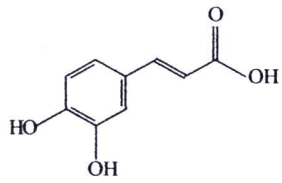
ผลการวิจัย

วัตถุประสงค์ที่ 1 เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดกาเฟอิกในรูปอนุพันธ์เอสเทอร์ และเอไมด์

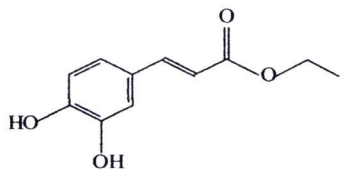
จากการสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์และเอไมด์ของกรดกาเฟอิกลักษณะผลิตภัณฑ์ ร้อยละของผลผลิตที่ได้แสดงดังตารางที่ 1 และสูตรโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แสดงดังรูปที่ 3

ตารางที่ 1 ลักษณะและร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดกาเฟอิก

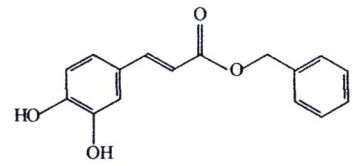
ชื่อสาร	อักษรย่อ	ลักษณะ	ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้
Ethyl caffeate	EAL	ผลึกสีขาว	30.40
Octyl caffeate	OAL	ผลึกสีขาว	26.62
Benzyl caffeate	BAL	ผลึกสีขาว	64.63
Phenethyl caffeate	PAL	ผลึกสีขาว	32.46
Caffeic acid ethylamide	EAM	ผลึกสีเหลือง	36.25
Caffeic acid octylamide	OAM	ผลึกสีขาว	30.45
Caffeic acid benzylamide	BAM	ผลึกสีขาว	45.80
Caffeic acid phenethylamide	PAM	ผลึกสีขาวเหลือง	24.60
Caffeic acid	CAF	ผงสีเหลือง	-



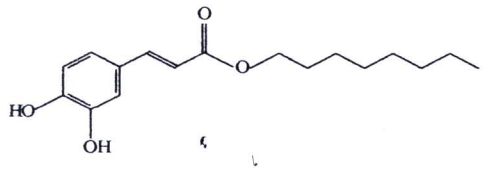
Caffeic acid



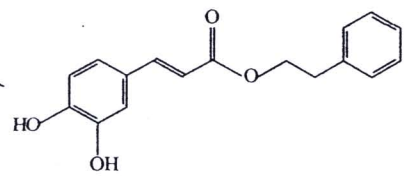
Ethyl caffeate



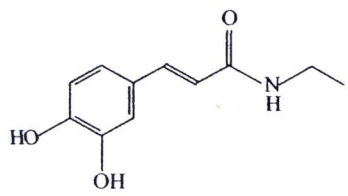
Benzyl caffeate



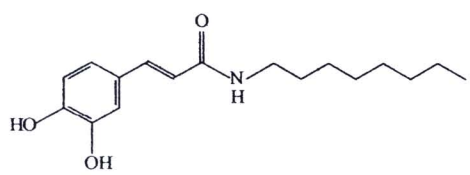
Octyl caffeate



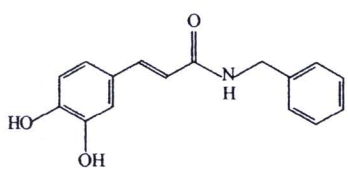
Phenethyl caffeate



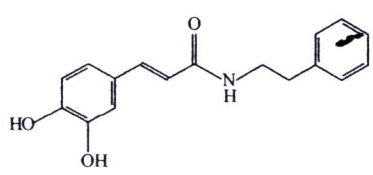
Caffeic acid ethylamide



Caffeic acid octylamide



Caffeic acid benzylamide



Caffeic acid phenethylamide

รูปที่ 3 โครงสร้างอนุพันธ์กรดกาเฟอิก

จุดประสงค์ที่ 2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์

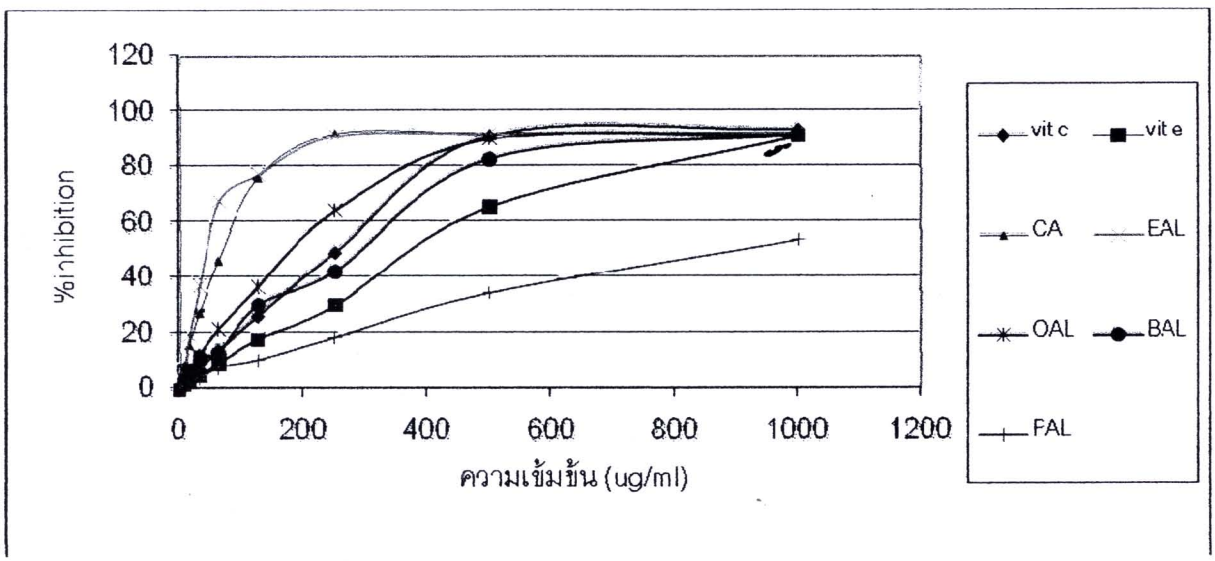
2.1 **การศึกษาการกำจัดอนุมูลอิสระ** 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH)

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ DPPH ซึ่งนิยมใช้ศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระทั้งสารสกัดจากพืชและสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ต่างๆ โดยทั่วไปสารต้านแอนติออกซิแดนซ์สามารถลดอนุมูล DPPH ที่มีความเสถียรให้เป็น diphenyl-picrylhydrazine ซึ่งมีสีเหลือง วิธีนี้สามารถวัดค่า antiradical power ของสารต้านอนุมูลอิสระได้ด้วย จากการทดลองค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH เป็นไปตาม่ตารางที่ 2และรูปที่ 4และ 5 เมื่อเรียงความสามารถในการให้โปรตอนตามค่าความเข้มข้นในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC50) ของ EAM> EAL> กรดกาเฟอิก >OAL>BAM>OAM> วิตามิน ซี>BAL> วิตามิน อี>PAL>PAM จากการทดลองจะเห็นได้ว่าความสามารถในการให้โปรตอนของสารอนุพันธ์ที่มีโมเลกุลเล็กจะมีประสิทธิภาพดีกว่าโมเลกุลใหญ่และสารในกลุ่มอนุพันธ์เอไมด์จะมีประสิทธิภาพดีกว่า

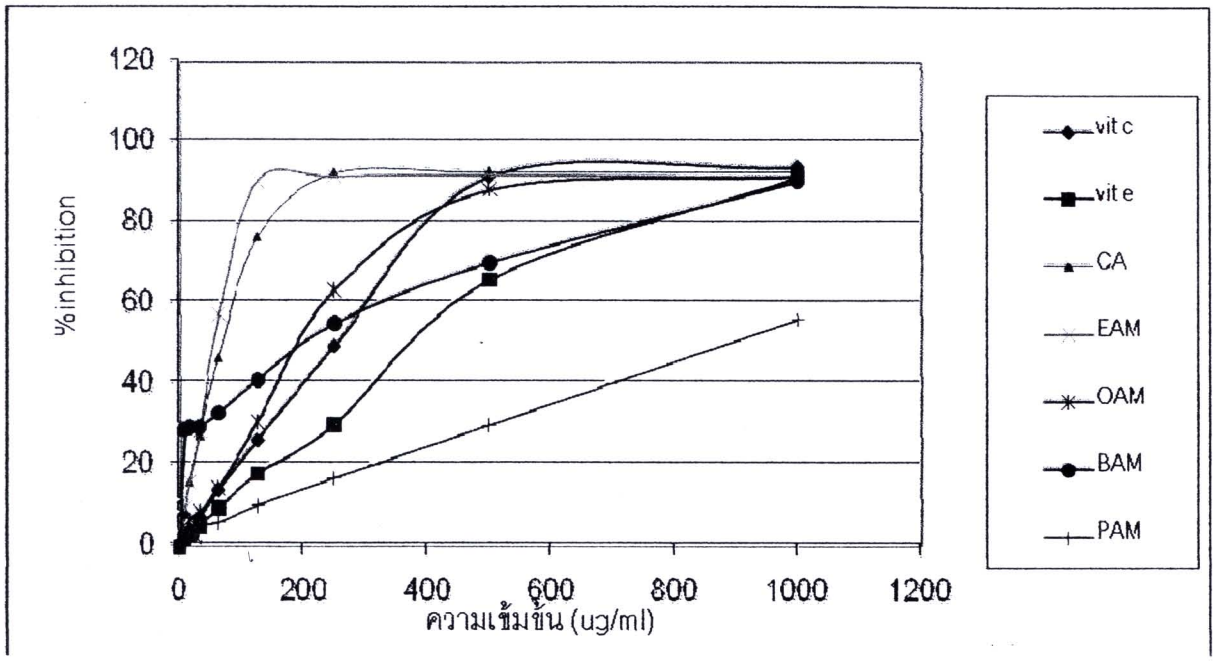
ตารางที่ 2 แสดงร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH

ความเข้มข้น	ร้อยละการยับยั้ง				
µg/ml	Caffeic acid	Ethyl caffeate	Octyl caffeate	Benzyl caffeate	Phenethyl caffeate
1000	92.86±0.31	92.56±0.78	91.75±0.63	91.49±0.88	53.91±0.55
500	92.76±0.62	92.43±0.64	90.49±0.63	83.09±0.42	34.69±0.59
250	92.46±0.43	91.60±0.56	64.67±0.78	42.44±0.95	18.68±0.56
125	76.46±0.90	77.53±0.70	36.86±0.59	30.25±0.45	10.49±0.64
62.5	46.56±0.23	68.03±0.82	21.78±0.95	13.03±0.72	8.01±0.27
31.25	27.46±0.83	37.36±0.52	12.27±0.55	11.66±0.64	4.09±0.46
15.625	16.03±0.30	19.76±0.42	6.13±0.71	6.83±0.79	3.55±0.83
7.8125	8.72±0.30	6.78±0.44	3.70±0.86	3.41±0.21	2.80±0.64

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง					
	Caffeic acid ethylamide	Caffeic acid octylamide	Caffeic acid benzylamide	Caffeic acid phenethylmide	Vitamin C	Vitamin e
1000	91.54±0.31	91.49±0.86	90.22±0.26	56.22±1.04	93.83±0.63	91.23±0.92
500	91.83±0.96	88.18±0.82	70.13±0.93	30.07±0.78	91.50±0.69	65.92±0.27
250	91.54±0.52	63.39±0.53	55.07±0.70	16.90±0.90	49.46±0.56	30.14±0.46
125	90.42±0.47	30.74±0.91	41.15±0.60	10.14±0.13	26.21±0.48	17.89±0.57
62.5	57.46±0.44	14.38±0.52	32.95±0.85	5.87±0.91	13.95±0.86	9.39±0.99
31.25	28.63±0.49	8.43±0.43	29.51±0.92	5.16±0.27	7.33±0.98	5.0110.96
15.625	15.96±0.86	6.53±0.48	29.42±0.51	3.55±0.22	4.03±0.91	2.95±0.56
7.8125	9.48±0.34	2.64±0.85	28.90±0.59	3.20±0.52	2.42±0.37	1.70±0.85



รูปที่ 4 ร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก



รูปที่ 5 แสดงร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ของอนุพันธ์เอไมด์กรดกาเฟอิก

2.2 การศึกษาการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงเมื่อเหนี่ยวนำด้วย AAPH

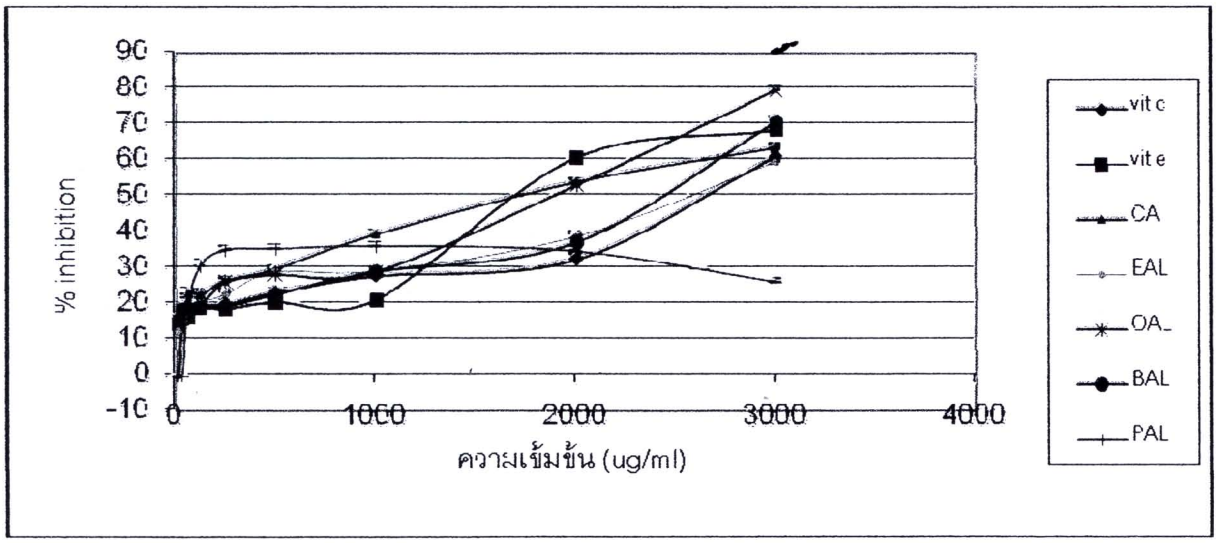
เยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเม็ดเลือดแดงจึงนำมาใช้ศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยศึกษาฤทธิ์การป้องกันความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการเหนี่ยวนำด้วยสารต่างๆเช่นอนุมูล peroxyl จาก AAPH สามารถทำปฏิกิริยากับสารพวกกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารพวกลิปิดหรือโปรตีน รบกวนสมดุลเยื่อหุ้มเซลล์จนทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากการทดลองพบว่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสังเคราะห์ตั้งแต่ 15.625-3000 µg/ml และมีความสัมพันธ์กันแบบ dose response relationship เมื่อเรียงตามค่าการยับยั้งการเกิดที่ร้อยละ 50 (IC50) พบว่า EAM>OAL> วิตามิน อี> กรดกาเฟอิก> PAL>OAM>BAL>EAL> วิตามิน ซี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 และรูปที่ 6,7

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

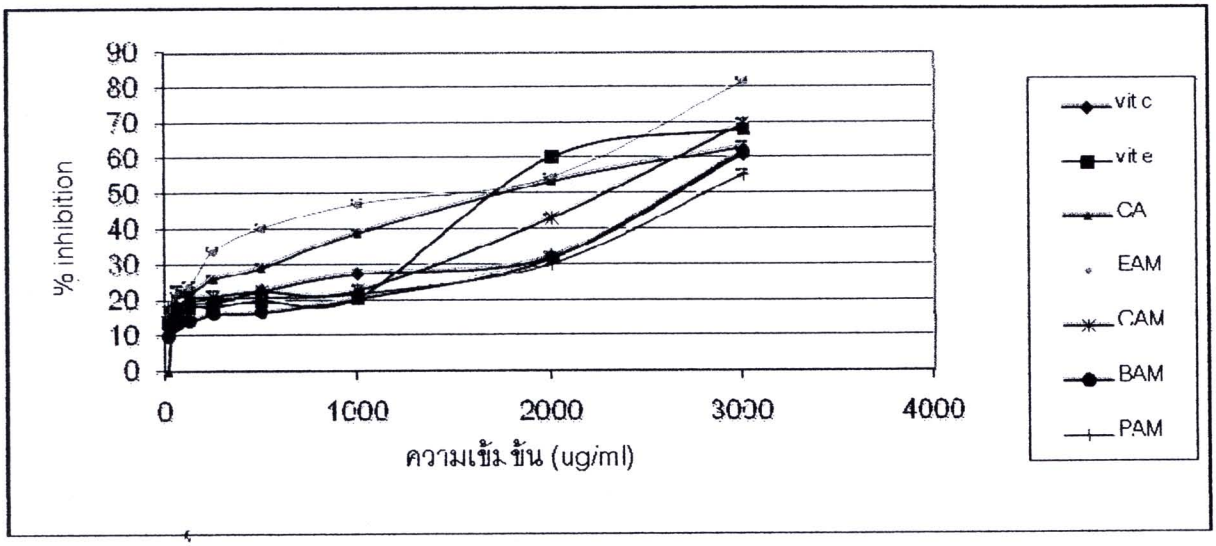
ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง				
	Caffeic acid	Ethyl caffeate	Octyl caffeate	Benzyl caffeate	Phenethyl caffeate
3000	63.69±0.56	59.70±0.24	79.69±0.40	70.92±0.40	69.48±0.24
2000	54.07±0.73	38.92±0.16	53.16±0.56	37.21±0.40	52.90±0.18
1000	39.45±0.51	29.29±0.09	29.03±0.88	28.87±0.42	30.57±0.56
500	29.72±0.37	29.08±0.18	28.18±0.24	22.54±0.33	19.51±0.46
250	26.42±0.33	22.70±0.40	26.10±1.39	19.09±0.80	17.49±0.33
125	22.54±0.92	19.94±0.16	19.88±1.06	18.87±0.40	16.37±0.18
62.5	22.97±0.42	20.68±3.01	18.29±0.58	18.64±0.62	15.10±1.55
31.25	12.92±0.16	15.95±0.58	16.11±1.05	18.29±1.72	13.72±0.89
15.625	0.31±0.07	12.39±2.79	15.31±0.58	15.42±0.24	9.20±0.33

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง					
	Caffeic acid ethylamide	Caffeic acid octylamide	Caffeic acid benzylamide	Caffeic acid phenethylmide	Vitamin C	Vitamin e
3000	81.87±0.18	70.07±0.40	62.25±0.24	55.84±0.89	61.40±0.42	68.53±0.40
2000	55.02±0.32	43.59±0.66	32.22±0.48	30.57±0.33	32.54±0.48	60.87±0.37
1000	47.53±0.97	23.29±0.58	21.05±0.42	22.22±0.93	27.86±0.79	21.16±0.64
500	40.62±0.79	23.02±0.88	17.06±0.49	21.32±0.24	23.18±0.60	20.49±0.70
250	34.18±0.88	21.74±0.49	16.64±0.88	21.05±0.64	19.94±0.58	18.55±0.97
125	24.24±0.64	21.21±1.69	14.57±0.33	20.20±0.56	19.78±0.58	18.82±0.58
62.5	22.54±0.96	18.77±0.49	13.88±0.80	19.88±0.33	18.98±0.70	16.32±0.33
31.25	18.13±1.06	16.53±0.24	12.49±0.66	19.62±0.32	17.97±0.40	15.90±0.46
15.625	16.64±1.03	14.57±1.06	10.21±0.42	18.87±0.51	14.62±1.61	14.51±0.28



รูปที่ 6 ร้อยละการยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก



รูปที่ 7 ร้อยละการยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงของอนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

2.3 การศึกษาการยับยั้งการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชันโดยใช้กรดไลโนเลอิก

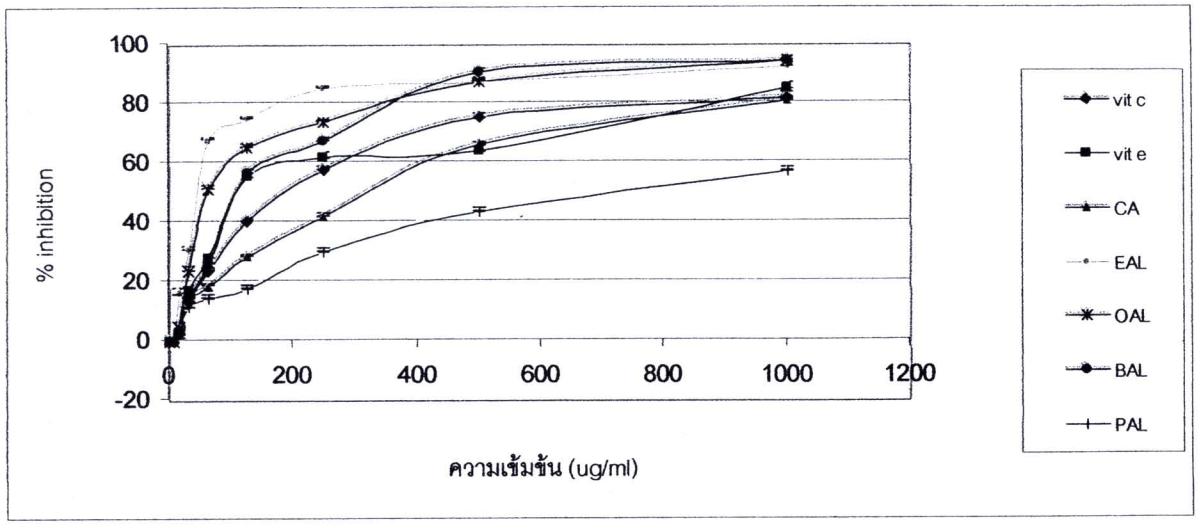
กรดไลโนเลอิกนั้นเป็นกรดไขมันที่พบได้ทั่วไปบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนมากมักนิยมใช้ศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน โดยใช้สารเคมีเหนี่ยวนำเช่น AAPH ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากการทดลองพบว่า EAL>OAL> วิตามิน อี >BAM> EAM>BAL>OAM>วิตามิน ซี> กรดกาเฟอิก > PAM>PAL

ผลแสดงดังตารางที่ 4 และรูปที่ 8,9

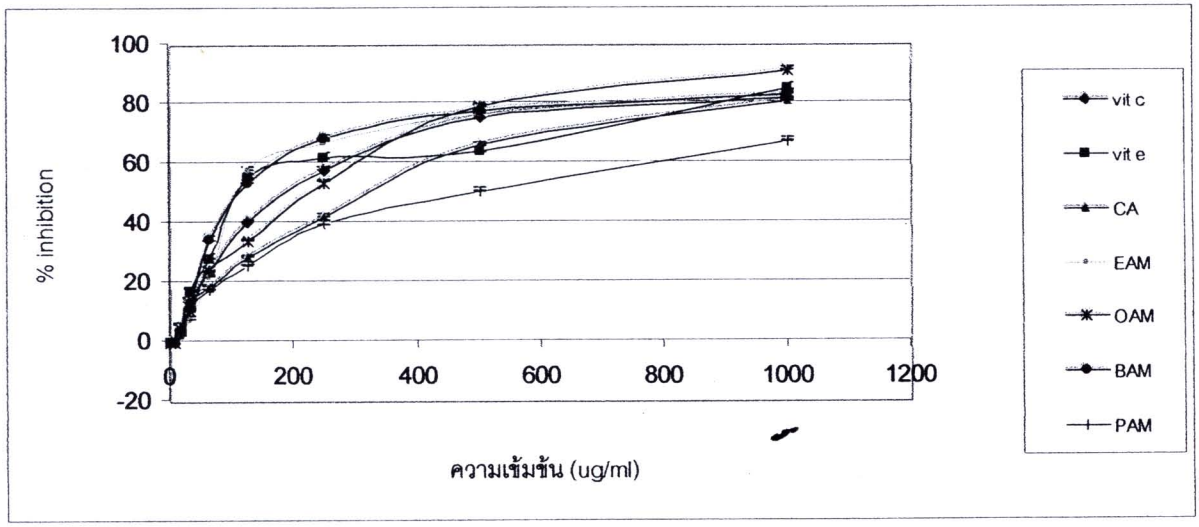
ตารางที่ 4 ร้อยละการยับยั้งการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชัน

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง				
	Caffeic acid	Ethyl caffeate	Octyl caffeate	Benzyl caffeate	Phenethyl caffeate
1000	81.06±1.55	92.29±1.68	94.34±0.98	94.52±0.70	57.38±1.55
500	66.30±0.74	87.65±0.58	87.37±0.98	90.71±0.85	43.55±1.05
250	42.06±1.55	85.14±0.85	73.91±2.13	67.69±0.56	30.27±0.43
125	28.41±2.18	74.93±0.28	65.27±1.32	56.73±15.61	17.92±1.13
62.5	18.48±1.70	67.78±0.58	51.35±0.85	25.35±4.42	14.48±0.84
31.25	14.21±2.93	60.63±1.16	23.86±0.70	14.76±6.42	11.70±0.84
15.625	2.79±0.28	16.43±4.69	4.92±1.81	1.95±1.74	4.46±1.00

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง					
	Caffeic acid ethylamide	Caffeic acid octylamide	Caffeic acid benzylamide	Caffeic acid phenethylmide	Vitamin C	Vitamin e
1000	83.94±1.43	91.36±2.61	83.19±0.43	67.78±0.58	82.36±0.58	85.42±0.70
500	76.51±1.05	79.20±0.98	77.72±0.56	50.97±0.84	75.49±0.74	64.44±0.78
250	67.22±2.16	53.76±4.88	68.71±0.85	39.74±1.13	58.63±0.58	62.21±1.68
125	57.85±1.8	33.80±1.85	53.39±0.70	25.72±0.85	40.39±0.84	55.52±4.91
62.5	22.01±1.47	24.42±1.77	34.35±1.26	17.64±1.26	23.68±0.84	28.32±1.98
31.25	7.71±1.96	10.77±0.16	11.51±0.70	11.88±0.98	13.46±0.85	17.46±0.98
15.625	2.79±0.28	4.83±0.43	3.99±0.70	3.62±1.06	3.99±0.90	3.16±0.70



รูปที่ 8 ร้อยละการยับยั้งการเกิดลิปิดออกซิเดชันกรดไลโนเลอิกด้วยอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก



รูปที่ 9 ร้อยละการยับยั้งการเกิดลิปิดออกซิเดชันกรดไลโนเลอิกด้วยอนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

2.4 การศึกษาการกำจัดอนุมูล superoxide anion

การทดลองนี้ได้ศึกษาการยับยั้งอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์โดยใช้กระบวนการ nonenzymatic จากปฏิกิริยา phenazine methosulfate/NADH/O_2 เป็นตัวสร้างอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์และใช้ nitroblue tetrazolium (NBT) เป็นตัววัดปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์ จากการทดลองพบว่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์โดยใช้กรดกาเฟอิก วิตามินซีและวิตามิน อีเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 พบว่า วิตามิน ซี> กรดกาเฟอิก>EAM> วิตามินอี>OAL>PAL>BAL>PAM>EAL>BAM>OAM แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าการยับยั้งที่ความเข้มข้นของสาร 1,25 µg/ml พบว่า EAM>กรดกาเฟอิก> วิตามิน อี>วิตามิน ซี>OAL>BAL,PAL>PAM>EAL>BAM>OAM

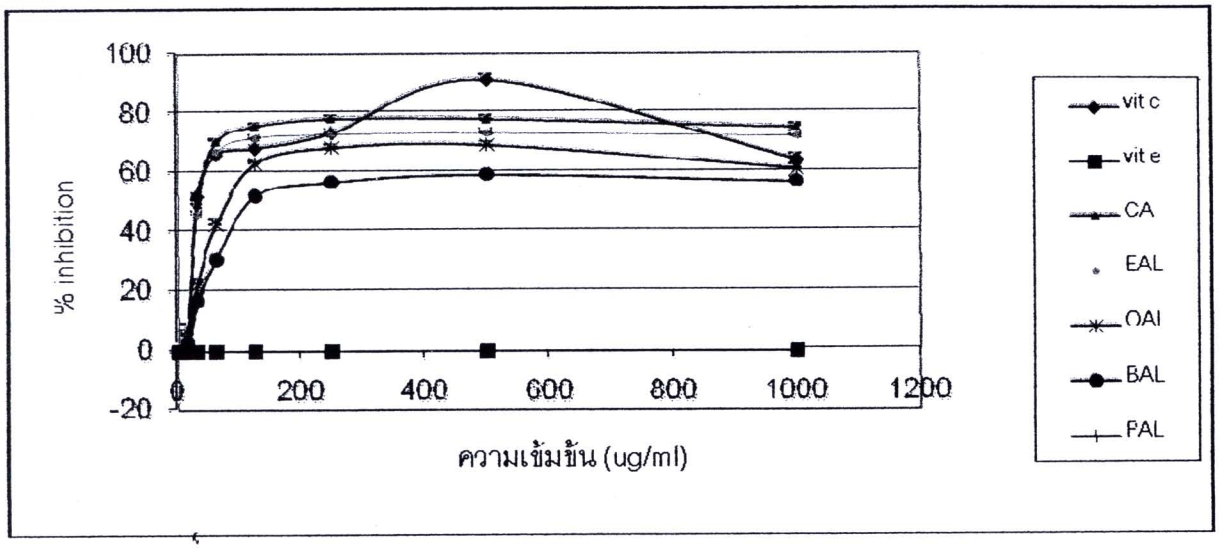
ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 และรูปที่ 10,11

ตารางที่ 5 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์

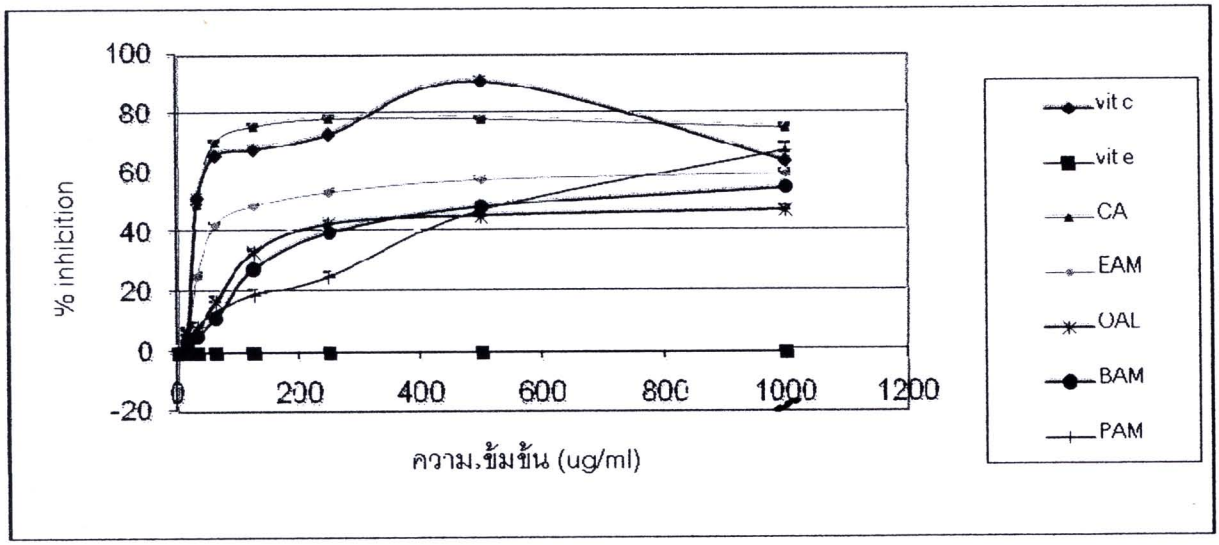
ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง				
	Caffeic acid	Ethyl caffeate	Octyl caffeate	Benzyl caffeate	Phenethyl caffeate
1000	75.32±0.37	72.22±0.44	61.31±0.21	56.99±0.44	56.99±0.44
500	78.24±0.23	73.34±.040	69.31±0.37	59.36±0.29	59.35±0.29
250	78.41±0.23	73.07±0.33	68.57±0.21	57.02±0.33	57.02±0.33
125	75.90±0.15	71.86±0.22	63.13±0.23	52.34±0.41	52.34±0.51
62.5	70.66±0.21	66.84±0.26	42.84±0.41	30.99±0.51	30.87±0.55
31.25	49.63±0.55	45.91±0.57	22.61±0.26	17.30±0.47	15.41±0.86
15.625	7.46±0.44	5.39±0.45	4.43±0.74	2.96±0.32	1.37±0.47

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง					
	Caffeic acid ethylamide	Caffeic acid octylamide	Caffeic acid benzylamide	Caffeic acid phenethylmide	Vitamin C	Vitamin e
1000	59.92±0.51	47.61±0.64	55.36±0.44	67.82±1.43	64.47±0.26	16.19±0.46
500	57.94±0.23	45.91±0.70	49.10±0.44	47.76±1.56	91.37±0.46	21.77±0.28
250	53.95±0.25	43.35±0.48	40.45±0.22	25.66±0.71	66.44±0.19	65.18±0.32
125	49.24±0.11	33.84±0.44	28.17±0.18	19.45±0.54	68.42±0.62	70.59±0.14
62.5	43.13±0.26	17.32±0.74	11.72±0.48	14.05±0.36	73.61±0.22	67.74±0.14
31.25	25.58±0.58	8.08±0.77	5.62±0.63	8.86±0.67	52.34±0.22	38.08±0.64
15.625	2.97±0.13	4.95±0.28	3.75±0.26	3.3610.85	3.85±0.13	15.03±2.69

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 10 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก

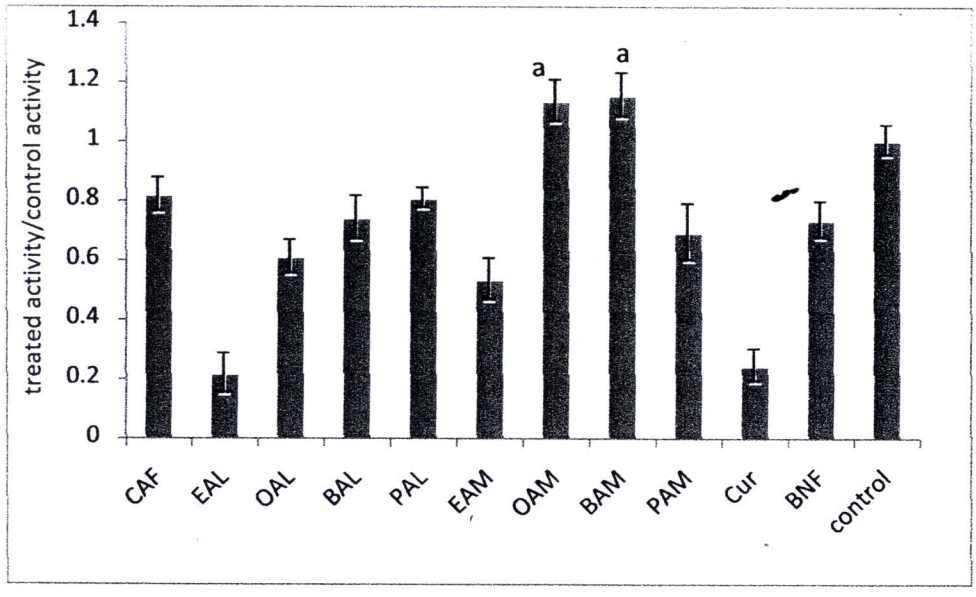


รูปที่ 11 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ของอนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

วัตถุประสงค์ที่ 3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 โดยใช้เนื้อเยื่อมะเร็งตับชนิด Hep G2

3.1 การวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ กลูทาไทโอนรีดักเทส

การศึกษาผลของสารสังเคราะห์ต่อการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์กลูทาไทโอนรีดักเทสในเซลล์ Hep G2 ผลแสดงดังรูปที่ 12 จากรูปเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์กลูทาไทโอนรีดักเทสในกลุ่มที่ได้รับสารสังเคราะห์เทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทดลองพบว่า OAM และ BAM ซึ่งเป็นสารกลุ่มอนุพันธ์เอไมด์มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์มากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ จากการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างสารพบว่าอนุพันธ์เอไมด์มีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์มากกว่าอนุพันธ์ในกลุ่มเอสเทอร์และอนุพันธ์ที่มีหมู่ประกอบ (side chain) ยาวจะมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีมากกว่าหมู่ประกอบสายสั้นๆ

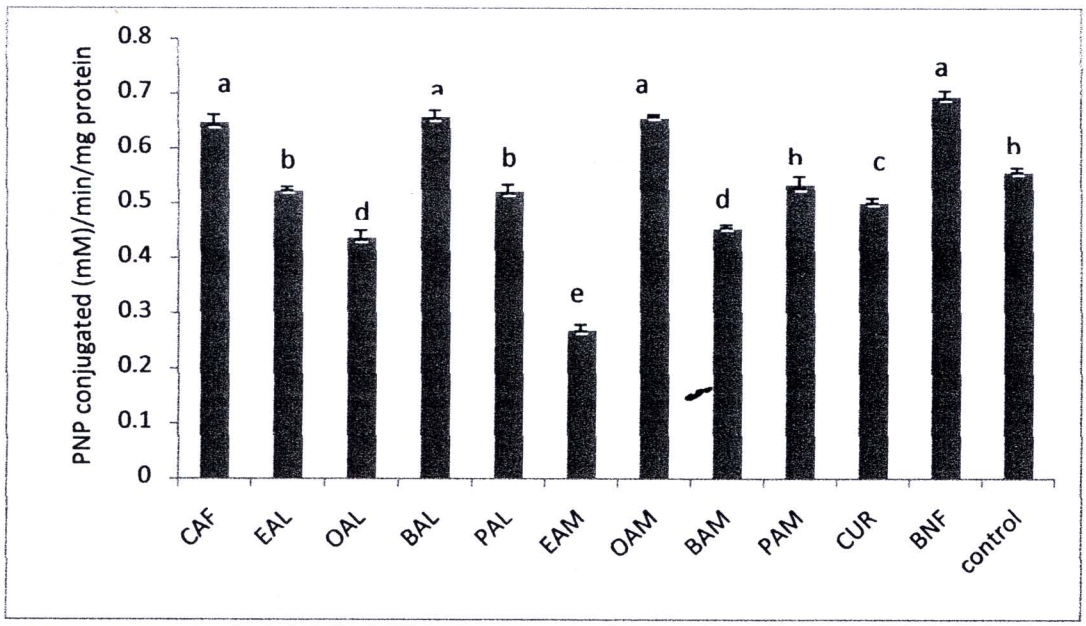


รูปที่ 12 อัตราส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์ glutathione-s- transferase ของกลุ่มทดสอบต่อกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารสังเคราะห์

3.2 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ UDP glucuronosyl transferase

UDP-glucuronosyltransferase (UGT) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญยิ่งในเฟส 2 เนื่องจากมีหน้าที่หลักในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกภายนอกร่างกาย ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตี UGT ในเซลล์ Hep G2 ที่ 24 ชั่วโมงผลแสดงดังรูปที่ 14

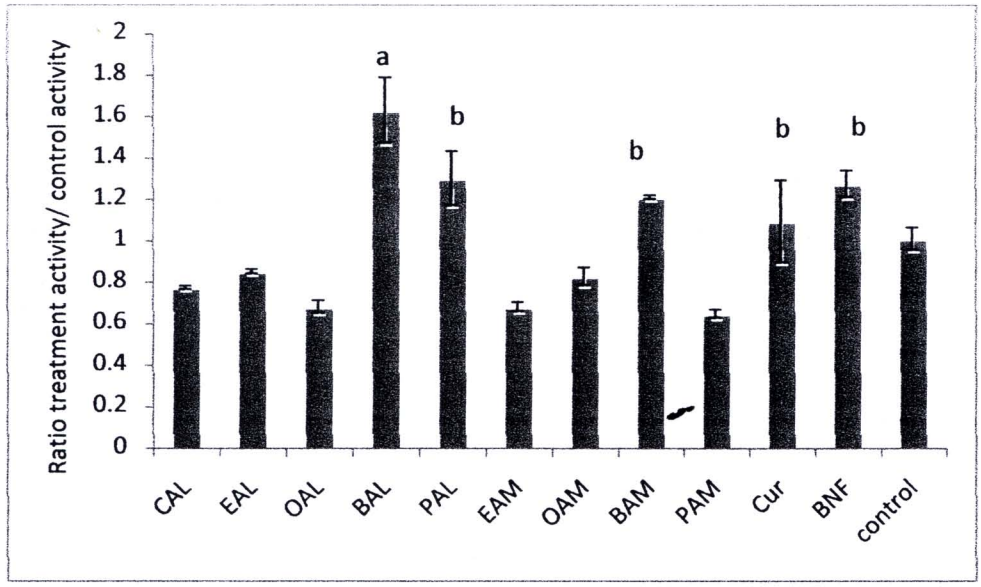
จากผลการทดลองพบว่าสารสังเคราะห์ BAL และ OAM นั้นสารสามารถเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ UGT ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่นๆ และเมื่อเทียบประสิทธิภาพของสารกลุ่มเอไมด์และเอสเทอร์ต่อการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ UGT พบว่ากลุ่มเอสเทอร์นั้นจะมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ได้ดีกว่าเอไมด์และสารที่มี side chain ยาวในโมเลกุลจะมีความสามารถในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ได้ดีกว่าสารที่มี side chain สั้น



รูปที่ 13 อัตราส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์ UDP- glucuronosyltransferase ของกลุ่มทดสอบต่อกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารสังเคราะห์

3.3 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ N-acetyltransferase

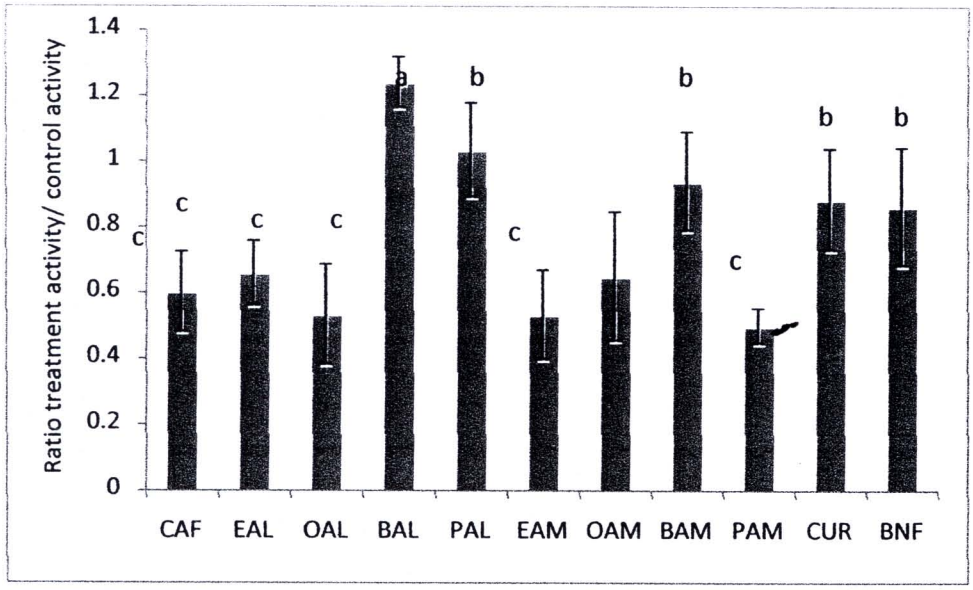
N-acetylation เป็นกลไกที่สำคัญอันหนึ่งในเฟสที่ 2 กระบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ N-acetyltransferase (NAT) ในการทำปฏิกิริยา จากการทดสอบสารสังเคราะห์อนุพันธ์กรดกาเฟอิกโดยใช้เซลล์ Hep G2 ผลแสดงดังรูปที่ 14 จากผลการทดลองพบว่า BAL นั้นมีฤทธิ์ในการกระตุ้นแอกติวิตีเอนไซม์ NAT มากที่สุด รองลงมาคือ PAL และ BAM เมื่อพิจารณาโครงสร้างพบว่าสารที่มี side chain ที่มีวงเบนซินเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลมากจะมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ NAT ได้ดีกว่าสารที่มีวงเบนซินเพียงวงเดียว และเมื่อเปรียบเทียบผลการกระตุ้นระหว่างกลุ่มเอสเทอร์และเอไมด์นั้นพบว่า สารกลุ่มเอสเทอร์นั้นมีความสามารถที่จะเพิ่มแอกติวิตีได้ดีกว่าสารกลุ่ม เอไมด์



รูปที่ 14 อัตราส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์ N-acetyltransferase กลุ่มทดสอบต่อกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารสังเคราะห์

3.4 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ quinine reductase

เอนไซม์ quinine reductase หรือ DT-diaphorase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหน้าที่ในการป้องกันการเกิดมะเร็งจากการทดลองเมื่อเติมสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์กรดกาเฟอิกในเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงผลดังแสดงในรูปที่ 15 จากผลการวิจัยพบว่าสาร BAL นั้นมีความสามารถมากที่สุดในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ quinine reductase รองลงมาคือ PAL, BAM, CUR และ BNF เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างและฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์พบว่าสารที่มีวงเบนซินเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลมากจะมีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ได้ดีกว่าสารที่มีวงเบนซินเป็นองค์ประกอบน้อย และอนุพันธ์พวกเอสเทอร์นั้นจะมีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีมากกว่ากลุ่มเอไมด์



รูปที่ 15 อัตราส่วนแอกติวิตีเอนไซม์ quinine reductase ของกลุ่มทดสอบต่อกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารสังเคราะห์