(27)** กับ $LiAlH_4$ ไปทำปฏิกิริยาต่อกับ *p*-toluenesulfonic acid (TsOH) ใน *t*-amyl alcohol (*t*-AmOH) นำไปสู่สาร 1,1-diphenylhydrazine tosylate **(31)** และ สาร **31** นี้สามารถ recovery กลับมาสู่ 1,1-diphenylhydrazine ได้ด้วยโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อกับ picryl chloride นำไปสู่ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H, **4**) ได้ดังสมการ



..(2-7)

ในขั้นตอนการออกซิไดซ์ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine **(4)** และสารอนุพันธ์ 2,2-di(4-nitrophenyl)-1-picrylhydrazine **(32),** *N*-picryl-9-aminocarbazole **(33),**

และ 1-(*N,N*-diphenylhydrazono)-2,4,6-trinitrobenzenide **(34)** (รูปที่ 2) ไปสู่ diarylhydrazyl radical เราสามารถใช้โปตัสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) แทนเลดไดออกไซด์แบบเดิมได้ นอกจากนี้ หากเราเติม *t*-butyl ammonium bromide (TBAB) ลงไปจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดผ่าน phase transfer catalysis หรืออาจไม่เติม TBAB ก็สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกัน ส่วนร้อยละผลิตภัณฑ์โดยรวมจะอยู่ในช่วง 42-90 ดังตารางที่ 3 (Brown and Weil, 1986)



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2,2-diaryl-picrylhydrazines

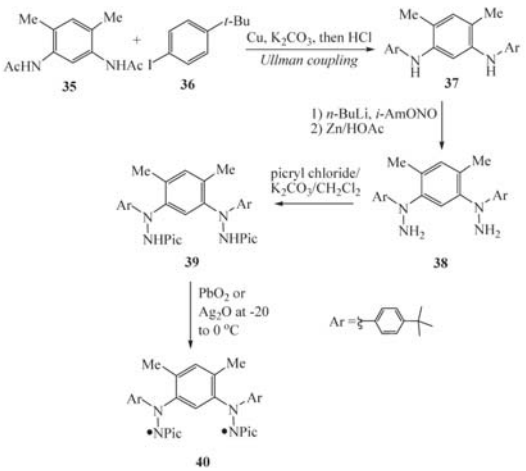
ตารางที่ 3 แสดงร้อยละผลิตภัณฑ์ของ diarylhydrazyls radical จาก diarylhydrazines

Diarylhydrazines	ตัวออกซิไดซ์	ร้อยละผลิตภัณฑ์[b]
1. DH_2-H	$KMnO_4$/TBAB	80
2. $D(NO_2)_2$-H	$KMnO_4$/TBAB	90[d]
3. $D'H_2$-H[a]	$KMnO_4$/TBAB	81[d]
4. DH_2-H	PbO_2/$NaSO_4$	53
5. $D(NO_2)_2$-H	PbO_2/$NaSO_4$	65
6. $D'H_2$-H[a]	PbO_2/$NaSO_4$	42[c]
7. DH_2-H	$KMnO_4$	85
8. $D(NO_2)_2$-H	$KMnO_4$	80[d]
9. $D'H_2$-H[a]	$KMnO_4$	70[d]
10. DH_2-H	$KMnO_4$	70
11. DH_2-H	dry $KMnO_4$	90
12. $DH_2^-K^+$	$KMnO_4$	59[c]

[a] *N*-picryl-9-aminocarbazole. [b] Of calculated from corresponding radical. [c] Determinated using spectrophotometrically. [d] Of crude product (Brown and Weil, 1986)

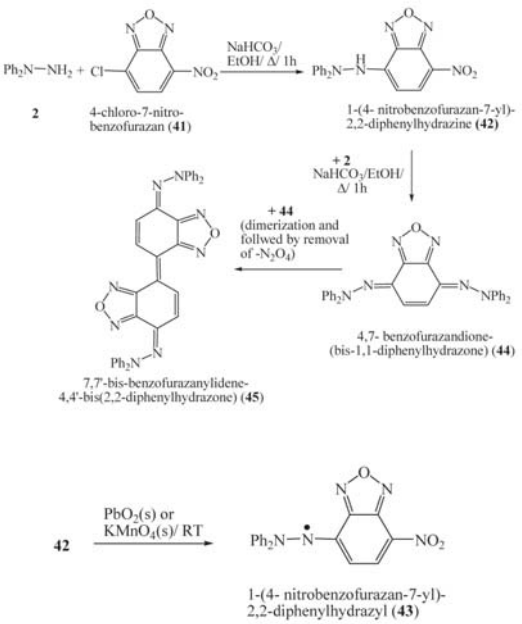
ในปี ค.ศ. 1998 Kozaki และคณะ (Kozaki et al., 1998) ได้ทำการเตรียม diradical **(40)** (สมการ 2-8) เพื่อนำไปใช้เป็น molecular ferromagnet โดยเริ่มจากการนำสาร **35** ทำปฏิกิริยา *Ullman coupling* กับสาร **36** จะได้สารผลิตภัณฑ์ **37** จากนั้นนำสาร **37** มาทำ lithiated ด้วย *n*-butyllithium ตามด้วย nitrosation ด้วย isoamyl nitrite ใน THF และทำการรีดิวซ์สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยผงสังกะสีในกรดอะซีติกจะได้สาร bishydrazine, **38** นำสาร **38** มาทำปฏิกิริยา picrylation เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ **39** ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อด้วยเลดไดออกไซด์หรือซิลเวอร์ออกไซด์ (Ag_2O) โดยมี

โปตัสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) ในไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ร่วมด้วยนำไปสู่ diradical, **40** ได้ ซึ่งสาร **40** นี้สามารถถูกแยกออกมาด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีโดยจะมีเสถียรภาพดีที่อุณหภูมิน้อยกว่า 0 °C แม้อยู่ในอากาศ อย่างไรก็ตาม สารนี้หากอยู่ในรูปของแข็งหรือสารละลายจะเกิดการสลายตัวได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้อง



..(2-8)

ในปี ค.ศ. 2011 Hristea และคณะ (Hristea et al., 2011) ได้เตรียม 1-(4-nitrobenzofurazan-7-yl)-2,2-diphenylhydrazyl **(43)** ขึ้นมา (สมการ 2-9) โดยนำ 1,1-diphenylhydrazine **(2)** มาทำปฏิกิริยากับ 4-chloro-7-nitrobenzofurazan **(41)** นำไปสู่ 1-(4-nitrobenzofurazan-7-yl)-2,2-diphenylhydrazine **(42)** ซึ่งถูกเสนอกลไกผ่านแบบ S_NAr จากนั้นสาร **42** จะถูกออกซิไดซ์ด้วยผงเลดไดออกไซด์หรือผงโปตัสเซียมเปอร์แมงกาเนตนำไปสู่ 1-(4-nitrobenzofurazan-7-yl)-2,2-diphenylhydrazyl **(43)** ได้ อย่างไรก็ตาม ในปฏิกิริยาการเตรียม **42** จะได้ผลิตภัณฑ์อีกตัว คือ 4,7-benzofura-zandione-(bis-1,1-diphenyl hydrazone) **(44)** ซึ่งเกิดจากสาร **41** เกิดปฏิกิริยาการแทนที่แบบ *ipso* (*ipso*-substitution) กับ 1,1-diphenylhydrazine **(2)** ตามด้วยการเกิด dehydrogenation ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่า สาร **44** สามารถเกิดการรวมตัวกันเองไปเป็น 7,7'-bis-benzo-furazanylidene-4,4'-bis(2,2-diphenylhydrazone) **(45)** ได้ ดังสมการ 2-9



..(2-9)

3. สรุป

จะเห็นได้ว่ากระบวนการเตรียม DPPH และสารอนุพันธ์สามารถเตรียมจากสารตั้งต้นได้หลายชนิด ซึ่งสารสำคัญในขบวนการอันหนึ่ง คือ diarylhydrazine นั่นเอง, DPPH ถูกนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น เป็นสารประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ หรือใช้เป็นสารมาตรฐานใน

ESR เป็นต้น หากนับล่วงมาถึงปัจจุบัน (ค.ศ. 2012) เกือบศตวรรษ DPPH ยังถูกกล่าวอ้างถึงการใช้งานมากกว่า 16,000 หัวข้อเรื่องโดยเฉพาะเกี่ยวกับการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ScienceDirect database และ ACS Publications database) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความคุ้นเคยของนักวิทยาศาสตร์และเป็นสารที่ยอมรับกันในวงกว้างโดยทั่วไป เนื่องจากหาง่ายและราคาถูก แม้จะมีสารชนิดอื่น ๆ ถูกนำมาใช้ในลักษณะคล้ายคลึงกันแต่ DPPH ก็ยังถูกใช้งานควบคู่ไปด้วยในการทดลองนั้น ๆ เสมอ และเชื่อว่าสารนี้จะยังคงถูกใช้งานต่อไป ตราบเท่าที่เหตุผลข้างต้นยังไม่เปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามในบทความนี้ได้รายงานการพัฒนาการเตรียมสารอนุพันธ์ DPPH อื่น ๆ ขึ้นมาได้นอกเหนือจาก DPPH แต่กลับไม่มีรายงานการใช้งานของสารเหล่านี้ ซึ่งเป็นเรื่องน่าสนใจว่าสารเหล่านี้สามารถใช้งานทดแทน DPPH ได้หรือไม่และจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันหรือไม่อย่างไรซึ่งอาจนำไปสู่การลดข้อด้อยของการใช้งาน DPPH ลงได้

4. เอกสารอ้างอิง

ACS Publications, ACS database, [internet]. [cited 2012 Jan 14]. Available from URL: http://pubs.acs.org

Balaban, A.T., Frangopol, P.T., Marculescu, M. and Bally, I. 1961. **Factors affecting stability and equilibria of free radicals: Steric factors in hydrazyls.** Tetrahedron, 13(4): 258-267.

Balabaná, A.T., Negoitá, N. and Baican, R. 1973a. **2,2-Diphenyl-1-(trifluoro methane sulphonyl)-hydrazyl.** Chem. Phy. Lett., 24(1): 30-32.

Balaban, A.T. and Instrgjoiu, R. 1973b. ***N*-arenesulphonyl-*N*-(2,2,6,6-tetramethylpiperidyl-1)-aminyls, hydrazyls with no nitrogen-bonded aromatic groups.** Tetrahedron Lett., 14(21): 1879-1880.

Balaban, A.T., Caproiu, M.T., Negoita, N. and Baican, R. 1974. **Non-equivalence of aryl groups in 1,1-diaryl-2-benzenesulphonyl-hydrazyls.** Tetrahedron Lett. 15(47): 4091-4094.

Balaban, A.T., Caproiu, M.T., Negoitá, N. and Baican, R. 1977. **Factors affecting stability and equilibria of free radicals—IX: Non-equivalence of aryl groups in 1,1-diaryl-2-benzenesulphonyl-hydrazyls and related compounds.** Tetrahedron. 33(17): 2249-2253.

Benington, F., Shoop, E.V. and Poirier, R.H. 1953. **The chemistry of hydrazyl free radicals. II. Synthesis and dissociation of tetra(4-fluorophenyl)hydrazine.** J. Org. Chem., 18(11): 1506-1510.

Blois, M.S. 1958. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical (The original paper of using DPPH).** Nature. 181(26 April): 1199-1200.

Brown K.C. and Weil, J.A. 1986. **Preparation of 2,2-diaryl-1-picrylhydrazyls**

using potassium permanganate. Can. J. Chem, 64: 1836-1838.

Caproiu, M.T., Elian, M., Grecu, N., Negoisa, N. and Balaban, A.T. 1983. **Factors affecting the stability and equilibria of free radicals. Part 11. 1-Benzoyl-2,2-bis-(3,5-di-t-butylphenyl) hydrazyl and its temperature-dependent electron spin resonance spectrum.** J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 591-594.

Chen, M.M., Sane, K.V., Walter, R.I., and Weil, J.A. 1961a. **Solution paramagnetic resonance studies of *para*-substituted hydrazyl free radicals.** J. Phys. Chem. 65: 713.

Chen, M.M., D'adamo Jr. A.F., Walter, R.I. 1961b. **The preparation of substituted 1-picryl-2,2-diphenylhydrazyl free radicals.** J. Org. Chem., 26(8): 2721-2727.

Chen, O., Zhuang, J., Guzzetta, F., Lynch, J., Angerhofer, A. and Cao, Y.C. 2009. **Synthesis of water-soluble 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl nanoparticles: a new standard for electron paramagnetic resonance spectro-scopy.** J. Am. Chem. Soc., 131(35): 12542-12543.

Elsevier, B.V., ScienceDirect database, [internet]. [cited 2012 Jan 14]. Available from URL: http://www.Sciencedirect.com

Fischer, E. 1878. **Ueber die hydrazinverbindungen.** Justus Liebigs Ann. Chem., 190(1-2): 67-183.

Forrester, A.R., Hay, J.M. and Thomson, R.H. 1968. **Organic chemistry of stable free radicals,** London, Academic Press, 138.

Goldschmidt, S. and Renn, K. 1922. **Zweiwertiger Stickstoff: Über das α, α -diphenyl-β–trinitrophenyl-hydrazyl (IV. Mitteilung über Amin-Oxydation).** Ber. Dtsch. Chem. Ges., 55: 628-643.

Hristea, E.N., Bem, M., Balaban, T.S., Eichhöfer, A., Caproiu, M.T., Draghici, C., Ionita, G., Spataru, T., Enache, C., Maganu, M., Beteringhe, A., Hillebrand, M., Constantinescu, T., and Balaban, A.T. 2011. **Novel 1,1-diphenylhydrazine derivatives of benzofurazan and their dimerization.** ARKIVOC. xi, 213-236.

Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. **Review: The chemistry behind antioxidant capacity assay.** J. Agric. Food Chem., 53(6): 1841-1856.

Kaufmann, H.P. and Korfhage, L. 1953. **Molekülvergrößerungen auf dem Fettgebiet VII: Katalytische Beeinflussung der Öltrocknung,** 3. Teil, Fette, Seifen, Anstrichmittel, 55(5): 281-284.

Kiers, C.T., De Boer, J.L., Olthof, R. and Spek, A.L. 1976. **The crystal structure of a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) modification.** Acta Crystallogr. B. 32: 2297.

Koga, N. and Anselme, J.-P. 1968. **The preparation of 1,1-diarylhydrazines.** J. Org. Chem., 33(10): 3963-3964.

Kozaki, M., Nakamura, S., Sato, K., Takui, T., Kamatani, T., Oda, M., Tokumaru, K. and Okada, K. 1998. **Preparation and characterization of novel DPPH-based diradicals.** Tetrahedron Lett., 39(33): 5972-5982.

Liu, Z-Q. 2010. **Review: Chemical methods to evaluate antioxidant ability.** Chem Rev., 110, 5675-5691.

Negoitá, N., Baican, R. and Balaban, A.T. 1974. **Factors affecting stability and equilibria of free radicals—VIII: 1-Cyano-2,2-diphenyl-hydrazyl.** Tetrahedron, 30(1): 73-74.

O'Connor, S.E. and Walter, R.I. 1977. **An improved synthesis of 1 -picryl-2, 2-diphenylhydrazyl radical. Purification and storage of 1,1-diphenylhydrazine as the tosylate salt.** J. Org. Chem., 42(30): 577-578.

Poirier, R.H., Kahler, E.J. and Benington, F. 1952. **The chemistry of hydrazyl free radicals. I. Spectrophotometric evidence on the structure of α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl and α,α-diphenyl-β-picryl-β-oxyhydrazyl.** J. Org. Chem., 17(11): 1437-1445.

Poirier, R.H. and Benington, F. 1954. **The chemistry of hydrazyl free radicals. III. Further evidence of the contribution of a groups toward the stabilization of α,α-disubstituted-β-picryl-hydrazyl free radicals.** J. Org. Chem., 19(7): 1157-1162.

Sánchez-Moreno, C. 2002. **Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.** Food Sci Technol Int. 8(3): 121-137.

Shahidi, F. and Ho, C-T. 2007. **Review: Antioxidant measurement and applications: an overview (Chapter 1).** ACS Symposium Series, Washington DC, American Chemical Society.

Sigma-Aldrich Company. [internet]. [cited 2012 Jan 14]. Available online URL: http://www.sigmaaldrich.com

Walter, R.I. 1966. **Substituent effects on the properties of stable aromatic free radicals. The criterion for non-hammett behavior.** J. Am. Chem. Soc., 88(9): 1923-1930.

Williams, D.E. 1966. **Structure of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical.** J. Am. Soc. Chem., 89(17): 5665-5666.

Williams, D.E. 1967. **Crystal structure of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical.** J. Am. Soc. Chem., 89(17): 4280-4287.

Zĭlić, D., Pajić, D., Jurić, M., Molcănov, K., Rakvin, B., Planinić, P. and Zadro, K. 2010. **Single crystals of DPPH grown from diethyl ether and carbon disulfide solutions – Crystal structures, IR, EPR and magnetization studies.** J. Magn. Reson., 207: 34-41.