การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ใช้พูลลูแลน

เป็นสารให้ความเสถียร

Synthesis and Antibacterial Activity of Selenium Nanoparticles Using Pullulan as Stabilizer

โดย

นายสักย์วริษฐ์ นิตราธร

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

เรื่อง การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ใช้พูลลูแลนเป็นสารให้ความเสถียร

โดย นายสักย์วริษฐ์ นิตราธร

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ตันฑุลานิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ จันทรศิริ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดย หัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วัน.....เดือน.....พ.ศ.....

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ใช้พูลลูแลนเป็นสารให้ความเสถียร

ชื่อนิสิตโครงการ นายสักย์วริษฐ์ นิตราธร เลขประจำตัว 533 31266 23

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียม (SeNPs) โดยใช้แอล-ซิสเทอีน (L-cysteine) เป็นตัวรีดิวซ์และพูลลูแลน (Pullulan) เป็นตัวให้ความเสถียร และศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย วิธีการดังกล่าวทำได้ง่ายโดยเติมพูลลูแลนลงไปในสารละลายโซเดียมซีลีไนต์ (Na_2SeO_3) ก่อนทำการรีดิวซ์ด้วยแอล-ซิสเทอีน อัตราส่วนของโซเดียมซีลีไนต์ต่อแอล-ซิสเทอีนที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียม คือ 2:2.5 (w/w) พิสูจน์เอกลักษณ์และหาขนาดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปก-โตรสโกปี กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และแบบส่องผ่าน พบว่าอนุภาคมีขนาดประมาณ 100 นาโนเมตร อนุภาคนาโนของซีลีเนียมมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) และเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)

คำสำคัญ: อนุภาคนาโนของซีลีเนียม, พูลลูแลน, แอล-ซิสเทอีน, การออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, สแตปฟิโล-คอคคัส ออเรียส

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Title Synthesis and Antibacterial Activity of Selenium Nanoparticles Using Pullulan as Stabilizer

Student name Sakvarit Nitrathorn 533 31266 23

Advisor Associate Professor Dr. Nongnuj Muangsin

Co-advisor Assistant Professor Dr. Narong Praphairaksit

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2013

Abstract

In this work, selenium nanoparticles (SeNPs) were synthesized using *L*-cysteine as a reducing agent and pullulan as a stabilizer and evaluated for their antibacterial activity. The SeNPs can be easily prepared by adding pullulan into sodium selenite (Na_2SeO_3) solution before reducing by *L*-cysteine. The optimal ratio of Na_2SeO_3 to L-cysteine was 2:2.5 (w/w). The SeNPs obtained were characterized by UV-visible spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The particle size of SeNPs was approxiately 100 nm. The SeNPs had an activity against *Staphylococcus aureus (S. aureus)* and *Escherichia coli (E. coli)*.

Keyword: Selenium Nanoparticles, Pullulan, *L*-cysteine, Antibacterial activities, *Staphylococcus aureus*

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ในโครงการวิจัยครั้งนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆ ตลอดเวลาที่ทำการวิจัย ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ตันฑุลานิ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ จันทรศิริ ที่กรุณาสละเวลาให้เกียรติเป็นกรรมการในโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ในการเรียนและการทำงานด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาเคมีที่ได้สนับสนุนและให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีจากครอบครัวของผู้ทำการวิจัย รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ในภาควิชาเคมีทุกคน และขอบคุณพี่ๆ นิสิตปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ให้ความรู้ต่างๆ ผู้วิจัยขอระลึกในความกรุณาช่วยเหลือและห่วงใยเสมอมาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปภาพประกอบ	ซ
สารบัญตารางประกอบ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	
2.1 วัสดุนาโน (nanomaterials)	6
2.2 พูลลูแลน (pullulan)	7
2.3 แบคทีเรีย *S.aureus*	9
2.4 แบคทีเรีย *E.coli*	10
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
3.1 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	11
3.2 วิธีการทดลอง	
3.2.1 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนของซีลีเนียม	
- การเตรียมสารตั้งต้น	11
- การหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียม	12
- พิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้	14
3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	
- การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย	14
- การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	14

- ทดสอบฤทธิ์ของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมกับแบคทีเรียทั้งสองชนิด 15

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลองในการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสเปกโตรสโกปี

- การทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นซีลีเนียมที่เหมาะสมที่สุด 17
- การทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นซิสเทอีนที่เหมาะสมที่สุด 19
- การทดลองการหาปริมาณพูลลูแลนที่เหมาะสมที่สุด 22

4.2 ผลการทดลองจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- การถ่ายภาพอนุภาคนาโนของซีลีเนียมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 24
- การถ่ายภาพอนุภาคนาโนของซีลีเนียมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน 27

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่มีต่อแบคทีเรีย

- ทดสอบกับแบคทีเรีย *E.coli* 29
- การทดสอบกับแบคทีเรีย *S.aureus* 31

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 33

เอกสารอ้างอิง 34

ประวัติผู้วิจัย 36

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1.1 อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ปรับเสถียรด้วย a) ไคโตซาน b) คอนยัคกลูโคแมนแนน c) อคาเซียกัม d) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	2
1.2 แสดงสีและสเปกตรัมของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมขนาด 20.0 ± 6.1, 70.9 ± 9.1, 101.6 ± 9.8, 146.1 ± 23, 182.8 ± 33.2 และ 240.4 ± 32.2 นาโนเมตร ตามลำดับ	2
1.3 แสดงการเปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมตามความเข้มข้นของแอล-ซิสเทอีนที่ใช้ และกราฟการดูดกลืนแสง	3
1.4 กราฟแสดงอัตราความหนาแน่นของแบคทีเรียสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ด้วยอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆในเวลาที่ต่างกัน	4
1.5 โครงสร้างของอนุภาคที่ได้จากข้อมูลต่างๆ, การเลือกจำเพาะของอนุภาคโดยดูจากความเข้มข้นของซีลีเนียมภายในเซลล์ และค่าศักย์ซีต้าดูการเปลี่ยนแปลงประจุของเซลล์	4
2.1 โครงสร้างของพูลลูแลน	8
2.2 เชื้อ *S.aureus*	9
2.3 เชื้อ *E.coli*	10
4.1 สีของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้เมื่อปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของซีลีเนียมจาก 0-10 mM ในพูลลูแลน 5% 400 µL และใช้แอล-ซิสเทอีน 2.5 mM C = 0 mM, 1 = 2 mM, 2 = 4 mM, 3 = 6 mM, 4 = 8 mM และ 5 = 10 mM	17
4.2 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีลีเนียมด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี	18
4.3 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีลีเนียมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี	19
4.4 สีของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้เมื่อปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแอล-ซิสเทอีนจาก 0.00-5.00 mM ในพูลลูแลน 5% 400 µL และใช้โซเดียมซีลีไนต์ 2 mM C = 0.00 mM, 1 = 0.25 mM, 2 = 1.25 mM, 3 = 2.50 mM, 4 = 3.75 mM และ 5 = 5.00 mM	20

4.5 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของซิสเทอีนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี 20
4.6 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของซิสเทอีนด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี 21
4.7 สีของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้เมื่อปรับเปลี่ยนปริมาตรของพูลลูแลน 5% จาก 0-800 µL โดยใช้แอล-ซิสเทอีน 2.5 mM และใช้โซเดียมซีลีไนต์ 2 mM C = 0 µL, 1 = 100 µL, 2 = 250 µL, 3 = 400 µL, 4 = 650 µL และ 5 = 800 µL 23
4.8 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของพูลลูแลนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี 23
4.9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ไม่มีการเติมพูลลูแลน 25
4.10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 0.25 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน 25
4.11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 1.25 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน 26
4.12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 2.50 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน 26
4.13 ภาพถ่ายอนุภาคนาโนของซีลีเนียมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังขยายต่างๆ 27
4.14 อัตราการรอดของแบคทีเรีย *E.coli* 29
4.15 อัตราการรอดของแบคทีเรีย *S.aureus* 31

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
2.1 สมบัติทางกายภาพของพูลลูแลน	7
3.1 แสดงปริมาณสารต่างๆที่ใช้ในการทำการทดลองหาปริมาณความเข้มข้น Sodium selenite ที่เหมาะสมที่สุด	12
3.2 แสดงปริมาณสารต่างๆที่ใช้ในการทำการทดลองหาปริมาณความเข้มข้น L-cysteine hydrochloride ที่เหมาะสมที่สุด	13
3.3 แสดงปริมาณสารต่างๆที่ใช้ในการทำการทดลองหาปริมาณความเข้มข้น Pullulan ที่เหมาะสมที่สุด	13
4.1 แสดงค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมในแบคทีเรีย *E.coli*	29
4.2 แสดงค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมในแบคทีเรีย *S.aur*eus	31

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

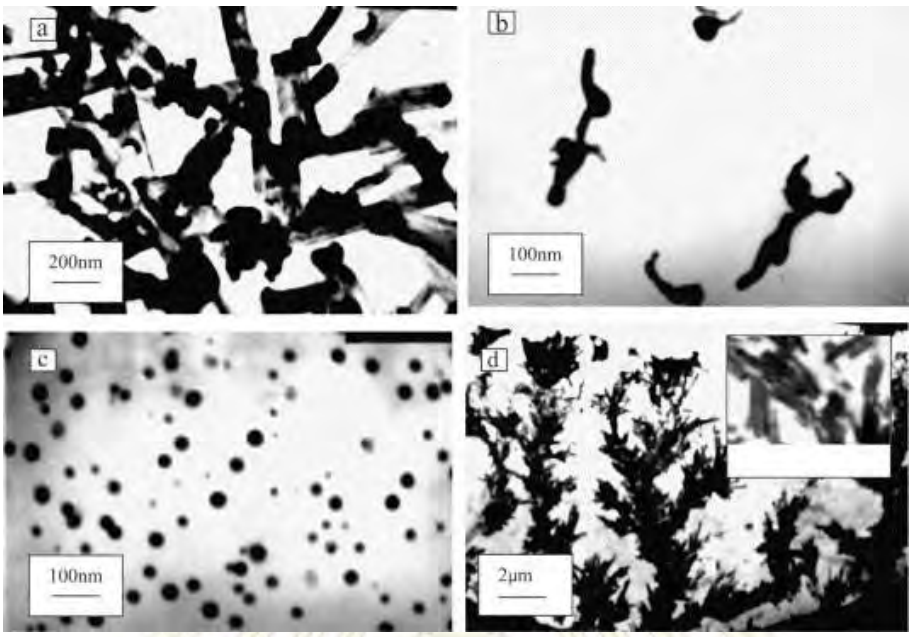
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ซีลีเนียม (Selenium) เป็นธาตุที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารอาหารที่ร่างกายต้องการในปริมาณน้อย (trace element) มีความสัมพันธ์กับหน้าที่ของเอนไซม์ในระบบกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione perioxidase) ซึ่งเป็นระบบการต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญของร่างกาย และเมื่อนำธาตุซีลีเนียมไปสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโน จะทำให้มีคุณสมบัติในการเป็นยาต้านมะเร็งและยาต้านแบคทีเรียเพิ่มขึ้นด้วย แต่การทำอนุภาคนาโนของซีลีเนียมจะมีความเสถียรของอนุภาคที่จะนำไปใช้ได้ค่อนข้างต่ำ งานวิจัยก่อนหน้าจึงพยายามพัฒนาอนุภาคนาโนของซีลีเนียมให้มีความเสถียรมากขึ้น ทำให้สามารถเก็บไว้ได้นานขึ้น โดยการใช้สารปรับเสถียร (stabilizer) เป็นกลุ่มสารจำพวกพอ-ลิเมอร์ จึงได้ทำการศึกษาหาข้อมูลจากงานวิจัยก่อนหน้า ได้มีการวิจัยไว้ดังนี้

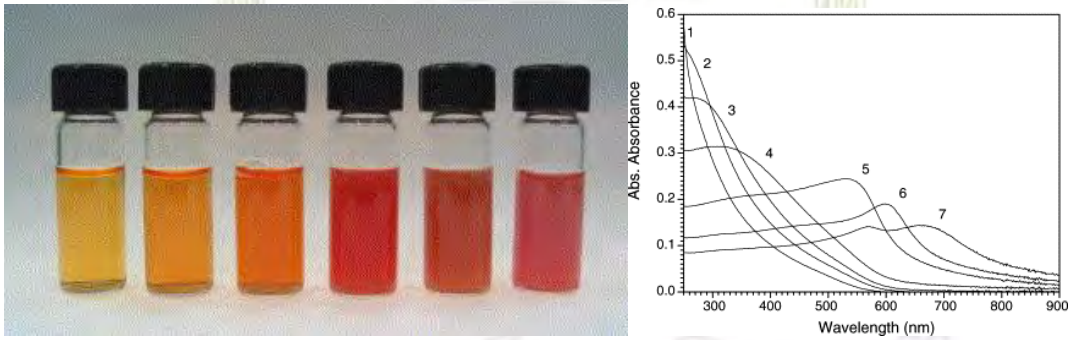
ในปี 2004 Zhang และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียมโดยใช้สารจำพวกพอลิแซคคาไรด์เป็นสารปรับเสถียร มีการใช้พอลิเมอร์ทำการทดลอง 4 ชนิด คือ ไคโตซาน, คอนยัคกลูโคแมนแนน, คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และ อคาเซียกัม พบว่าการใช้พอลิแซคคาไรด์ต่างชนิดกัน จะทำให้อนุภาคที่ได้มีรูปร่างต่างกัน และอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้มีความเสถียรมากขึ้น อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในทางอาหารและยาได้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



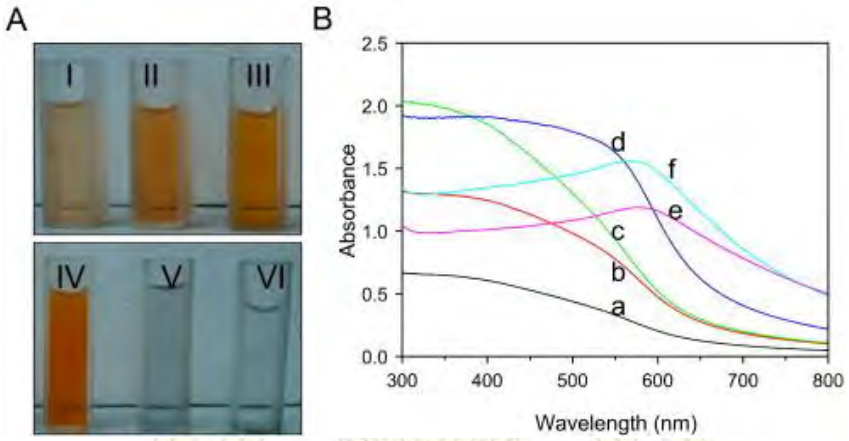
รูปที่ 1.1 อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ปรับเสถียรด้วย a) ไคโตซาน b) คอนยัคกลูโคแมนแนน c) อคาเซียกัม d) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส [1]

ในปี 2005 Lin และคณะได้ทำการศึกษาสเปกตรัมของอนุภาคนาโนของซีลีเนียม โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี เทียบกับการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เพื่อศึกษาขนาดของอนุภาค เทียบกับความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง และตั้งสมมติฐานว่า ความเข้มข้นของตัวรีดิวซ์ที่ใช้มีผลต่อขนาดอนุภาค พบว่า เมื่อใช้ตัวรีดิวซ์ที่มีความเข้มข้นมาก อนุภาค-นาโนจะมีขนาดเล็กกว่าการใช้ตัวรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นน้อย และอนุภาคนาโนขนาดเล็กกว่า จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำกว่าเช่นกัน ทำให้อนุภาคขนาดเล็กจะเป็นสารละลายสีส้มที่อ่อนกว่า ดังภาพ



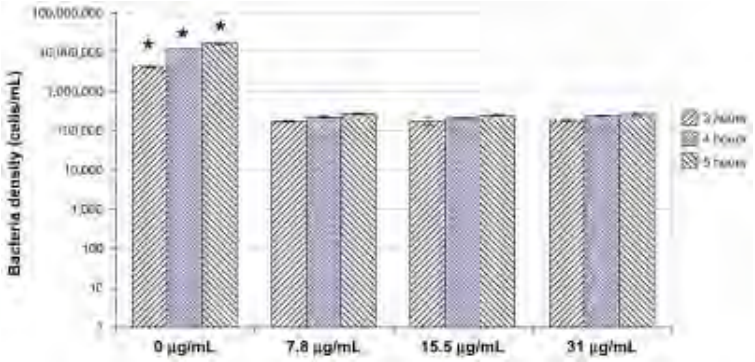
รูปที่ 1.2 แสดงสีและสเปกตรัมของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมขนาด 20.0 ± 6.1, 70.9 ± 9.1, 101.6 ± 9.8, 146.1 ± 23, 182.8 ± 33.2 และ 240.4 ± 32.2 นาโนเมตร ตามลำดับ [2]

ในปี 2010 Li และคณะได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียมในขั้นตอนเดียวโดยใช้ตัวรีดิวซ์เป็นแอล-ซิสเทอีน (L-cysteine) พบว่า การใช้แอล-ซิสเทอีนความเข้มข้นต่างกัน ทำให้ขนาดอนุภาคที่ได้มีค่าต่างกัน แต่มีความต่างไม่มาก และถ้าใช้ที่ความเข้มข้นมากเกินไป จะไม่เกิดอนุภาคนาโน จึงไม่เห็นการเปลี่ยนสี และเมื่อทำการตรวจวัดความเสถียร พบว่า อนุภาคจะมีขนาดเดิมจนถึงประมาณ 120 ชั่วโมง ถ้าเกินจากนั้นจะเกิดการรวมตัว (aggregation) ในงานวิจัยนี้ แอล-ซิสเทอีนถือเป็นตัวปรับเสถียรให้พื้นผิวด้วย



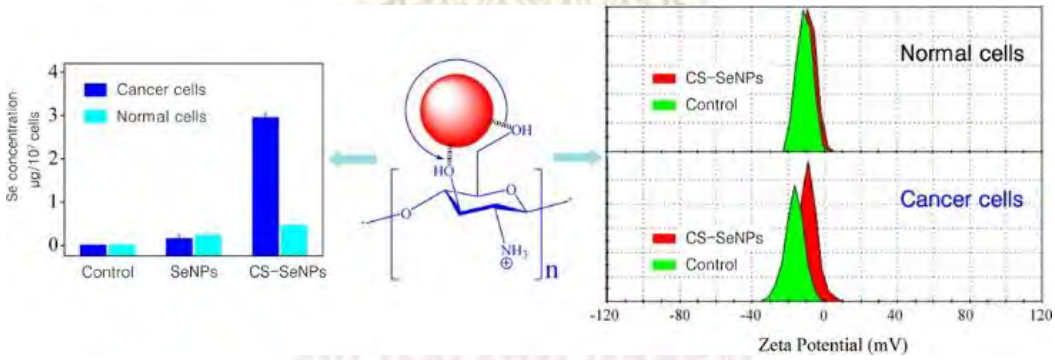
รูปที่ 1.3 แสดงการเปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมตามความเข้มข้นของแอล-ซิสเทอีนที่ใช้และกราฟการดูดกลืนแสง โดย I=a, II=b, III=c, IV=d, V=e และ VI=f [4]

ในปี 2011 Tran และคณะได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ใช้ในการทดลองมีขนาด 40-60 นาโนเมตร พบว่าอัตราความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ตรวจวัดได้ภายในระยะเวลาที่ทำการทดลอง (3, 4 และ 5 ชั่วโมง) มีค่าลดลงในระดับหนึ่ง และความเข้มข้นของซีลีเนียมไม่มีผลในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยเป็นกลุ่มแรกๆที่ทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของซีลีเนียม จึงอาจต้องมีการพัฒนาต่อไป



รูปที่ 1.4 กราฟแสดงอัตราความหนาแน่นของแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ด้วยอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆในเวลาที่ต่างกัน [5]

ในปี 2012 Yu และคณะ ได้ทำการปรับแต่งพื้นผิวของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมด้วยไคโต-ซาน ให้มีประจุบวก เพื่อเพิ่มการเลือกจำเพาะและเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งในส่วนต่างๆของร่างกายเทียบกับเซลล์ปกติ พบว่าอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ผ่านการปรับแต่งพื้นผิวด้วยไคโตซานจะสามารถเข้าไปสู่เซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับอนุภาคที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งพื้นผิว ทำให้เซลล์เข้าสู่การตายแบบอะพอพโทซิส และถ้าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมมากขึ้น จะออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น



รูปที่ 1.5 โครงสร้างของอนุภาคที่ได้จากข้อมูลต่างๆ, การเลือกจำเพาะของอนุภาคโดยดูจากความเข้มข้นของซีลีเนียมภายในเซลล์ และค่าศักย์ซีต้าดูการเปลี่ยนแปลงประจุของเซลล์ [8]

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยต้องการศึกษาในส่วนของฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียเพิ่มเติม โดยทำการปรับปรุงพื้นผิวโดยใช้พูลลูแลน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มเดียวกับอคาเซียกัม ที่ให้อนุภาคเป็นทรงกลม เพื่อเพิ่มความเสถียรให้มากขึ้น และแบคทีเรียที่จะใช้ศึกษาคือแบคทีเรียในสายพันธุ์สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ สายพันธุ์เอสเชอริเชียโคไล (Escherichia coli) ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เพื่อดูความแตกต่างของการออกฤทธิ์ในแบคทีเรียทั้งสองชนิด และใช้ตัวรีดิวซ์เป็นแอล-ซิสเทอีน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียมให้มีความเสถียรมากขึ้น โดยมีพูลลูแลนเป็นตัวปรับเสถียร
- เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของซีลีเนียม และเปรียบเทียบในแบคทีเรียต่างชนิดกัน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่มีความเสถียรมากขึ้นได้
- สามารถนำอนุภาคนาโนของซีลีเนียมมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย และบอกความแตกต่างในการออกฤทธิ์ได้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ซีลีเนียม (Selenium)

ซีลีเนียม เป็นธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย จัดอยู่ในประเภทธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace element) ทำหน้าที่ร่วมกับไอนไซม์ในระบบกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซึ่งเป็นระบบการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดในเซลล์ ซีลีเนียมจะถูกดูดซึมได้ดีที่ลำไส้เล็ก และเก็บไว้ที่ตับและไตมากกว่ากล้ามเนื้อหรือเนื้อเยื่ออื่นๆประมาณ 4-5 เท่า โดยปกติถ้ามีซีลีเนียมเกิน จะถูกขับออกทางปัสสาวะ

ประโยชน์ของซีลีเนียมที่มีต่อร่างกาย

- ทำงานร่วมกับวิตามินอีเพื่อป้องกันและกำจัดสารเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น
- ช่วยชะลอการแก่ตายของเซลล์ตามธรรมชาติ ป้องกันการแก่ก่อนวัย
- ช่วยให้หัวใจทำงานได้ดีขึ้น ลดความเสี่ยงในการเกิดหัวใจวาย
- ส่งเสริมให้ร่างกายเติบโตให้เป็นปกติ ควบคุมสุขภาพสายตา ผิวหนังและเส้นผม
- ส่งผลให้ประจำเดือนของเพศหญิงเป็นไปตามปกติ
- ต้านและละลายสารพิษต่างๆที่เข้าสู่ร่างกาย
- ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อด้วย
- ป้องกันกัมมันตภาพรังสี และโลหะหนักที่เป็นพิษ

ปริมาณซีลีเนียมที่ควรได้รับต่อวัน (RDA) อยู่ที่ 70-200 ไมโครกรัม และถ้าเป็นสารเสริมอาหาร ควรอยู่ในรูปคีเลต หรือ *L*-selenomethionine form แต่ถ้าได้รับในปริมาณเกินกว่า 400 ไมโครกรัมต่อวัน จะทำให้เกิดพิษของซีลีเนียม (selenosis) ผู้ที่รับซีลีเนียมมากเกินไปจะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ ผมร่วง และถ้าได้รับติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดภาวะตับวายได้ ในส่วนของ

การขาดซีลีเนียม จะนำไปสู่การแก่ก่อนวัย เพราะซีลีเนียมจะช่วยในการรักษาความยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อ

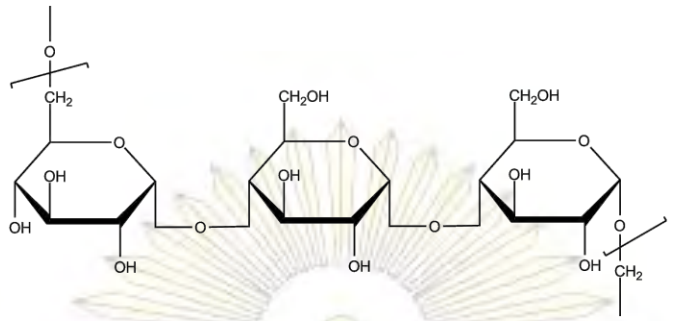
แหล่งของซีลีเนียมที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ คือ บริวเวอร์ยีสต์ เครื่องในสัตว์ ปลา หอย ข้าวกล้อง แตงกวา แอลมอนด์ ผลิตภัณฑ์จากนมกระเทียม เห็ดต่างๆ บร็อคโคลี่ หัวหอม มะเขือเทศ อาหารทะเลต่างๆ แต่ซีลีเนียมจะถูกทำลายได้ด้วยเมื่อถูกกระทบกระเทือนหรือการให้ความร้อน เช่น ถ้าผลิตแป้งจากข้าวจะทำให้สูญเสียซีลีเนียมไป 50%

2.2 พูลลูแลน (pullulan)

พูลลูแลน เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตทริโอส (maltotriose) คือเป็นหน่วยน้ำตาลกลูโคส 3 หน่วยเชื่อมติดกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 ไกลโคซิดิก (α-1,4 glycosodic bond) และแต่ละหน่วยของมอลโตทริโอสเชื่อมติดกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก (α-1,6 glycosodic bond) พบได้จากการย่อยแป้งของเชื้อรา “ออรีโอแบซิเดียม พูลลูแลนส์” (*Aureobasidium pullulans*)

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพของพูลลูแลน

พารามิเตอร์	**รายละเอียด**
ลักษณะภายนอก	ผงสีขาวหรือขาวแกมเหลือง
การละลายน้ำ (25^oC)	ละลายได้ดี
ความไวแสงจำเพาะ $[\alpha] D_2O$ (1% ในน้ำ)	อย่างน้อย $+160^o$
พอลิเปปไทด์ (%)	ไม่เกิน 0, 5
pH ของสารละลาย	5-7
แร่ธาตุตกค้าง-เถ้า (ซัลเฟต, %)	ไม่เกิน 3
ความชื้น (สูญเสียจากการทำให้แห้ง, %)	ไม่เกิน 6
มวลโมเลกุล (กิโลดาลตัน kDa)	100-250



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของพูลลูแลน [14]

ปัจจุบัน พูลลูแลนถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ ดังนี้

- อุตสาหกรรมอาหาร 1) นำมาใช้แทนแป้งบางส่วนในการทำพาสต้าหรืออาหารที่ผ่านการอบ เนื่องจากพูลลูแลนเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีแคลอรีต่ำ 2) ใช้เป็นสารเติมเต็มที่มีความหนืดต่ำในเครื่องดื่มและซอสต่างๆ เพราะความหนืดของพูลลูแลนจะไม่ได้รับผลกระทบจากความร้อน การเปลี่ยนค่า pH และไอออนของโลหะต่างๆ 3) สามารถใช้เป็นตัวเชื่อมและตัวปรับเสถียรในเครื่องปรุงอาหาร 4) ฟิล์มที่ผลิตจากพูลลูแลนนำมาใช้ทำห่อบรรจุอาหารแห้งได้ จำพวกถั่ว อาหารเส้น ผัก และเนื้อสัตว์
- อุตสาหกรรมยา 1) นำมาใช้ในด้านทันตกรรม โดนทำเป็นกาวสำหรับติดฟันปลอม 2) ใช้เป็นสารเคลือบยาเม็ด ป้องกันยาเสื่อมสภาพ ทำให้รักษาอายุของยาได้นานขึ้น 3) ใช้เป็นตัวขยายพลาสมาในเลือดแทนเดกซ์แทรน 4) ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ที่ใช้บำรุงรักษาร่างกาย เช่น สบู่ ยาสระผม โลชัน หรือเครื่องสำอางอื่นๆ
- อุตสาหกรรมอื่นๆ 1) ใช้เป็นสารเคลือบเส้นใยเพื่อเพิ่มสมบัติความโปร่งแสง ความเหนียว และยังเป็นสารเคลือบที่ไม่มีพิษ 2) ใช้เป็นสารช่วยจับตัวในอุตสาหกรรม เช่นการเคลือบกระดาษ เพื่อให้หมึกพิมพ์ติดดีขึ้น 3) ใช้ในงานทางด้านภาพถ่าย การพิมพ์ และอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

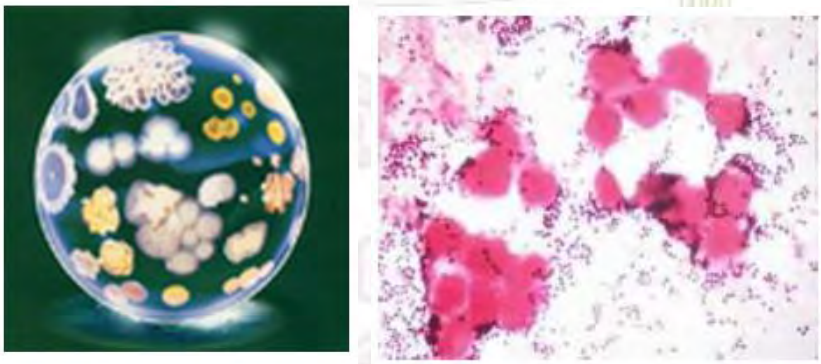
2.3 แบคทีเรีย *S.aureus*

S.aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะ กลม โคโลนีมีสีเหลือง เติบโตได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญเติบโต คือ 35-40 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7-7.5 บางสายพันธุ์จะสามารถผลิตสารพิษที่เรียกว่า “เอนเทอโรทอกซิน” ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ และสามารถผลิตสารชนิดนี้ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย *S.aureus* มีชีวิตอยู่ได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนมภายในร่างกายสิ่งมีชีวิต จะพบได้บริเวณทางเดินหายใจ ลำคอ หรือเส้นผมและผิวหนังประมาณ 50% หรือมากกว่าในผู้ที่มีสุขภาพดี การเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้เกิดจากการเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม เชื้อจึงมีการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็ว

อันตรายที่พบได้จากแบคทีเรียชนิดนี้ คือ เป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้สูงถึง 143.3 องศาเซลเซียส เพราะฉะนั้นอุณหภูมิในการหุงต้มอาหารไม่สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้ โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากแบคทีเรีย *S.aureus* มีชื่อเรียกว่า Staphyloenterotoxicosis และ Staphylorenterotoxemia ลักษณะของอาการที่พบ คือ มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย ขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ได้รับ โดยปริมาณที่ทำให้เกิดโรคคือเมื่อมีสารเอน-เทอโรทอกซินปนเปื้อนในอาหารประมาณ 1 ไมโครกรัม

วิธีป้องกันการเกิดโรคจากแบคทีเรีย *S.aureus* คือ ควรรับประทานอาหารขณะที่ร้อนอยู่และไม่ควรเก็บอาหารที่ปรุงเสร็จแล้วไว้ในอุณหภูมิสูง ผู้ปรุงอาหารก็ควรจะป้องกันโดยการไม่ไอหรือจามรดอาหารขณะที่ปรุง



รูปที่ 2.2 แบคทีเรีย *S.aureus* [15]

2.4 แบคทีเรีย *E.coli*

E.coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส พบได้ในลำไส้ของสัตว์และมนุษย์ บางชนิดจะช่วยในการย่อยอาหารภายในลำไส้ แต่จะมีชนิดที่สามารถทำอันตรายได้ โดยอาการทั่วไปที่พบเมื่อได้รับแบคทีเรียชนิดนี้เข้าสู่ร่างกาย คือ ทำให้เกิดอาการท้องเสีย อาจรุนแรงถึงขั้นถ่ายเป็นเลือดได้ โดยปกติเมื่อเกิดโรคดังกล่าว จะสามารถหายได้เองภายใน 10 วัน

แบคทีเรีย *E.coli* จะเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านการรับประทาน เมื่อมีการปนเปื้อนในอาหารและน้ำ ในเด็ก ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ จะมีความเสี่ยงในการเกิดโรคจากแบคทีเรียชนิดนี้ได้มากกว่า

วิธีการป้องกันเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* คือ การรักษาความสะอาดของร่างกาย ล้างมือก่อนรับประทานอาหารและหลังการเข้าห้องน้ำทุกครั้ง รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ๆ ไม่รับประทานอาหารดิบ เพราะแบคทีเรียชนิดนี้จะถูกทำลายได้ด้วยการใช้ความร้อนสูง

การรักษาเมื่อได้รับเชื้อ สามารถรับประทานยาแก้ปวดท้องเบื้องต้นได้ แต่ไม่ควรรับประทานยากลุ่มสเตอรอยด์ เช่น ยาแอสไพริน เพราะจะมีผลต่อไตของผู้ที่รับประทานยาเข้าไป และควรหลีกเลี่ยงการดื่มชา กาแฟ เครื่องดื่มบรรจุกระป๋องและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

รูปที่ 2.3 แบคทีเรีย *E.coli* [16]

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. Sodium selenite บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด
2. L-cysteine hydrochloride บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด
3. Pullulan บริษัท TCI จำกัด
4. แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus (S.aureus)*
5. แบคทีเรีย *Escherichia coli (E.coli)*
6. Mueller Hinton Broth บริษัท HiMedia Laboratories จำกัด
7. Anhydrous Ampicilin บริษัท T.P. Drug Laboratories (1969) จำกัด
8. เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี ยี่ห้อ Agilent รุ่น HP8453
9. เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี ยี่ห้อ Varian รุ่น Cary Eclipse
10. เครื่องไมโครไทเทอร์เพลท ยี่ห้อ BioTek รุ่น PowerWave XS2
11. 96 well plate
12. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
13. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนของซีลีเนียม

<u>การเตรียมสารตั้งต้น</u>

- ชั่งโซเดียมซีลีไนต์ 0.0865 กรัม ละลายในน้ำ 5 มิลลิลิตร ได้สารละลายโซเดียม-ซีลีไนต์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

- ชั่งพูลลูแลน 2.5 กรัม ละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตร ได้สารละลายพูลลูแลนความเข้มข้น 5%
- ชั่งแอล-ซิสเทอีน 0.0078 กรัม ละลายในน้ำ 5 มิลลิลิตร ได้สารละลายแอล-ซิสเทอีน ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง)

<u>การหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียม</u>

- ลำดับขั้นการทดลอง
  1) เติมสารละลายโซเดียมซีลีไนต์ในหลอดทดลอง
  2) เติมพูลลูแลนในหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมซีลีไนต์ แล้วตั้งคนทิ้งไว้ 30-45 นาที
  3) เติมสารละลายแอล-ซิสเทอีนในหลอดทดลองที่มีสารละลายผสม ปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ตั้งคนทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปทำการทดลองในส่วนอื่นต่อไป

- การหาปริมาณความเข้มข้นของซีลีเนียมที่เหมาะสมที่สุด

ข้อมูลแสดงปริมาณสารต่างๆที่ใช้ ดังนี้

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารต่างๆที่ใช้ในการทำการทดลองหาปริมาณความเข้มข้นโซเดียมซีลีไนต์ที่เหมาะสมที่สุด

หลอดที่	Na_2SeO_3 (mM)	Pullulan 5 % (µL)	L-cysteine (mM)
C	0	400	2.50
1	2	400	2.50
2	4	400	2.50
3	6	400	2.50
4	8	400	2.50
5	10	400	2.50

- การหาปริมาณความเข้มข้นของแอล-ซิสเทอีนที่เหมาะสมที่สุด

ข้อมูลแสดงปริมาณสารต่างๆที่ใช้ ดังนี้

ตารางที่ 3.2 ปริมาณสารต่างๆที่ใช้ในการทำการทดลองหาปริมาณความเข้มข้นแอล-ซิสเทอีนที่เหมาะสมที่สุด

หลอดที่	Na_2SeO_3 (mM)	Pullulan 5 % (µL)	L-cysteine (mM)
C	2	400	0.00
1	2	400	0.25
2	2	400	1.25
3	2	400	2.50
4	2	400	3.75
5	2	400	5.00

- การหาปริมาณความเข้มข้นของพูลลูแลนที่เหมาะสมที่สุด

ข้อมูลแสดงปริมาณสารต่างๆที่ใช้ ดังนี้

ตารางที่ 3.3 ปริมาณสารต่างๆที่ใช้ในการทำการทดลองหาปริมาณความเข้มข้นพูลลูแลนที่เหมาะสมที่สุด

หลอดที่	Na_2SeO_3 (mM)	Pullulan 5 % (µL)	L-cysteine (mM)
C	2	0	2.50
1	2	100	2.50
2	2	250	2.50
3	2	400	2.50
4	2	650	2.50
5	2	800	2.50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้

- วิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี สารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เรียงลำดับตามความเข้มข้น จากต่ำที่สุด ไปจนถึงสูงที่สุด หาค่าความยาวคลื่นที่ได้ค่าความเข้มแสงสูงที่สุดในแต่ละสเปกตรัม
- ส่งไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน เพื่อถ่ายภาพ ดูลักษณะการกระจายตัว วัดขนาดของอนุภาค และวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย

ชั่ง Mueller Hinton Broth 10.5 กรัม ละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร (ใช้ความร้อนช่วยในการละลายได้) เก็บไว้ในตู้เย็น

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

นำอาหารเลี้ยงเชื้อเทใส่หลอดสำหรับเพาะเชื้อ 7 มิลลิลิตร ทั้งสิ้นสองหลอด หลอดแรก เขี่ยแบคทีเรีย *Staphylococcus aurues* จากเพลทเก็บเชื้อใส่ลงในหลอด ทำเช่นเดียวกันกับแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในอีกหลอดหนึ่ง นำทั้งสองหลอดที่มีแบคทีเรียไปเลี้ยงให้โต ที่อุณหภูมิ 37.0±0.1 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความถี่ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบฤทธิ์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ทดสอบฤทธิ์ของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมกับแบคทีเรียทั้งสองชนิด</u>

- เติมแบคทีเรียลงใน 96 well plate ตามช่องที่มีเครื่องหมาย X ดังต่อไปนี้ 180 ไมโครลิตร ต่อช่อง (ทำการทดลองแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* กับ *Escherichia coli* แยกกัน)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		X	X	X	X	X	X	X			X	
C		X	X	X	X	X	X	X			X	
D		X	X	X	X	X	X	X			X	
E												
F												
G												
H												

- เติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่ 2 และ 11
- เติมสารตัวอย่างหลอดที่ C จากการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นของซีลีเนียมที่เหมาะสม 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่ 3
- เติมยา anhydrous ampicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ลงในคอลัมน์ที่ 4 20 ไมโครลิตร
- เติมสารตัวอย่างหลอดที่ C จากการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นของพูลลูแลนที่เหมาะสม 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่ 5
- เติมสารตัวอย่างหลอดที่ 1 จากการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นของแอลซิสเทอีนที่เหมาะสม 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่ 6
- เติมสารตัวอย่างหลอดที่ 2 จากการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นของแอลซิสเทอีนที่เหมาะสม 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่ 7
- เติมสารตัวอย่างหลอดที่ 3 จากการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นของแอลซิสเทอีนที่เหมาะสม 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่ 8

- ตั้งไว้ในเครื่องเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37.0±0.1 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่า ทิ้งไว้ข้ามคืน
- นำเพลทที่ทำการทดสอบฤทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องไมโครไทเทอร์เพลท โดยตั้งค่าความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 600 นาโนเมตรสำหรับ *E.coli* และ 562 นาโนเมตรสำหรับ *S.aureus* เพื่อวัดค่าความเข้มแสง วิเคราะห์ผลจากข้อมูลที่ได้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

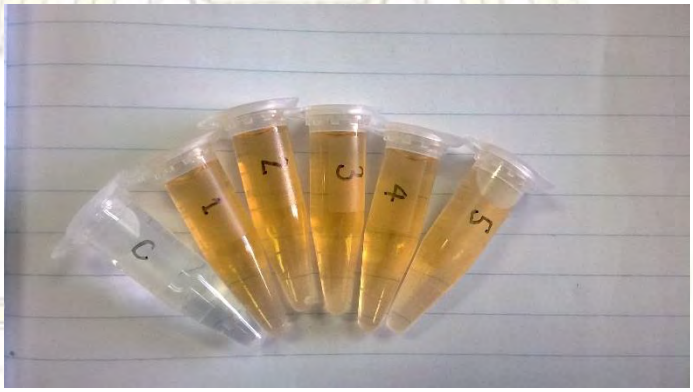
ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลองในการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสเปกโตรสโกปี

1. การทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นซีลีเนียมที่เหมาะสมที่สุด

การทดลองชุดนี้เป็นการทดสอบการเกิดอนุภาคนาโนของซีลีเนียมโดยการรีดิวซ์ซีลีเนียม (IV) ให้กลายเป็นซีลีเนียม (0) ด้วยแอล-ซิสเทอีน จุดประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างของปริมาณซีลีเนียมที่ใช้ ส่งผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนที่ได้อย่างไร

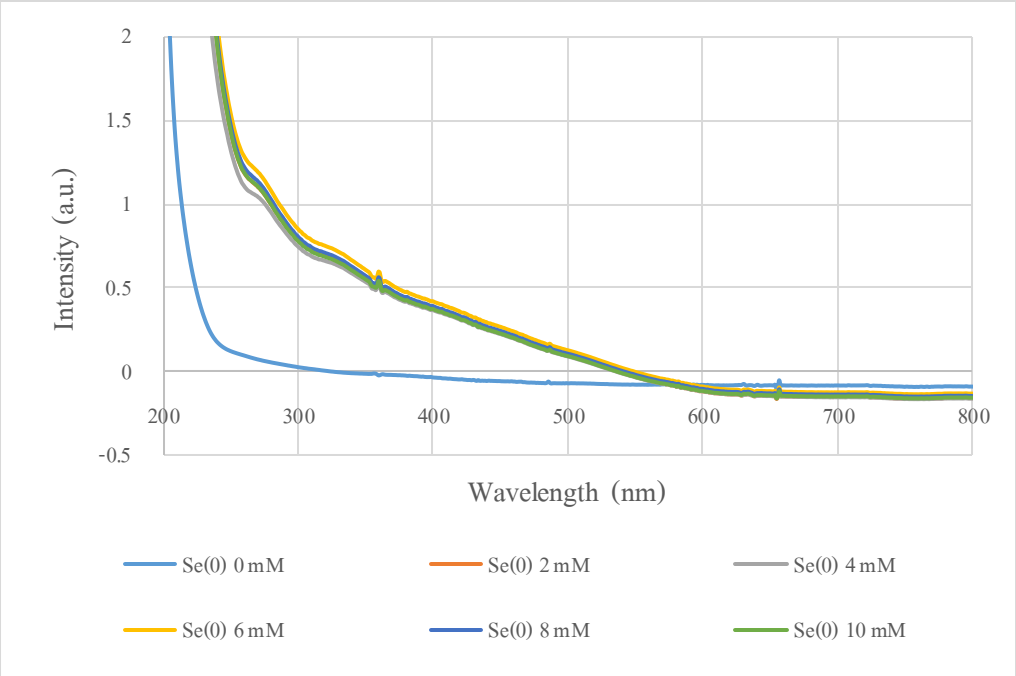
จากการทดลอง พบว่า สารตัวอย่างที่มีซีลีเนียมจะเปลี่ยนสี จากสารละลายใส ไม่มีสี เป็นสารละลายสีส้ม หลังจากถูกรีดิวซ์ด้วยแอล-ซิสเทอีนซึ่งแสดงว่ามีซีลีเนียม(0) เกิดขึ้น มีสีดังรูป 4.1



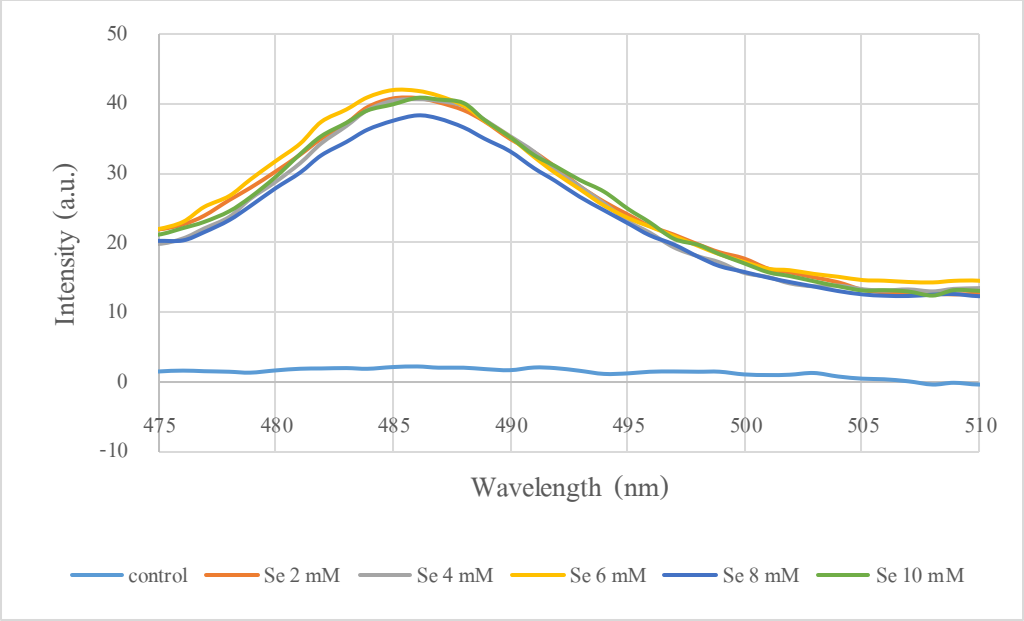
รูปที่ 4.1 สีของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้เมื่อปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของซีลีเนียมจาก 0-10 mM ในพูลลูแลน 5% 400 µL และใช้แอล-ซิสเทอีน 2.5 mM C = 0 mM, 1 = 2 mM, 2 = 4 mM, 3 = 6 mM, 4 = 8 mM และ 5 = 10 mM

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยจึงนำอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้ในการทดลองชุดนี้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี เพื่อประเมินหาขนาดอนุภาคของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้ โดยพิจารณาจากค่าความยาวคลื่นตำแหน่งที่มีความเข้มแสงสูงที่สุด จากรูปที่ 4.2 พบว่า มีการดูดกลืนแสงยูวี 2 ช่วงด้วยกัน คือประมาณ 250-280 นาโนเมตร และ 320-360 นาโนเมตร ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 1.2 ที่รายงานโดย Lin และคณะ [2] ซึ่งมีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันและรายงานว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 101.6±9.8 นาโนเมตร แต่เนื่องจากกราฟที่ได้จากเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปีไม่สามารถแยกความแตกต่างปริมาณสารที่สังเคราะห์ได้เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จึงนำสารตัวอย่างในการทดลองชุดนี้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี โดยในตอนแรกเลือกกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร เพราะสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี มีสัญญาณขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตร และพบว่าให้สัญญาณการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ดีกว่าที่ความยาวคลื่นอื่นๆ ให้เป็นพลังงานกระตุ้นสำหรับเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีลีเนียมด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี



รูปที่ 4.3 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีลีเนียมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี

จากการวิเคราะห์ พบว่า ผลการทดลองสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี คือเมื่อมีการรีดิวซ์จากซีลีเนียม(IV) เป็นซีลีเนียม(0) พบว่ามีความยาวคลื่นการคายแสงสูงสุดที่ 485 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่า ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อปรับเปลี่ยนซีลีเนียมจาก 0-10 มิลลิโมลาร์ไม่แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะว่าปริมาณแอล-ซิสเทอีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ ได้รีดิวซ์ซีลีเนียมไม่หมด หรือแอล-ซิสเทอีนยังน้อยเกินไป ดังนั้น ในการทดลองถัดไป จึงหาปริมาณแอล-ซิสเทอีนที่เหมาะสม

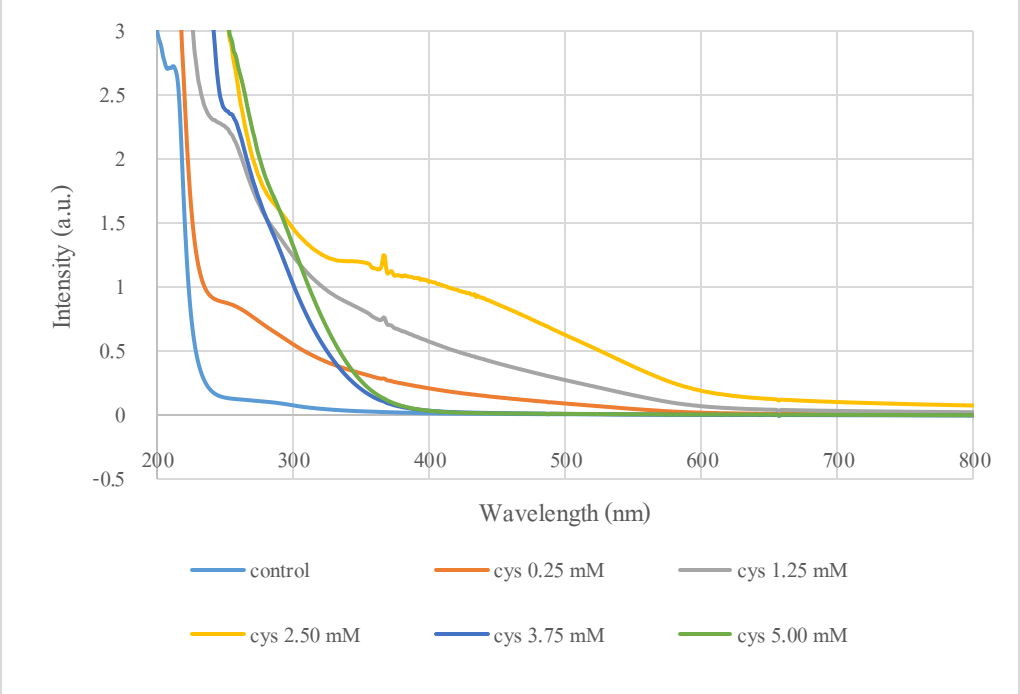
2. การทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นแอล-ซิสเทอีนที่เหมาะสมที่สุด

การทดลองชุดนี้ทำเพื่อศึกษาขนาดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้เมื่อรีดิวซ์ซีลีเนียม (IV) เป็น ซีลีเนียม (0) ด้วยแอล-ซิสเทอีนที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ซึ่งปฏิกิริยาที่ศึกษามีความเข้มข้นของแอล-ซิสเทอีนอยู่ที่ 0.00-5.00 มิลลิโมลาร์

จากการทดลองในชุดนี้ จะสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเหมือนกับการทดลองการหาปริมาณซีลีเนียม พบว่า สารละลายจะเปลี่ยนจากสารละลายใส ไม่มีสี เป็น

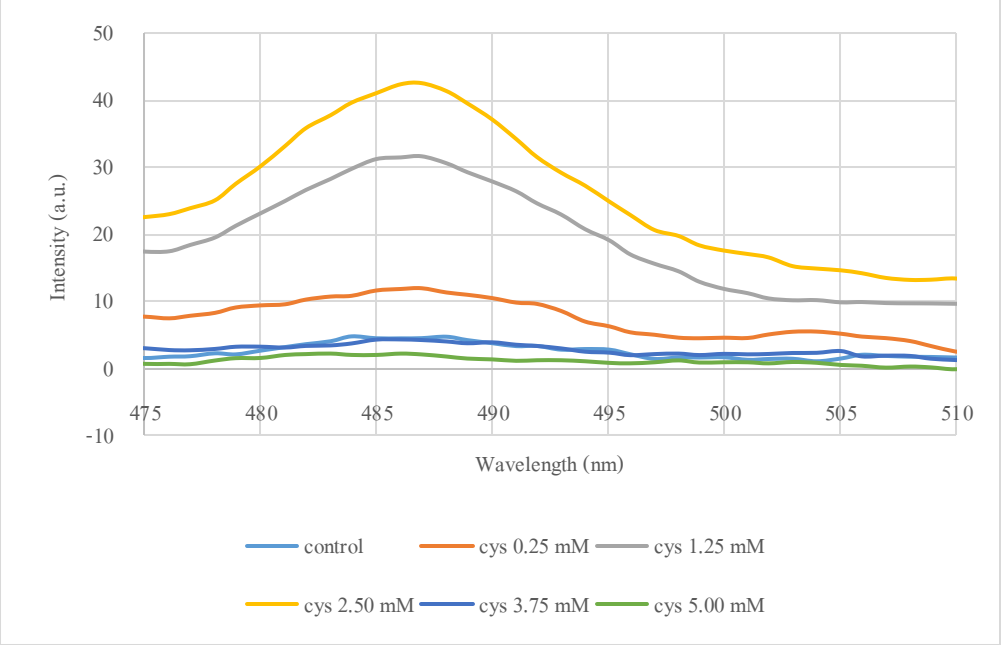
สารละลายสีส้ม โดยมีความเข้มของสีต่างกัน ที่ความเข้มข้นซิสเทอีน 0.25 มิลลิโมลาร์ จะมีสีส้มอ่อนที่สุด และที่ความเข้มข้นซิสเทอีน 2.50 โมลาร์ จะมีสีส้มเข้มที่สุด ในส่วนของความเข้มข้น 3.75 และ 5.00 มิลลิโมลาร์ สารละลายไม่มีการเปลี่ยนสี ดังรูป 4.4

รูปที่ 4.4 สีของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้เมื่อปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแอล-ซิสเทอีนจาก 0.00-5.00 mM ในพูลลูแลน 5% 400 µL และใช้โซเดียมซีลีไนต์ 2 mM C = 0.00 mM, 1 = 0.25 mM, 2 = 1.25 mM, 3 = 2.50 mM, 4 = 3.75 mM และ 5 = 5.00 mM



รูปที่ 4.5 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของซิสเทอีนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี

ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี เพื่อดูการดูดกลืนแสง พบว่า ตำแหน่งของสัญญาณในสเปกตรัมจะต่างกัน เมื่อเติมแอล-ซิสเทอีนลงไป 0.25 มิลลิโมลาร์ ให้ λ_{max} ที่ 260 นาโนเมตร ความเข้มสัญญาณต่ำแสดงว่ามีปริมาณซีลีเนียม(0) อยู่น้อยและมีขนาดประมาณ 100 นาโนเมตร ที่คำนวณเทียบกับงานของ Lin และคณะ เมื่อเพิ่มปริมาณแอล-ซิสเทอีนไปห้าเท่า เป็น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปรากฏ λ_{max} = 250 นาโนเมตร ซึ่งเลื่อนไปทางซ้ายมือ แสดงว่าซีลีเนียม(0) ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอนุภาคเล็กลงเมื่อปริมาณแอล-ซิสเทอีนเพิ่มขึ้น ความเข้มของสัญญาณสูงขึ้นแสดงว่ามีปริมาณของซีลีเนียม (0) มากขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณแอล-ซิสเทอีนไปเป็น 2.50 มิลลิโมลาร์ ผลที่ได้กลับไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่ปรากฏสัญญาณที่กว้างในช่วงตั้งแต่ 320-580 นาโนเมตร แสดงว่าอนุภาคมีขนาดใหญ่มาก ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากอนุภาคนาโนซีลีเนียมเกิดการรวมตัวกันกลายเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ แต่เมื่อเพิ่มแอล-ซิสเทอีนไปเป็น 3.75 และ 5.00 มิลลิโมลาร์ พบว่าสารละลายไม่มีสี แต่พอตั้งทิ้งไว้ 1 วัน พบว่าเกิดตะกอนสีแดงของซีลีเนียม(0) นอนก้นอยู่ข้างล่างหลอด ซึ่งอาจตีความได้ว่า เมื่อความเข้มข้นแอล-ซิสเทอีนมาก อาจรีดิวซ์



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอล-ซิสเทอีนด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี

ซีลีเนียม(IV) ให้กลายเป็นซีลีเนียม(0) ให้มีขนาดเล็กมากๆ จนไม่ปรากฏสีตามทฤษฎีของ Mie แต่เมื่อเวลาผ่านไป อนุภาคที่เล็กๆดังกล่าวรวมตัวกันเป็นอนุภาคใหญ่ และตกตะกอนออกมา แต่สเปกตรัมที่ได้จากการตรวจวัดยังสามารถสังเกตได้ยากเช่นเดียวกับการทดลองการหาปริมาณซีลีเนียมที่เหมาะสม จึงต้องนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี โดยให้พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร ได้ดังรูปที่ 4.6

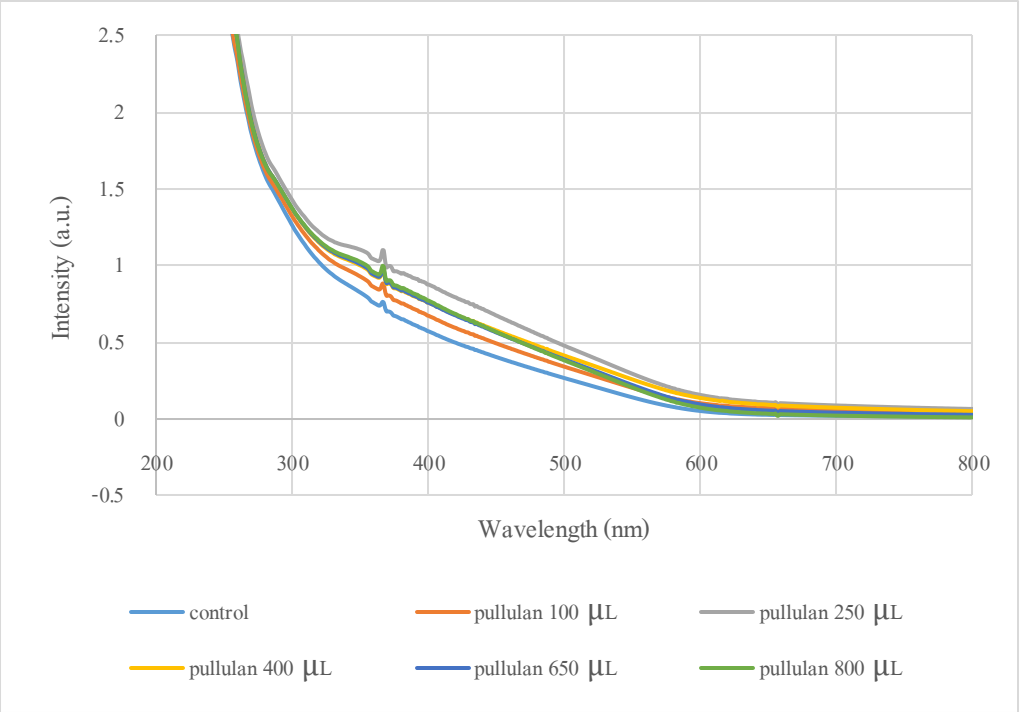
จากการตรวจวัด พบว่า เมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้นซิสเทอีนมากขึ้น จะทำให้มีความเข้มของสัญญาณมากขึ้น ซึ่งยืนยันได้ว่า อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ซิสเทอีนในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 มิลลิโมลาร์ มีความแตกต่างของขนาดอนุภาคจริง เมื่ออ้างอิงจากงานวิจัยของ Siwach และคณะ[11] ที่มีการตรวจวัดขนาดอนุภาคนาโนด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี พบว่าถ้ามีความเข้มสัญญาณมากขึ้น อนุภาคนาโนจะมีขนาดเล็ก และเมื่อดูจากสเปกตรัมของเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี จึงสามารถสรุปได้ว่า อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดที่แตกต่างกัน แต่อาจจะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และเมื่อใช้ซิสเทอีน ที่ความเข้มข้น 3.75 และ 5.00 มิลลิ-โมลาร์ พบว่าไม่เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ อาจเป็นเพราะว่าการเติมตัวรีดิวซ์มาก ทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถรับและคายพลังงานจากฟลูออเรสเซนซ์ได้

และจากผลการทดลองในส่วนของการหาปริมาณซีลีเนียมที่เหมาะสม เมื่อวิเคราะห์จากผลการทดลองในส่วนนี้ พบว่า อัตราส่วนของความเข้มข้นซีลีเนียมต่อความเข้มข้นซิสเทอีนที่ทำให้ได้อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่มากที่สุด คือ 2:2.5

3. การทดลองการหาปริมาณพูลลูแลนที่เหมาะสมที่สุด

ในส่วนนี้จะศึกษาผลของความเข้มข้นพูลลูแลนที่ใช้ในการเพิ่มความเสถียรของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ โดยเปรียบเทียบการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ไม่มีการเติมพูลลูแลน และการเติมพูลลูแลนที่ปริมาตรต่างๆกัน เพื่อศึกษาขนาดและความเสถียรของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ เริ่มต้นจะดูการเปลี่ยนสีของสารละลายเหมือนกับส่วนที่ผ่านมา พบว่า สารตัวอย่างทั้งหมดเปลี่ยนจากสารละลายใส ไม่มีสี เป็นสารละลายสีส้ม มีความเข้มของสีไม่แตกต่างกัน สิ่งที่พบ คือ เมื่อใช้พูลลูแลนความเข้มข้นมากขึ้น จะใช้เวลาในการรีดิวซ์ให้เกิดสารละลายสีส้มของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมมากขึ้นด้วย สีของสารละลายเป็นดังรูปที่ 4.7

รูปที่ 4.7 สีของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้เมื่อปรับเปลี่ยนปริมาตรของพูลลู-แลน 5% จาก 0-800 µL โดยใช้แอล-ซิสเทอีน 2.5 mM และใช้โซเดียมซีลีไนต์ 2 mM C = 0 µL, 1 = 100 µL, 2 = 250 µL, 3 = 400 µL, 4 = 650 µL และ 5 = 800 µL



รูปที่ 4.8 สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงกับความยาวคลื่นของการทดลองการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของพูลลูแลน ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี

เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี พบว่าตำแหน่งของความยาวคลื่นที่เกิดสัญญาณที่ได้จากการทดลองชุดนี้ไม่มีความแตกต่างกัน มีเพียงความเข้มแสงที่แตกต่างกันเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.8

เนื่องจากสเปกตรัมของสารตัวอย่างในการทดลองชุดนี้เหมือนกัน จึงไม่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี เพราะจากการทดลองที่หาปริมาณความเข้มข้นของซีลีเนียมที่ดีที่สุด พบว่า ถ้าสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปีมีลักษณะสัญญาณเหมือนกัน สัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปีก็จะเหมือนกัน จึงสามารถสรุปได้ว่าเมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้นของพูลลูแลนในสารละลายไม่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโน

เมื่อเก็บอนุภาคนาโนของซีลีเนียมไว้ พบว่า อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้จะเกิดการรวมตัว โดยสารตัวอย่างที่ไม่มีการเติมพูลลูแลนจะเกิดการรวมตัวก่อน และเมื่อเติมพูลลูแลนมากขึ้น จะทำให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคช้าลง จึงสามารถสรุปได้ว่า ความเสถียรของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมขึ้นอยู่กับปริมาณของพูลลูแลนที่เติมลงไปก่อนทำการรีดิวซ์ซีลีเนียม (IV) ให้เป็นซีลีเนียม (0)

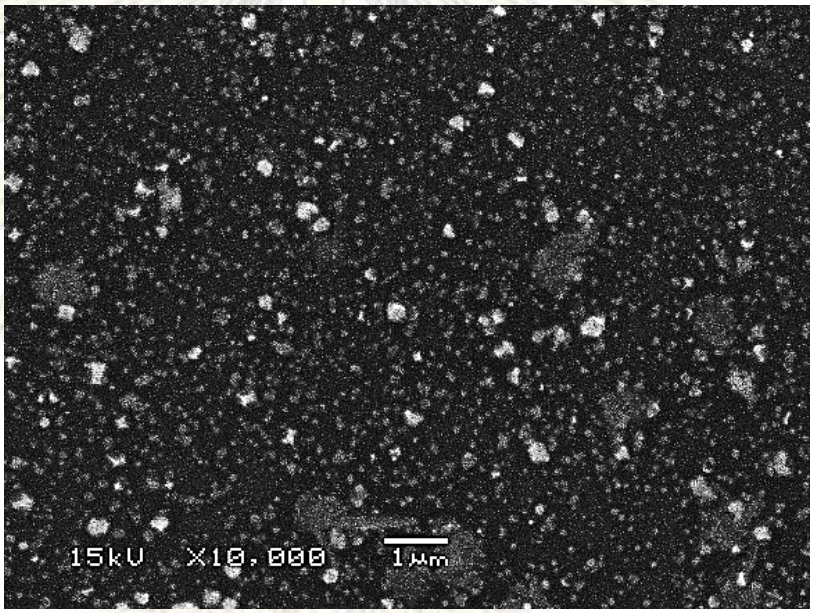
4.2 ผลการทดลองจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

1. การถ่ายภาพอนุภาคนาโนของซีลีเนียมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การทดลองในส่วนนี้ทำเพื่อวัดขนาดที่พื้นผิวของอนุภาคนาโน รวมถึงศึกษาผลของการกระจายตัวของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้ โดยสารตัวอย่างที่จะนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ คือ 1. อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ไม่มีการเติมพูลลูแลน 2. อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 0.25 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน 3. อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 1.25 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน 4. อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 2.50 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน ในการเลือกสารตัวอย่างดังกล่าวไปถ่ายภาพเนื่องจากความแตกต่างจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ภาพที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เป็นดังรูปที่ 4.4

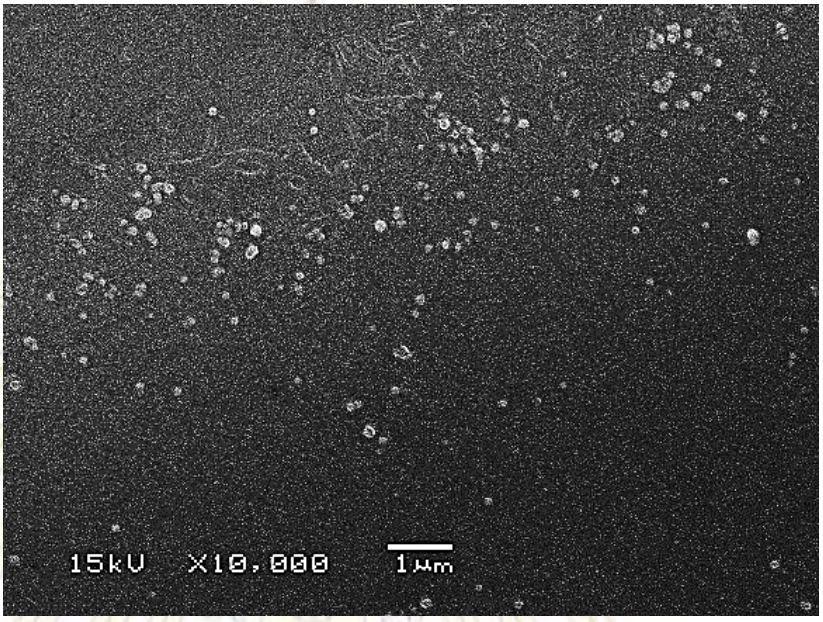
จากรูปที่ 4.9 เมื่อไม่มีการเติมพูลลูแลนก่อนการรีดิวซ์ซีลีเนียม (IV) ให้เป็นซีลีเนียม (0) พบว่าอนุภาคจะอยู่เกาะกันเป็นกลุ่ม แต่ในรูปที่ 4.10, 4.11 และ 4.12 ที่มีการเติมพูลลูแลนก่อนทำการรีดิวซ์ อนุภาคจะมีการกระจายตัว สามารถเห็นเป็นทรงกลมของอนุภาคชัดเจน สามารถวัดขนาดได้เฉลี่ยประมาณ 100 นาโนเมตร แต่ไม่สามารถบอก

ความแตกต่างของขนาดอนุภาคได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้กำลังขยายในการถ่ายภาพมากกว่านี้ได้จึงไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของขนาดอนุภาคเมื่อใช้ความเข้มข้นของซิสเทอีนต่างกัน การวิเคราะห์ในส่วนนี้จึงสรุปได้เฉพาะกรณีความแตกต่างของการกระจายตัวของอนุภาคเมื่อเติมและไม่เติมพูลลูแลนก่อนทำการรีดิวซ์ ว่าการเติมพูลลูแลนจะทำให้อนุภาคนาโนของซีลีเนียมไม่เกาะกลุ่มกัน

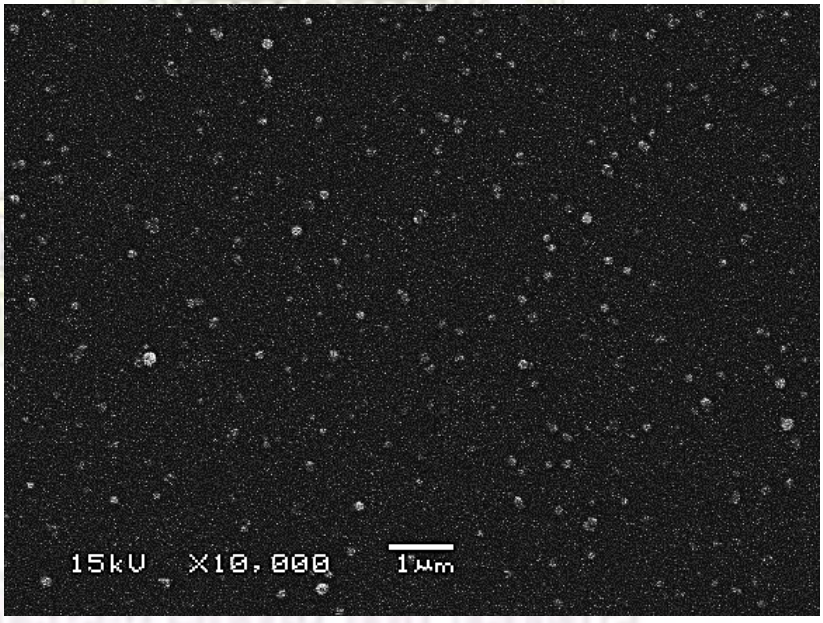


รูปที่ 4.9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ไม่มีการเติมพูลลูแลน

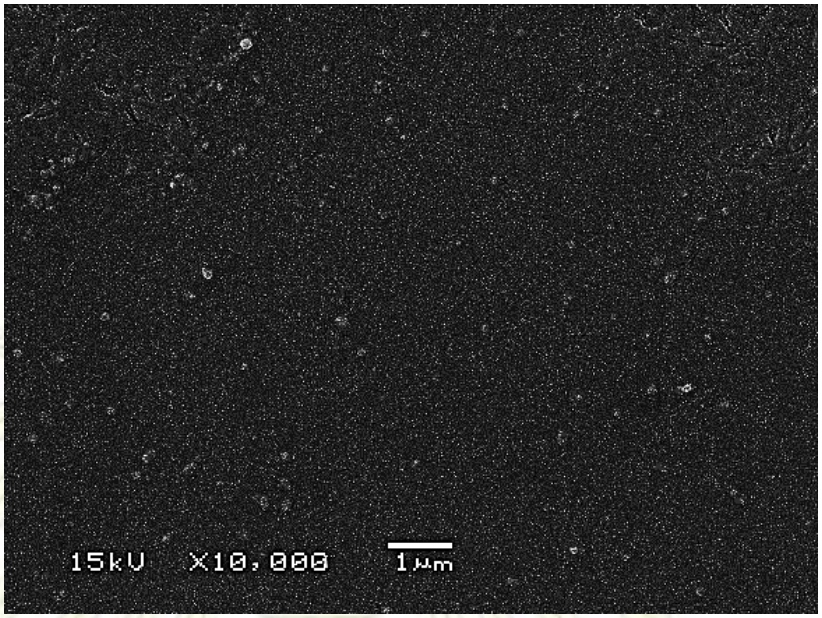
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 0.25 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน



รูปที่ 4.11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 1.25 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน

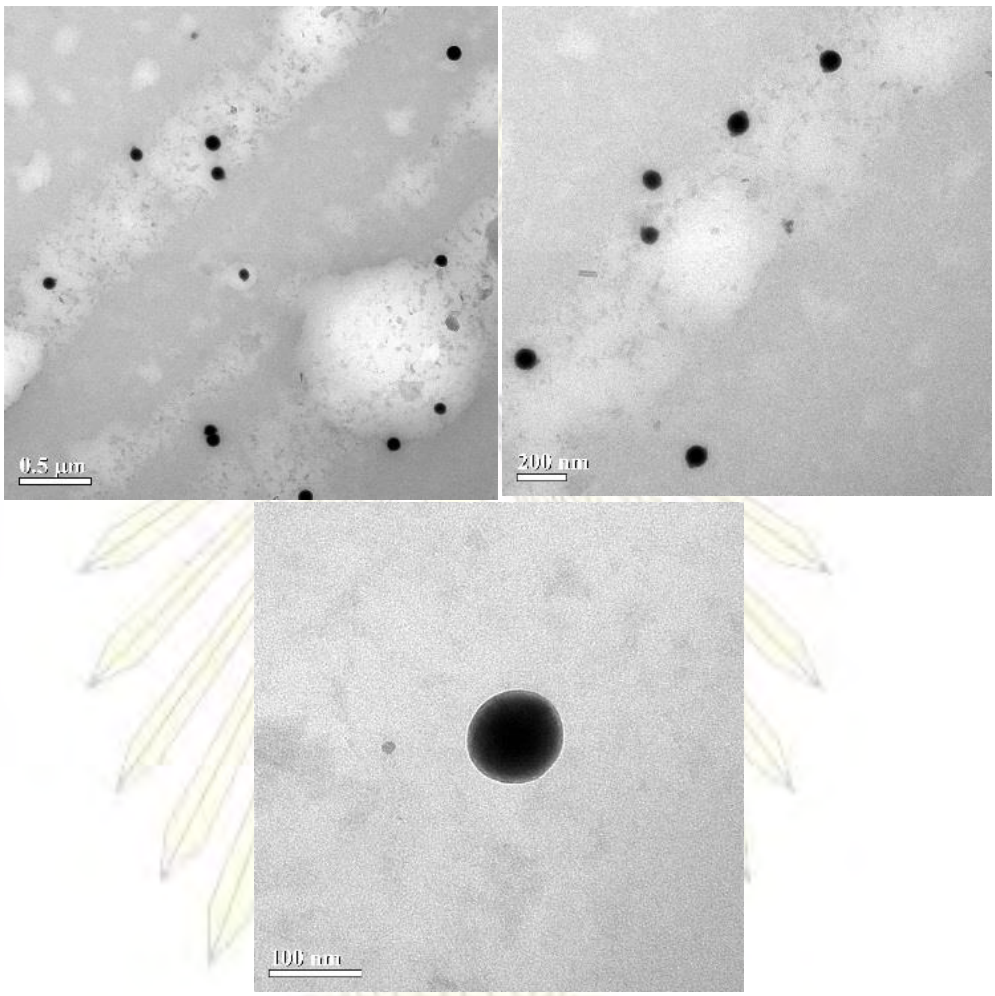


รูปที่ 4.12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 2.50 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน

2. การถ่ายภาพอนุภาคนาโนของซีลีเนียมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ทำเพื่อวัดขนาดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้ สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ คือ อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน 2.50 มิลลิโมลาร์ และมีการเติมพูลลูแลน เนื่องจากเป็นอัตราส่วนที่มีความเข้มข้นมากที่สุดที่ทำการสังเคราะห์ได้ ดังรูปที่ 4.5

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 ภาพถ่ายอนุภาคนาโนของซีลีเนียมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังขยายต่างๆ

จากภาพ สามารถวัดขนาดของอนุภาคได้เท่ากับ 100 นาโนเมตร และทุกอนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกันมาก แสดงให้เห็นว่า การใช้พูลลูแลนเป็นตัวปรับเสถียร และความเข้มข้นของซิสเทอีนที่ใช้ มีผลต่อการกำหนดขนาดของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่มีต่อแบคทีเรีย

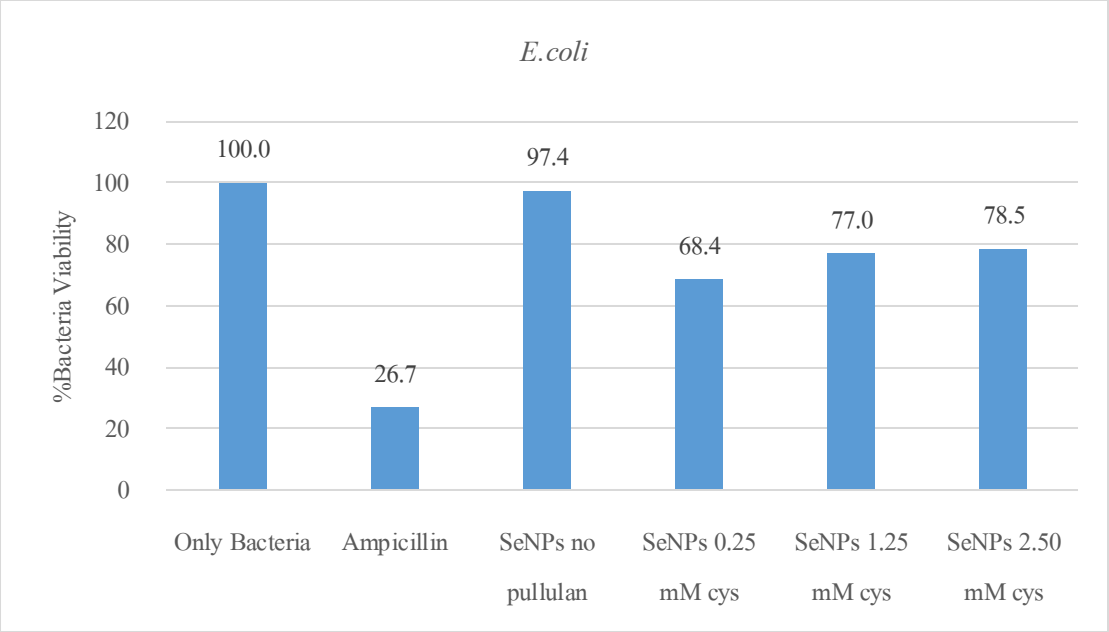
1. ทดสอบกับแบคทีเรีย *E.coli*

การศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่มีต่อแบคทีเรียนั้น จะศึกษาโดยการดูค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียที่ความยาวคลื่นหนึ่ง โดยจะเปรียบเทียบจากแบคทีเรียที่ไม่มีการใส่ยาใดๆ ลงไป แบคทีเรียที่มีการใส่ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มีขายทั่วไป และแบคทีเรียที่มีการใส่อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้โดยมีอัตราส่วนของสารตั้งต้นที่ใช้แตกต่างกัน การวัดค่าความเข้มแสง จะศึกษาที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 600 นาโนเมตร ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมในแบคทีเรีย *E.coli*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		only bac	No Se	Ampicilin	No pullulan	0.25 mM cys	1.25 mM cys	2.50 mM cys			only bac	
B		0.447	0.338	0.154	0.390	0.348	0.402	0.353			0.471	
C		0.479	0.284	0.113	0.465	0.335	0.367	0.44			0.497	
D		0.482	0.258	0.109	0.512	0.279	0.313	0.312			0.474	
E												
F		0.469	0.293	0.125	0.457	0.321	0.361	0.368			0.481	เฉลี่ย
G												
H												

จากตาราง พบว่า ค่าความเข้มแสงของแบคทีเรีย *E.coli* เมื่อไม่มีการเติมสารอื่นๆ ลงไป จะมีค่าเฉลี่ยที่ 0.469 a.u. และเมื่อเติมสารอื่นๆลงไป พบว่า แบคทีเรียมีค่าความเข้มแสงลดลง จึงนำค่าความเข้มแสงเฉลี่ยของแบคทีเรียไปคำนวณเป็นสัดส่วนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด ด้วยสมการ $\%bacteria\ viability = \frac{OD_{600}\ treated\ bacteria}{OD_{600}\ untreated\ bacteria} \times 100$ ได้ค่าดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 อัตราการรอดของแบคทีเรีย *E.coli*

จากรูปที่ 4.14 พบว่าความเข้มข้นของแบคทีเรียเมื่อใส่ยา anhydrous ampiphilin มีค่าลดลงจากแบคทีเรียที่ไม่ได้เติมสารใดเพิ่ม จึงใช้ค่าดังกล่าวเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรีย เมื่อดูจากผลการทดลองใส่สารตัวอย่างชนิดต่างๆลงในแบคทีเรีย พบว่าความเข้มข้นของแบคทีเรียที่มีการเติมอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่มีการเติมพูลลูแลนด้วย และสารละลายพูลลูแลนที่ไม่มีอนุภาคนาโนของซีลีเนียม มีค่าลดลงแต่ไม่ลดลงเท่าการใช้ยา anhydrous ampiphilin ที่เป็นยามาตรฐาน และเมื่อดูจากค่าความเข้มข้นแบคทีเรียเมื่อเติมอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ไม่มีพูลลูแลนอยู่ พบว่า ความเข้มข้นอยู่ในระดับใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ไม่มีการเติมสารใดๆลงไป การทดลองในส่วนนี้จึงสรุปได้ว่า อนุภาคนาโนของซีลีเนียมไม่มีผลในการต้านแบคทีเรีย *E.coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในส่วนของพูลลูแลน จะมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียชนิดนี้เล็กน้อย แต่ยังไม่พอสำหรับการนำมาใช้แทนยามาตรฐาน

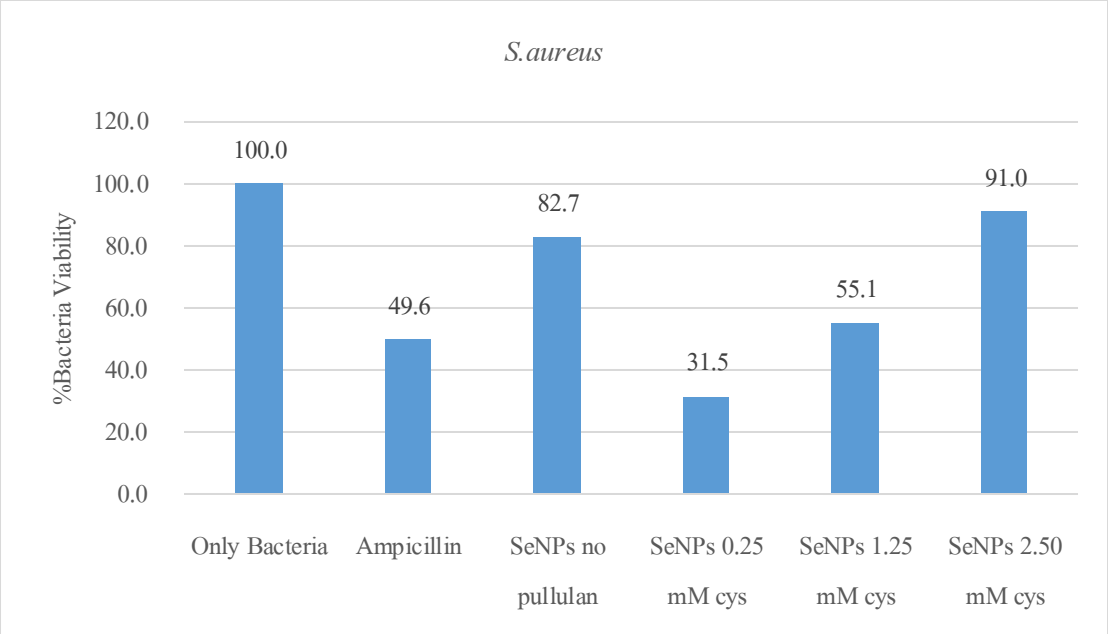
2. การทดสอบกับแบคทีเรีย *S.aureus*

ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *S.aureus* จะมีวิธีการศึกษาเหมือนกับในแบคทีเรีย *E.coli* แต่จะวัดค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร มีค่าความเข้มแสงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนของซีลีเนียมในแบคทีเรีย *S.aureus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		only bac	No Se	Ampicilin	No pullulan	0.25 mM cys	1.25 mM cys	2.50 mM cys			only bac	
B		0.345	0.389	0.157	0.277	0.106	0.225	0.371			0.364	
C		0.378	0.372	0.172	0.329	~~0.433~~	0.185	0.305			0.388	
D		0.371	0.334	0.215	0.300	0.123	0.194	0.320			0.394	
E												
F		0.365	0.365	0.181	0.302	0.115	0.201	0.332			0.382	เฉลี่ย
G												
H												

จากตาราง พบว่า แบคทีเรียที่มีการเติมอนุภาคนาโนของซีลีเนียมจะมีค่าความเข้มแสงที่น้อยกว่าแบคทีเรียที่ไม่มีการเติมสารอื่น จึงนำค่าความเข้มแสงมาใช้คำนวณหาอัตราการรอดของแบคทีเรีย โดยใช้สมการเดียวกับ *E.coli* แต่เปลี่ยนค่าความยาวคลื่นที่ใช้วัดเป็น 562 นาโนเมตร ได้ค่าดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 อัตราการรอดของแบคทีเรีย *S.aureus*

จากรูปที่ 4.15 พบว่า อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์โดยใช้ซิสเทอีนที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์และมีการเติมพูลลูแลน จะมีแนวโน้มของการออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *S.aureus* ที่ดีกว่ายามาตรฐาน anhydrous ampiphilin และประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของตัวรีดิวซ์มากขึ้น

ในการวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลในเชิงสเปกโตรสโกปี พบว่าอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่รีดิวซ์ด้วยซิสเทอีนที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า จะทำให้ได้อนุภาคนาโนที่มีขนาดใหญ่กว่า แสดงว่าอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่มีขนาดใหญ่กว่าสามารถต้านแบคทีเรีย *S.aureus* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่มีขนาดเล็กกว่า

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียมโดยมีพูลลูแลนเป็นสารปรับเสถียร พบว่า ความเข้มข้นของซีลีเนียมที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่เหมาะสมที่สุดเมื่อมีการเติมพูลลูแลนก่อนทำการรีดิวซ์ด้วยซิสเทอีน คือ 2 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของซิสเทอีนที่นำมาใช้รีดิวซ์ซีลีเนียม (IV) เป็นซีลีเนียม (0) ได้ อยู่ในช่วง 0.25-2.50 มิลลิโมลาร์ จากข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโตรสโกปี และฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ คือความเข้มข้นของซิสเทอีนที่ใช้ในการรีดิวซ์ ซึ่งข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีสามารถบอกได้อีกว่า อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 100 นาโนเมตร ในด้านความเสถียร พบว่าการเติมพูลลูแลนที่มีความเข้มข้นมากจะทำให้อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้มีการรวมตัวกันช้าลง การวัดขนาดของอนุภาคนาโนทำได้โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และแบบส่องผ่าน อนุภาคนาโนที่ได้มีขนาด 100 นาโนเมตร ซึ่งตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าอนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้ สามารถต้านแบคทีเรีย *S.aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรีย *E.coli* โดยอนุภาคนาโนที่มีขนาดใหญ่กว่า สามารถออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้ดีกว่าอนุภาคขนาดเล็ก รวมถึงการใช้ยามาตรฐาน anhydrous ampiphilin ด้วย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Zhang, S.Y.; Zhang, J.; Wang, H.Y.; Chen, H.Y., Synthesis of Selenium Nanoparticles in the Presence of Polysaccharides. *Materials Letters*, **2004**, *58*, 2590-2594.
2. Lin, Z.H.; Wang, C.R.C., Evidence on the Size-dependent Absorbtion Spectral Evolution of Selenium Nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, **2005**, *92*, 591-594.
3. Shin, Y.; Blackwood, J.M.; Bae, I.T.; Arey, B.W.; Exarhos, G.J., Synthesis and stabilization of selenium nanoparticles on cellulose nanocrystal. *Materials Letters*, **2007**, *61*, 4297-4300.
4. Li, Q.; Chen. T.; Yang, F.; Liu, J.; Zheng, W., Facile and Controllable One-step Fabrication of Selenium Nanoparticles Assisted by L-cysteine. *Materials Letters*, **2010**, *64*, 614-617.
5. Tran, P.A.; Webster, T.J., Selenium nanoparticles Inhibit *Staphylococcus aureus* Growth. *International Journal of Nanomedicine*, **2011**, *6*, 1553-1558.
6. Dobias, J.; Syvorova, E.I.; Bernier-Latmani, R., Role of Proteins in Controlling Selenium Nanoparticles Size, *Nanotechnology*, **2011**, *22*, 1-9.
7. Banary, S.; Sarker, N.; Dowdell, A.; Banerjee, I., The Spontaneous Formation of Selenium Nanoparticles on Gallic Acid Assemblies and their Antioxidant Properties, *The Fordham Undergraduate Research Journal*, **2011**, *1*, 41-46.
8. Yu, B.; Zhang, Y.; Zheng, W.; Fan, C.; Chen, T., Positive Surface Charge Enhances Selective Cellular Uptake and Anticancer Efficacy of Selenium Nanoparticles, *Inorganic Chemistry*, **2012**, *51*, 8956-8963.
9. Prasad, K.S.; Patel, H.; Patel, T.; Patel, K.; Selvaraj, K., Biosynthesis of Se nanoparticles and Its Effect on UV-Induced DNA Damage, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2013**, *103*, 261-266.
10. Wang, Y.; Yan, X.; Fu, L., Effect of Selenium Nanoparticles with Different Sizes in Primary Cultured Intestinal Epithelial Cells Crucian Carp, Carassius auratus gibelio, *International Journal of Nanomedicine*, **2013**, *8*, 4007-4013.

11. Siwach, O.P.; Sen, P., Fluorescence Properties of Ag Nanoparticles in Water, Methanol and Hexane, *Journal of Luminescence*, **2009**, *1*, 6-11.
12. http://www.greenclinic.in.th/selenium.html สืบค้นเมื่อวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2557
13. http://beid.ddc.moph.go.th/en_2011/content.php?items=78 สืบค้นเมื่อวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2557
14. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3a/Pullulan.png สืบค้นเมื่อวันที่ 10 มีนาคม 2557
15. http://www.oknation.net/blog/print.php?id=65191 สืบค้นเมื่อวันที่ 10 มีนาคม 2557
16. http://th.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli สืบค้นเมื่อวันที่ 10 มีนาคม 2557

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นายสักย์วริษฐ์ นิตราธร เกิดเมื่อวันที่ 25 กรกฎาคม พ.ศ. 2534 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนสวนกุหลาบวิทยาลัย รังสิต จังหวัดปทุมธานี เมื่อปีการศึกษา 2552 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี 62/30 หมู่ที่ 6 ตำบลลำลูกกา อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12150

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย