



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เสถียรด้วยไคโตซานและไลโครีน เพื่อนำส่งยา

Synthesis of Selenium Nanoparticles Stabilized by Chitosan and Lycorine for Drug Delivery

ชื่อนิสิต นางสาวปัทมาธิ์ ปิ่นประสงค์

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เสถียรด้วยไคโตซานและไลโครีนเพื่อนำส่งยา
Synthesis of Selenium Nanoparticles Stabilized by Chitosan and Lycorine
for Drug Delivery



โดย
นางสาวปัทมาธิ์ ปิ่นประสงค์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่เสถียรด้วยโคโตซานและไลโครีนเพื่อนำส่งยา

โดย นางสาวปิ่นทारीย์ ปิ่นประสงค์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....
รชัชชัย ตันทุลานี

ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. รชัชชัย ตันทุลานี)

.....
พอรุณ นวมินทร์

อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน)

.....
[Signature]

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์)

.....
รณพร จันทร์ศิริ

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นवलพรรณ จันทร์ศิริ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ

ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เสถียรด้วยไคโตซานและไลโครีนเพื่อนำส่งยา

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวปัทมาธิริย์ ปิ่นประสงค์ 5533112023

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมือนสิน

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

อนุภาคนาโนซีลีเนียมได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากมีความสามารถต้านมะเร็ง อย่างไรก็ตามอนุภาคนาโนเมตรไม่เสถียร ดังนั้นงานวิจัยจึงเตรียมอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยใช้ไคโตซานที่ดัดแปลงเป็นสารปรับเสถียร เพื่อช่วยเพิ่มเสถียรภาพของอนุภาค ไคโตซานดัดแปลงกับไลโครีนผ่านปฏิกิริยา tosylation ได้เป็น tosyl-lycorine-chitosan (Ts-Ly-chitosan) กำจัดหมู่ tosyl ของ Ts-Ly-chitosan โดย 5-amino-2-mercaptobenzimidazole (AMB) เข้าไปแทนที่ได้เป็น AMB-Ly-chitosan พิสูจน์เอกลักษณ์ไคโตซานที่ดัดแปลงทั้ง 2 แบบด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ ($^1\text{H-NMR}$), ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR) และเทอร์โมกราวิเมตริกอะนาไลซิส (TGA) ต่อมาไคโตซานที่ดัดแปลงทั้ง 2 แบบจะใช้เป็นสารปรับเสถียรสำหรับอนุภาคนาโนซีลีเนียม ซึ่งอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลมพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นอกจากนี้ทำการวัดขนาดและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าด้วยเทคนิค dynamic light scattering (DLS) ซึ่งมีค่าประมาณ 80 nm และ +40 mV ตามลำดับ ประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วยวิธี MTT assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.907 μM ดีกว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย AMB-Ly-chitosan

คำสำคัญ: อนุภาคนาโนซีลีเนียม, ไคโตซาน, ไลโครีน, ต้านมะเร็ง

Title Synthesis of Selenium Nanoparticles Stabilized by Chitosan and Lycorine for Drug Delivery

Student name Miss Pantaree Pinprasong 5533112023

Advisor Associate Professor Dr. Nongnuj Muangsin

Co-advisor Assistant Professor Dr. Narong Praphairaksit

Department of chemistry, Faculty of science, Chulalongkorn University, Academic year 2015

Abstract

Selenium nanoparticles attracted more attention due to anticancer activities; however, the nanoparticles are naturally unstable. Therefore, in this work, selenium nanoparticles were prepared using modified chitosan as stabilizer to enhance their stability. Chitosan was modified with lycorine via the tosylation reaction to obtain tosyl-lycorine-chitosan (Ts-Ly-chitosan). Tosyl groups of Ts-Ly-chitosan were removed by substitution with 5-amino-2-mercaptobenzimidazole (AMB) to obtain AMB-Ly-chitosan. Both modified chitosans were characterized by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, FT-IR spectroscopy and thermogravimetric analysis. Furthermore, both modified chitosans were used as stabilizer of selenium nanoparticles which were characterized by scanning electron microscope (SEM) and showed spherical shape. In addition, the size and zeta potential of selenium nanoparticles stabilized by Ts-Ly-chitosan were determined by dynamic light scattering (DLS) to be about 80 nm and +40 mV, respectively. The cytotoxicity of selenium nanoparticles were evaluated against cancer cells by MTT assay. The results showed that the cytotoxic against KB, oral cancer cells of selenium nanoparticles stabilized by Ts-Ly-chitosan ($\text{IC}_{50} = 3.907 \mu\text{M}$) were higher than selenium nanoparticles stabilized by AMB-Ly-chitosan.

Keywords: Selenium nanoparticles, Chitosan, Lycorine, Anti-cancer

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือทั้งด้านความรู้ทางทฤษฎีและด้านปฏิบัติการทางเคมี ตลอดจนให้แนวคิดและถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆในช่วงระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ตันทุลานี และ รองศาสตราจารย์ ดร. นवलพรรณ จันทศิริ ที่กรุณาสละเวลาให้เกียรติเป็นกรรมการในโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลภา เอื้องไมตรีภรณ์ อาจารย์ผู้ประสานงานในรายวิชา Senior Project รหัสรายวิชา 2302499 ที่คอยช่วยประสานงาน แนะนำและให้คำปรึกษาต่างๆ

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของฝ่ายวิชาการจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยและภาควิชาเคมีที่ได้สนับสนุนและให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัย

ขอขอบคุณ.ส.อุฬาริกา ลือสกุล นายศักดิ์ชัย หลักสี รวมถึงพี่ๆนิสิตปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ให้ความรู้ คอยแนะนำ แบ่งปันประสบการณ์และความช่วยเหลือในหลายๆอย่างตลอดระยะเวลาที่ทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว พี่ๆ น้องๆในภาควิชาเคมีทุกคนที่คอยให้กำลังใจและคอยรับฟัง ผู้วิจัยขอระลึกในความกรุณาและความห่วงใยของทุกท่านทั้งที่ได้กล่าวมาข้างต้นและบุคคลที่ไม่ได้เอ่ย นามมาไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตารางประกอบ.....	ณ
สารบัญรูปประกอบ.....	ญ
สารบัญตัวย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.3 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง	5
1.3.1 มะเร็ง.....	5
1.3.2 ซีสต์เนื้องอก	6
1.3.3 ไคโตซาน	6
1.3.4 ไลโครีน	7
1.3.5 การวัดปริมาณของหมู่ไทออล	8
1.3.6 MTT assay.....	8
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	9
1.5 วัตถุประสงค์.....	9
1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	9
บทที่ 2 การทดลอง	10
2.1 สารเคมี.....	10
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	11
2.3 วิธีการทดลอง	11
2.3.1 การเตรียมไคโตซาน.....	11

2.3.2	สังเคราะห์ Lycorine-chitosan.....	12
2.3.3	สังเคราะห์ [5-Amino-2-mercaptobenzimidazole]-Lycorine-chitosan (AMB-Ly-chitosan).....	13
2.3.4	การหาปริมาณหมู่ไทออล.....	14
2.3.5	สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์.....	16
2.4	วิธีการทดสอบสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้.....	17
2.4.1	การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (¹ H-NMR).....	17
2.4.2	การพิสูจน์ทราบหมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR).....	17
2.4.3	การตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของสารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA).....	17
2.4.4	การตรวจสอบขนาดและประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยใช้เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) และ Electrophoretic Light Scattering.....	18
2.4.5	การศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)	18
2.4.6	ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติโดยวิธี MTT assay.....	18
บทที่ 3	ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....	20
3.1	การเตรียมโคโตซาน.....	20
3.2	การสังเคราะห์ Lycorine-chitosan.....	20
3.2.1	การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค ¹ H-NMR.....	22
3.2.2	การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค FT-IR.....	25
3.2.3	การตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของสารโดยใช้เทคนิค TGA.....	28
3.3	การสังเคราะห์ [5-Amino-2-mercaptobenzimidazole]-Lycorine-chitosan (AMB-Lycorine-chitosan)	30
3.3.1	การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค ¹ H-NMR.....	31

3.3.2 การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค FT-IR.....	32
3.3.3 การตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของสารโดยใช้เทคนิค TGA.....	33
3.3.4 การหาปริมาณหมู่ไทออล.....	33
3.4 สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์.....	37
3.4.1 การตรวจสอบขนาดและประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนซิลิเนียมโดยใช้เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) และ Electrophoretic Light Scattering.....	37
3.4.2 การศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซิลิเนียมโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)	40
3.5 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	42
3.5.1 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ.....	42
3.5.2 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและแสดงผลด้วยค่า IC ₅₀	45
3.5.3 ภาพแสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและการเข้าสู่เซลล์.....	46
3.6 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ	54
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....	55
เอกสารอ้างอิง.....	58
ภาคผนวก.....	61
ภาคผนวก ก ¹ H NMR สเปกตรัม.....	62
ภาคผนวก ข ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายซีเอสดีที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	67
ประวัติผู้ทำวิจัย.....	69

สารบัญตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารละลายซีสเดอินที่ความเข้มข้นต่างๆ (μM).....	15
ตารางที่ 2.2 ปริมาตรของสารต่างๆที่ใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม ที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan และ AMB-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่างกัน.....	16
ตารางที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-} และความเข้มข้นหมู่ไทออล ($\mu\text{M}/\text{mg}$) ของ blank, chitosan และ AMB-Ly-chitosan.....	34
ตารางที่ 3.2 ค่า IC_{50} ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan และ Doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (A549).....	45

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ต่อกับ 5-Fluorouracil (5FU).....	3
รูปที่ 1.2 อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซานและที่พื้นผิวมีประจุบวก และกราฟแสดงความจำเพาะในการเข้าสู่เซลล์มะเร็ง	3
รูปที่ 1.3 โครงสร้างไลโครีน (lycorine)	4
รูปที่ 1.4 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซาน และคาร์บอกซีเมทิลไคโตซาน	4
รูปที่ 1.5 การแบ่งตัวของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง	5
รูปที่ 1.6 การเกิดไคโตซานโดยผ่านขบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) ของไคติน	7
รูปที่ 1.7 ต้นและดอกพลับพลึง.....	7
รูปที่ 1.8 แผนภาพแสดงการเกิด TNB ²⁻	8
รูปที่ 1.9 แผนภาพแสดงการเกิด Formazan.....	8
รูปที่ 1.10 แผนภาพแสดงอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซานที่ดัดแปลงกับไลโครีน	9
รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการละลายของไคโตซานในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2% v/v.....	20
รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงแผนการสังเคราะห์ Tosyl lycorine.....	20
รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงแผนการสังเคราะห์ Lycorine-chitosan หลังจาก lycorine ทำปฏิกิริยา tosylation	21
รูปที่ 3.4 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ Tosyl-Lycorine-chitosan (Ts-Ly-chitosan)	23
รูปที่ 3.5 ¹ H NMR สเปกตรัมของ a) lycorine, b) chitosan, c) Ts-Ly-chitosan, d) AMB-ly-chitosan	24
รูปที่ 3.6 โครงสร้าง lycorine.....	25
รูปที่ 3.7 โครงสร้าง tosyl chloride	25
รูปที่ 3.8 โครงสร้างไคโตซาน	26
รูปที่ 3.9 โครงสร้าง Tosyl-Lycorine-chitosan (Ts-Ly-chitosan).....	26

รูปที่ 3.10 FT-IR สเปกตรัมของ a) lycorine b) Tosyl chloride c) AMB d) chitosan e) Ts-Ly-chitosan f) AMB-Ly-chitosan	27
รูปที่ 3.11 Thermogravimetric curve (TGA curve) และ Differential Thermal Analysis (DTA) ของ a) chitosan, b) Ts-Ly-chitosan และ c) AMB-Ly-chitosan	29
รูปที่ 3.12 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ AMB-Ly-chitosan	30
รูปที่ 3.13 สาร AMB-Ly-chitosan.....	31
รูปที่ 3.14 โครงสร้าง 5-Amino-2-mercaptobenzimidazole (AMB)	32
รูปที่ 3.15 โครงสร้าง AMB-Ly-chitosan	32
รูปที่ 3.16 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายซีสเตรอินที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าการดูดกลืนแสง.....	34
รูปที่ 3.17 แผนภาพแสดงกลไก Acid catalysed hydrolysis of esters.....	35
รูปที่ 3.18 แผนภาพแสดงการเกิดการแข่งขันกันแทนที่หมู่ tosyl ด้วยหมู่เอมิโนของสาร AMB และหมู่เอซิทेटจากกรดเอซิติคแอซิด	36
รูปที่ 3.19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคนาโนซีลีเนียม ที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-ly-chitosan 0.5 mg/mL (nm) กับจำนวนอนุภาค (percent).....	38
รูปที่ 3.20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง apparent zeta potential (mV) กับ total counts ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-ly-chitosan 0.5 mg/mL.....	38
รูปที่ 3.21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคนาโนซีลีเนียม ที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-ly-chitosan 0.7 mg/mL (nm)กับจำนวนอนุภาค (percent)	39
รูปที่ 3.22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง apparent zeta potential (mV) กับ total counts ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-ly-chitosan 0.5 mg/mL	39
รูปที่ 3.23 ภาพ SEM ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.1 mg/mL)...	40
รูปที่ 3.24 ภาพ SEM ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.3 mg/mL)...	40
รูปที่ 3.25 ภาพ SEM ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.5 mg/mL)...	41
รูปที่ 3.26 ภาพ SEM ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.7 mg/mL)...	41

รูปที่ 3.27 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย
Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง
5 ชนิด (KB, A549, HepG2, CHAGO, KATO-II).....43

รูปที่ 3.28 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย
AMB-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง
4 ชนิด (KB, A549, HepG2, CHAGO)44

รูปที่ 3.29 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ที่ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม (blank).....46

รูปที่ 3.30 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 200 μM 47

รูปที่ 3.31 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 100 μM 47

รูปที่ 3.32 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 10 μM 48

รูปที่ 3.33 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 1 μM48

รูปที่ 3.34 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.1 μM 49

รูปที่ 3.35 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.01 μM 49

รูปที่ 3.36 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม (blank).....50

รูปที่ 3.37 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 200 μM 50

รูปที่ 3.38 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 100 μM 51

รูปที่ 3.39 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 10 μM 51

รูปที่ 3.40 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 1 μM52

รูปที่ 3.41 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.1 μM 52

รูปที่ 3.42 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.01 μM 53

รูปที่ 3.43 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติกับ
doxorubicin และอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan
ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 mg/mL.....53

รูปที่ 4.1 แผนภาพสรุปการสังเคราะห์ Lycorine-chitosan.....55

รูปที่ 4.2 แผนภาพสรุปการสังเคราะห์สารทั้งหมดของงานวิจัย56

สารบัญตัวย่อ

R	=	chitosan
Ly-chitosan	=	Lycorine-chitosan
Ts-Ly-chitosan	=	Tosyl-lycorine-chitosan
AMB	=	5-Amino-2-mercaptobenzimidazole
AMB-Ly-chitosan	=	[5-Amino-2-mercaptobenzimidazole]-lycorine-chitosan
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
NaOH	=	Sodium hydroxide
TsCl	=	<i>p</i> -Toluenesulfonyl chloride
DTNB	=	5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
¹ H-NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
FT-IR	=	Fourier transform infrared spectroscopy
TGA	=	Thermogravimetric analysis
SEM	=	Scanning Electron Microscope
DLS	=	Dynamic Light Scattering
mL	=	milliliters
μL	=	microliters
μM	=	micromolar
mmol	=	millimole
g	=	gram
°C	=	degree Celsius
min	=	minute
% m/v	=	percentage mass by volume
% v/v	=	percentage volume by volume

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆของทุกประเทศ และอัตราผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งมีจำนวนเพิ่มขึ้นทุกปี (1,2) ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งมีหลายวิธีการดังนี้ การผ่าตัด (surgery) การฉายรังสี (radiation therapy) และเคมีบำบัด (chemotherapy) แต่การฉายรังสีและใช้เคมีบำบัดมีข้อเสียเนื่องจากยาต้านมะเร็งไม่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง (2,3) ดังนั้นเซลล์ปกติจึงถูกทำลายเช่นเดียวกันส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดอาการข้างเคียง จากเหตุนี้การพัฒนากระบวนการนำส่งยาเพื่อให้มีความจำเพาะสูงต่อเซลล์มะเร็งและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาให้ดียิ่งขึ้นจึงเป็นสิ่งสำคัญ

การประยุกต์ใช้อนุภาคระดับนาโน (nanoparticles) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในระบบนำส่งยารักษาโรคมะเร็ง อนุภาคระดับนาโนสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามองค์ประกอบทางเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ คือ อนุภาคนาโนที่เตรียมจากวัสดุอินทรีย์ (organic materials) และอนุภาคนาโนที่เตรียมจากวัสดุอนินทรีย์ (inorganic materials) เช่น อนุภาคระดับนาโนของทองคำ เงิน คาร์บอน ซิลิเนียม ไอรอนออกไซด์ และแคลเซียมฟอสเฟต เป็นต้น (4) ซึ่งข้อดีของการใช้วัสดุอนินทรีย์ คือ เสถียรมากกว่า การเตรียมจากวัสดุอินทรีย์ นอกจากนั้นบางอนุภาคมีสมบัติเชิงแสงและแม่เหล็กทำให้ตรวจสอบและแสดงผลการนำส่งยาเข้าเซลล์ได้ชัดเจน (5) ส่วนใหญ่อนุภาคระดับนาโนที่เตรียมจากวัสดุอนินทรีย์จะนิยมทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของร่างกาย และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เพื่อเพิ่มความเสถียรของอนุภาคระดับนาโนทำให้ควบคุมขนาดของอนุภาคได้ และมีขนาดเหมาะสมสำหรับแต่ละวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ประยุกต์ พอลิเมอร์ที่ทำให้เสถียรนี้จะช่วยป้องกันการย่อยสลายโดยเอนไซม์ในร่างกายทำให้สามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นาน (2,6) อีกทั้งช่วยเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเนื่องจากเซลล์มะเร็งจะมีช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ที่กว้างประมาณ 30-200 นาโนเมตร (6) ดังนั้นอนุภาคนาโนที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์จะแทรกผ่านช่องนี้เพื่อไปสะสมในเซลล์มะเร็งได้ กระบวนการนี้เรียกว่า Enhanced Permeability and Retention (EPR) (2,7) หลังจากนั้นจะปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางการรักษาเข้าสู่นิวเคลียส แต่ในเซลล์ปกติมีขนาดช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือดที่แคบมากจึงทำให้

อนุภาคระดับนาโนที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ไม่สามารถผ่านไปยังเซลล์ปกติได้ (8) ดังนั้นอนุภาคระดับนาโนจึงช่วยลดผลข้างเคียงที่จะเกิดกับเซลล์ปกติได้

เมื่อไม่นานมานี้ซีลีเนียมเริ่มเป็นที่สนใจมากขึ้น เพราะซีลีเนียมเป็นธาตุที่ต้องการในปริมาณที่น้อย (ไม่ควรเกิน 400 ไมโครกรัมต่อวัน) แต่มีความสำคัญต่อร่างกายอย่างมาก มีหน้าที่ปกป้องเซลล์จากการถูกทำลาย ควบคุมการทำงานของต่อมไทรอยด์ และช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างปกติ นอกจากนี้พบว่ามีฤทธิ์ในการรักษาและป้องกันโรคมะเร็งเนื่องจากต่อต้านสารอนุมูลอิสระ (9,10) ที่สำคัญคือซีลีเนียมที่มีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรจะเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูงขึ้นและลดความเป็นพิษของซีลีเนียมได้ (10,11)

ไคโตซานเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่นิยมในการประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมเพื่อนำส่งยา และควบคุมการปลดปล่อยของยา เนื่องจากเป็นสารที่เข้ากันได้กับร่างกาย (Biocompatibility) มีคุณสมบัติเกาะติดเยื่อเมือกทำให้ติดกับเซลล์ได้ดี สามารถย่อยสลายได้ด้วยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (Biodegradation) ดังนั้นจึงไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (12)

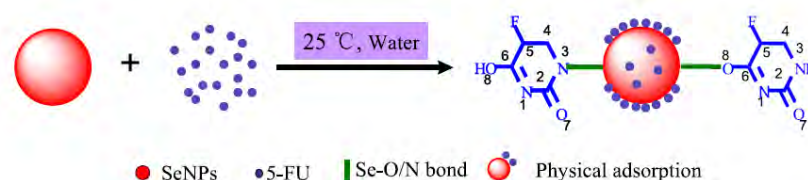
ไลโครีน (lycorine) เป็นสารสกัดจากใบและหัวใต้ดินของพลับพลึง มีสมบัติในการต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ และมะเร็งรังไข่ เป็นต้น แสดงด้วยค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาที่ 50% (Inhibitory Concentration 50; IC₅₀) ได้ประมาณ 6.5 3.0 และ 3.0 ไมโครโมลาร์ของเซลล์ไลน์ (cell line) มะเร็งปอด (A549) มะเร็งลำไส้ (HCT116) และมะเร็งรังไข่ (SK-OV-3) ตามลำดับ (1)

จากมูลเหตุข้างต้นทำให้ผู้วิจัยเกิดแรงจูงใจที่จะค้นคว้า ศึกษา เพื่อสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนเมตรของซีลีเนียมและทำให้เสถียรด้วยไคโตซานที่ดัดแปลงกับไลโครีนเพื่อนำส่งไลโครีนเข้าสู่เซลล์มะเร็ง และตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

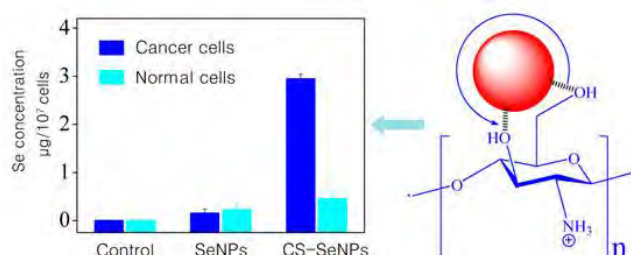
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2012 Liu และคณะ (13) ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ต่อกับ 5-Fluorouracil (5FU) ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษามะเร็งตับ มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ โดยต่อกันด้วยพันธะระหว่างซีลีเนียมกับออกซิเจน พันธะระหว่างซีลีเนียมกับไนโตรเจน และเกิดการดูดซับทางกายภาพกับพื้นผิวของอนุภาคซีลีเนียม ดังรูปที่ 1.1 และผู้วิจัยได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ $6.2 \mu M$ และมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งทำให้ลดผลข้างเคียงจากการทำลายเซลล์ปกติ นอกจากนี้อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ต่อกับ 5FU จะเพิ่มความสามารถในการเข้าสู่เซลล์มะเร็งมากกว่าการรักษาด้วย 5FU เพียงอย่างเดียว



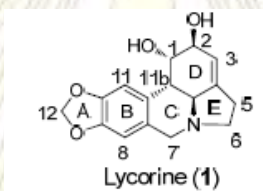
รูปที่ 1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ต่อกับ 5-Fluorouracil (5FU) (13)

ในปี 2012 Yu และคณะ (14) ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยโคโตซาน เนื่องจากผู้วิจัยต้องการตัดแปลงให้พื้นผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเป็นประจุบวก เพื่อศึกษาอิทธิพลของประจุว่ามีผลต่อการเข้าสู่เซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะหรือไม่ จึงใช้โคโตซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่เข้ากันได้กับร่างกาย ไม่เป็นพิษ และมีหมู่ที่ทำให้พื้นผิวเป็นประจุบวกคือ $-NH_3^+$ ดังรูปที่ 1.2 จากการทดลองพบว่า อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยโคโตซานจะจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะกับเซลล์มะเร็งผิวหนัง (A375) เนื่องจาก A375 มีความเป็นประจุลบสูงจึงทำให้เกิดอันตรกิริยา (interaction) ที่แข็งแรง และทำให้เข้าสู่เซลล์ได้ปริมาณมากขึ้น ซึ่งปริมาณของอนุภาคซีลีเนียมที่เข้าสู่เซลล์สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES)



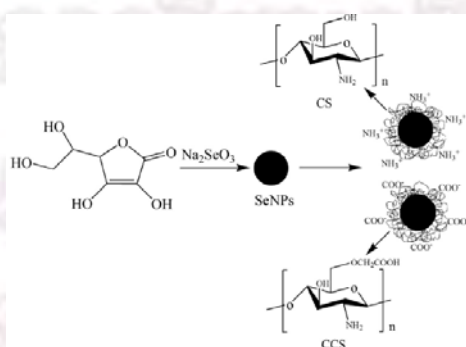
รูปที่ 1.2 อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยโคโตซานและที่พื้นผิวมีประจุบวก และกราฟแสดงความจำเพาะในการเข้าสู่เซลล์มะเร็ง (14)

ในปี 2014 Wang และคณะ (1) ศึกษาค่าความเป็นพิษของไลโครีน (lycorine) ต่อเซลล์มะเร็ง 7 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) เซลล์มะเร็งรังไข่ (SK-OV-3) เซลล์มะเร็งปอดขนาดใหญ่ (NCI-H460) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (K562) มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน (HL-60) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ด้วยวิธี MTT assay พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.5 ± 0.3 , 3.0 ± 0.2 , 3.0 ± 0.3 , 3.3 ± 0.3 , 7.5 ± 0.5 , 3.9 ± 0.2 และ 4.1 ± 0.1 ตามลำดับ และสังเคราะห์อนุพันธ์ของไลโครีน พบว่าเมื่อตัดแปลงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 จะทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเปลี่ยนไป เช่น เปลี่ยนเป็นหมู่เอมีนแบบอะลิฟาติกจะส่งผลให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีกว่าหมู่ เอมีนแบบแอโรมาติก



รูปที่ 1.3 โครงสร้างไลโครีน (lycorine) (1)

ในปี 2015 Chen และคณะ (15) สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยวิธีที่ง่ายและไม่เป็นอันตรายคือใช้โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) เป็นสารปรับเสถียร (stabilizer) และใช้วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิกเป็นตัวรีดิวซ์ จากนั้นทำให้พื้นผิวของอนุภาคมีประจุเพื่อเพิ่มความเสถียรของอนุภาค และควบคุมขนาดให้มีขนาดคงที่ โดยตัดแปลงกับไคโตซาน (CS) ซึ่งจะช่วยให้ผิวของอนุภาคมีประจุบวกเนื่องจากมีหมู่ $-NH_3^+$ และตัดแปลงกับคาร์บอกซิเมทิลไคโตซาน (CCS) ซึ่งจะช่วยให้ผิวของอนุภาคมีประจุลบเนื่องจากมีหมู่ $-COO^-$ จากนั้นทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการสลายตัวของ DPPH และ ABTS พบว่ามีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าโซเดียมซีลีไนด์ (Na_2SeO_3) ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบของซีลีเนียมที่มีโอกาสได้รับจากการทานเนื้อสัตว์ และพืชบางชนิด

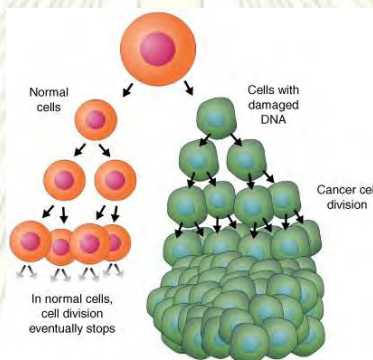


รูปที่ 1.4 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซานและคาร์บอกซิเมทิลไคโตซาน (15)

1.3 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 มะเร็ง

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เซลล์มีความผิดปกติซึ่งเกิดจากความผิดปกติของดีเอ็นเอหรือยีน ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวตลอดเวลาและควบคุมไม่ได้ ตามรูปที่ 1.5 สามารถหลบเลี่ยงโปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis) มีการรุกรานไปยังเซลล์และเนื้อเยื่อข้างเคียงโดยอาศัยระบบหมุนเวียนโลหิตและระบบน้ำเหลือง เมื่อเซลล์มะเร็งกระจายไปยังอวัยวะอื่นที่ไม่ใช่จุดกำเนิด จะสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วเนื่องจากมีการสร้างหลอดเลือดมาเลี้ยง ซึ่งสุดท้ายจะทำให้อวัยวะไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติจึงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต



รูปที่ 1.5 การแบ่งตัวของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง (17)

ความผิดปกติของดีเอ็นเอหรือยีนที่ส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งคาดว่าเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น พันธุกรรม สูบบุหรี่ ดื่มสุรา ขาดสารอาหาร สูงอายุ ทานอาหารหมักดอง อาหารประเภทแป้ง ไขมัน ได้รับรังสีซึ่งมีโอกาสที่จะให้ดีเอ็นเอเสียหายเกิดการกลายในระดับยีนได้ ติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น HIV HPV เป็นต้น

รูปแบบความผิดปกติของยีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

- การกลาย คือการเพิ่มซ้ำ (duplication) การขาดหาย (deletion) และการจัดเรียงตัวใหม่ (translocation) ของยีนหรือโครโมโซมที่ผิดปกติไปจากเดิม
- การเปลี่ยนแปลงที่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม เช่นมีการเติมหมู่เมทิลลงไปในดีเอ็นเอทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนที่ป้องกันมะเร็ง สุดท้ายส่งผลให้เซลล์นั้นกลายป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.2 ซิลิเนียม

เป็นธาตุที่สามารถดูดซึมได้ดีที่ลำไส้เล็ก ซึ่งจะเก็บไว้ที่ตับและไตมากกว่าที่กล้ามเนื้อ และขับออกทางปัสสาวะ ซึ่งร่างกายต้องการในปริมาณที่น้อยมาก (ปริมาณที่แนะนำคือ 70-200 ไมโครกรัมต่อวัน) แต่กลับมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญต่อร่างกายหลายอย่าง เช่น

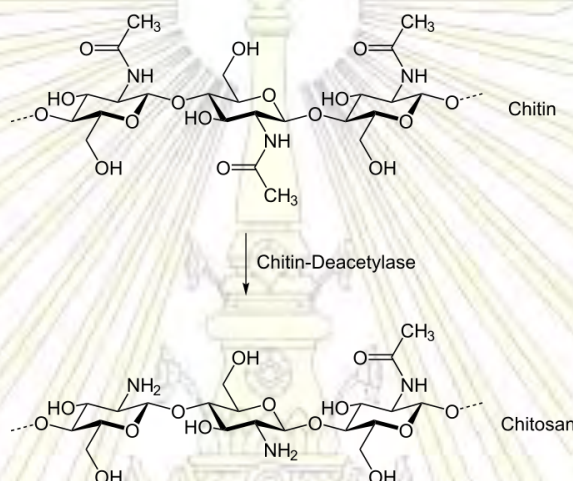
- มีฤทธิ์ป้องกันมะเร็ง เนื่องจากซิลิเนียมเป็นองค์ประกอบของโมเลกุลแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ (antioxidant enzyme) หรือ ซีลีโนโปรตีน (selenoprotein) เช่น กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นซีลีโนโปรตีนชนิดหนึ่งที่สำคัญมาก เนื่องจากโปรตีนนี้จะไปกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้กลายเป็นน้ำ ซึ่งหากมีสารอนุมูลอิสระนี้ในร่างกายจะส่งผลให้เกิดโรคเรื้อรังตามมา เช่น มะเร็งและโรคหัวใจ เป็นต้น นอกจากนี้ยังทำงานแบบเสริมฤทธิ์กับวิตามินอีซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ชะลอการตายของเซลล์และป้องกันการแก่ก่อนวัยได้ อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งแต่ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด
- ส่งเสริมการเจริญเติบโตของร่างกายให้เป็นไปอย่างปกติ
- ควบคุมการทำงานของต่อมไทรอยด์
- เพิ่มศักยภาพของระบบภูมิคุ้มกัน
- ช่วยการทำงานของตับ
- มีบทบาทเกี่ยวกับการหายใจของเนื้อเยื่อโดยทำหน้าที่ช่วยส่งอิเล็กตรอน
- รักษาความยืดหยุ่นของผิวหนัง ชะลอการเกิดริ้วรอย

การที่ได้รับปริมาณซิลิเนียมเกินกว่า 400 ไมโครกรัมต่อวันจะก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายได้ เช่น มีอาการหายใจเป็นกลิ่นคล้ายกระเทียม, คลื่นไส้, เลือดจาง, ผม่ว และถ้าใช้เกินขนาดเป็นเวลานานๆอาจทำให้เกิดภาวะตับวายได้

1.3.3 ไคโตซาน

ไคโตซานเป็นโพลีเมอร์แบบโซ่ตรง ประกอบด้วย D-glucosamine และ N-acetyl-D-glucosamine โดยเกิดพันธะกันแบบ β (1 \rightarrow 4) ได้มาจากขบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) ของไคติน ตามรูปที่ 1.6 ทำให้ไคโตซานประกอบด้วยหมู่แอมิโน (-NH₂) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จึงมีความสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าไคติน เนื่องจากมีหมู่แอมิโนที่ทำให้

สามารถละลายน้ำได้ในสถานะที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ได้อย่างหลากหลายเกิดเป็นอนุพันธ์ของไคโตซานชนิดต่างๆ ทั้งนี้ไคโตซานนิยมนำมาใช้ประยุกต์เพื่อการนำส่งยาเนื่องจากไม่เป็นพิษ (non-toxic) สามารถเข้าได้กับร่างกาย (biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradation) และเพิ่มการดูดซึมยาผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ เนื่องจากมีการยึดติดแบบเยื่อเมือก



รูปที่ 1.6 แผนภาพแสดงการเกิดไคโตซานโดยผ่านขบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) ของไคติน (18)

1.3.4 ไลโครีน

ไลโครีนเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่ได้จากการสกัดใบและหัวใต้ดินของพลับพลึง มีฤทธิ์ช่วยต่อต้านไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคโปลิโอ โรคหัด และโรคมาห่า

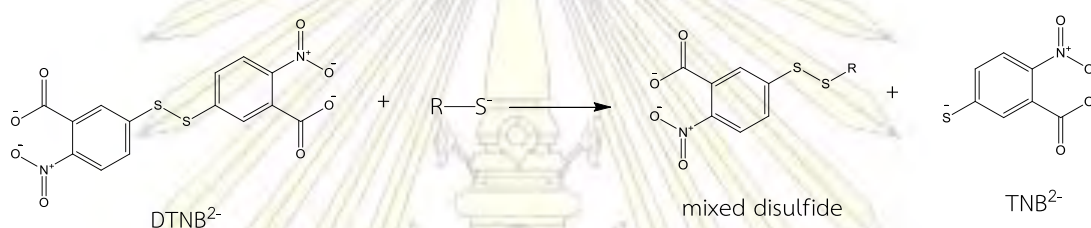
มีสูตรเคมีคือ $C_{16}H_{17}NO_4$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 287.32 กรัมต่อโมล



รูปที่ 1.7 ต้นและดอกพลับพลึง (19)

1.3.5 การวัดปริมาณของหมู่ไทออล

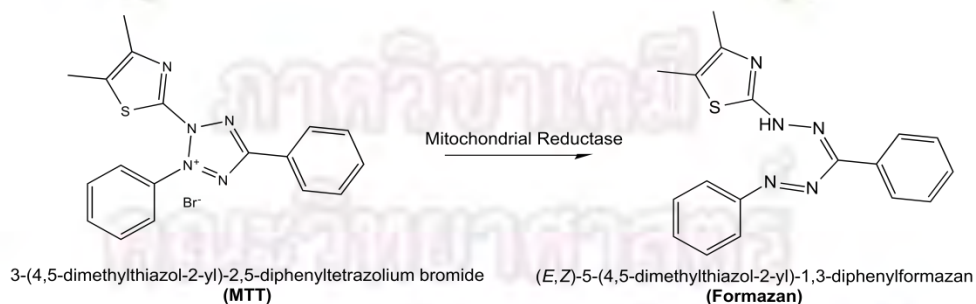
การหาปริมาณหมู่ไทออล (-SH) สามารถทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-} ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เนื่องจากหมู่ไทออลจะเกิดปฏิกิริยากับ Ellman's reagent ซึ่งก็คือ 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) หรือเรียกกันโดยย่อว่า DTNB ได้ผลิตภัณฑ์เป็น mixed disulfide และ 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB^{2-}) ซึ่งเป็นสารที่ให้สีเหลือง ตามรูปที่ 1.8 ดังนั้นจึงใช้เทคนิค UV-Vis spectroscopy ในการหาปริมาณหมู่ไทออลได้ นอกจากนั้นปฏิกิริยานี้ต้องทำในช่วง pH ที่ 7.6-8.6 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิด TNB^{2-}



รูปที่ 1.8 แผนภาพแสดงการเกิด TNB^{2-}

1.3.6 MTT assay

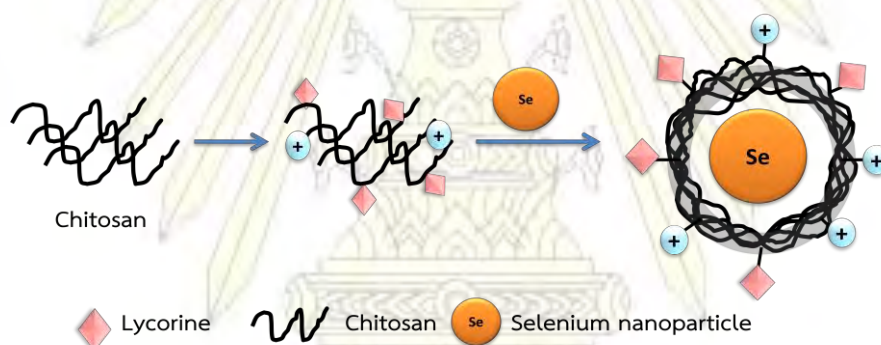
ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เท่านั้นจะมีเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งจะไปรีดิวซ์ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) ที่เป็นสารละลายสีเหลืองให้เป็นผลึกของ formazan ตามรูปที่ 1.9 และใช้สารละลาย DMSO ละลายผลึกซึ่งจะได้สารละลายสีม่วงที่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ดังนั้นจึงใช้เทคนิค UV-Vis spectroscopy วัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณเซลล์ที่อยู่รอดชีวิตได้ เนื่องจากปริมาณของ formazan (ความเข้มของสีม่วง) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเซลล์ที่รอดชีวิต



รูปที่ 1.9 แผนภาพแสดงการเกิด Formazan (20)

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้จะเป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรโดยไคโตซานที่ดัดแปลงกับไลโครีน และทำให้ไคโตซานมีประจุบวกโดยละลายในสภาวะกรดที่ pH น้อยกว่า 6.5 ทั้งนี้เพื่อให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีความเสถียร มีขนาดที่เหมาะสม และมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง ตามรูปที่ 1.10 พิสูจน์เอกลักษณ์ของไคโตซานที่ดัดแปลงด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ ($^1\text{H-NMR}$ spectroscopy), พูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR spectroscopy) และเทอร์โมกราวิเมตริกแอนาไลซิส (TGA) อีกทั้งใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียม ใช้เทคนิค dynamic light scattering (DLS) และ electrophoretic light scattering เพื่อหาขนาดและประจุบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียมตามลำดับ แล้วทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วย MTT assay



รูปที่ 1.10 แผนภาพแสดงอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซานที่ดัดแปลงกับไลโครีน

1.5 วัตถุประสงค์

1. สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เสถียรด้วยไคโตซาน เพื่อนำส่งไลโครีนซึ่งมีฤทธิ์ทางการรักษาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง
2. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เสถียรโดยไคโตซานและไลโครีน

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ได้อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เสถียรด้วยไคโตซาน เพื่อนำส่งไลโครีนเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้
2. อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซานและนำส่งไลโครีนซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและเซลล์มะเร็งปอด

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 สารเคมี

1. Chitosan (Food grade) บริษัท Seafresh Chitosan (ประเทศไทย) จำกัด
 - มวลโมเลกุล (M.W.) 500,000
 - Deacetylation Degree (%) = 81%
2. Lycorine บริษัท Xi'an Haoxuan Bio-tech จำกัด
3. 5-Amino-2-mercaptobenzimidazole (AMB) บริษัท Sigma-aldrich จำกัด
4. Dimethyl sulfoxide บริษัท RCI Labscan จำกัด
5. Sodium hydroxide บริษัท Carlo Erba จำกัด
6. p-Toluenesulfonyl chloride บริษัท Fluka จำกัด
7. 95% Ethyl alcohol (Lab Grade) บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด
8. Acetone บริษัท Merck จำกัด
9. Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) บริษัท Merck จำกัด
10. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) บริษัท Merck จำกัด
11. Cystein บริษัท Sigma-aldrich จำกัด
12. 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent) บริษัท Sigma-aldrich จำกัด
13. Sodium selenite บริษัท Sigma-aldrich จำกัด
14. Ascorbic acid บริษัท Sigma-aldrich จำกัด
15. Potassium bromide บริษัท Merck จำกัด
16. Trifluoroacetic acid (TFA) บริษัท Sigma-aldrich จำกัด
17. Deuterium oxide (D_2O) บริษัท Merck จำกัด

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Varian Mercury+ 400 NMR Spectrometer
2. Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) บริษัท Thermo Scientific จำกัด รุ่น Nicolet 6700
3. Microtiter plate reader บริษัท Biotek จำกัด รุ่น Powerwave XS2
4. Thermogravimetric Analyzer บริษัท PerkinElmer จำกัด รุ่น Pyris 1 TGA
5. Scanning Electron Microscope (SEM) บริษัท JEOL จำกัด รุ่น JSM-6480LV
6. Zetasizer Nano ZSP บริษัท Malvern จำกัด

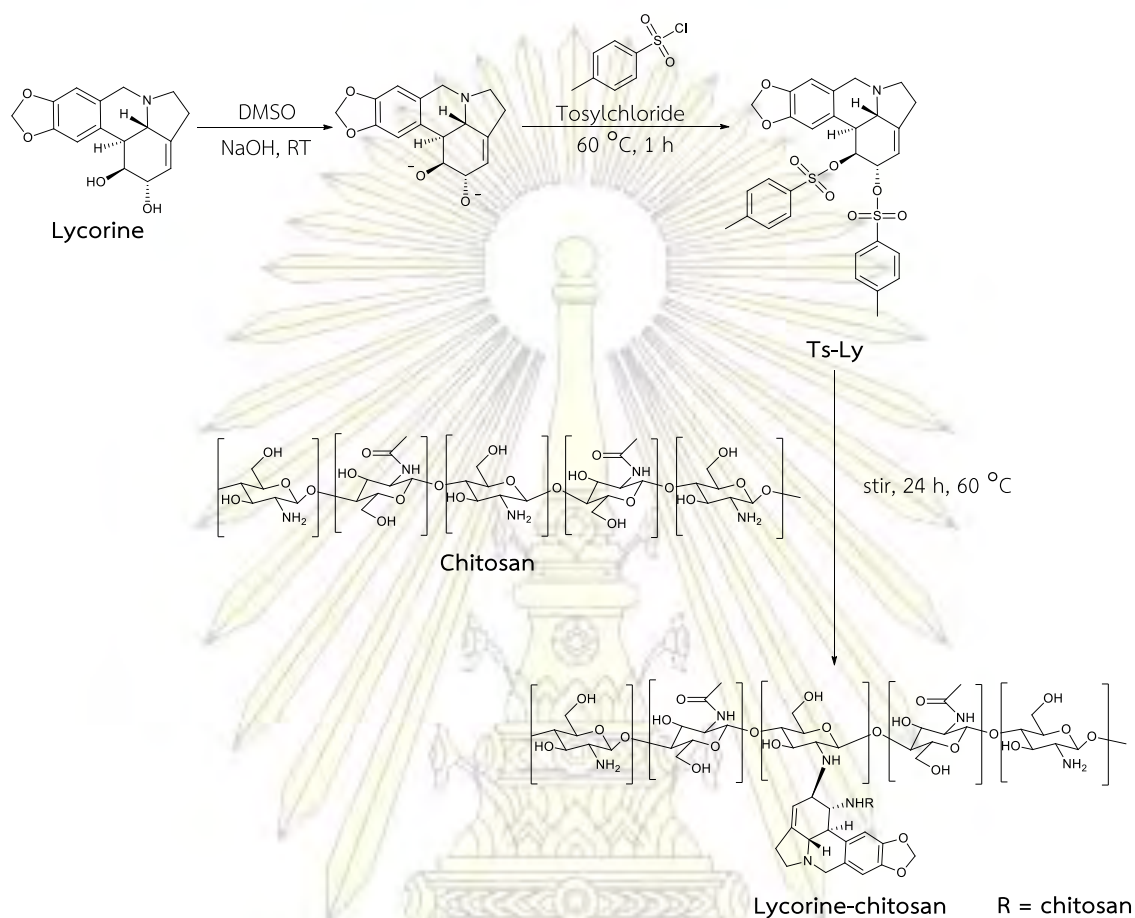
2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 ละลายไคโตซาน

ชั่งไคโตซาน 1.0055 กรัม ละลายใน 2% v/v hydrochloric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนสารที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน จะได้สารละลายไคโตซานสีเหลืองอ่อน เพื่อที่จะนำไปทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ Lycorine-chitosan (Ly-chitosan)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.2 สังเคราะห์ Lycorine-chitosan

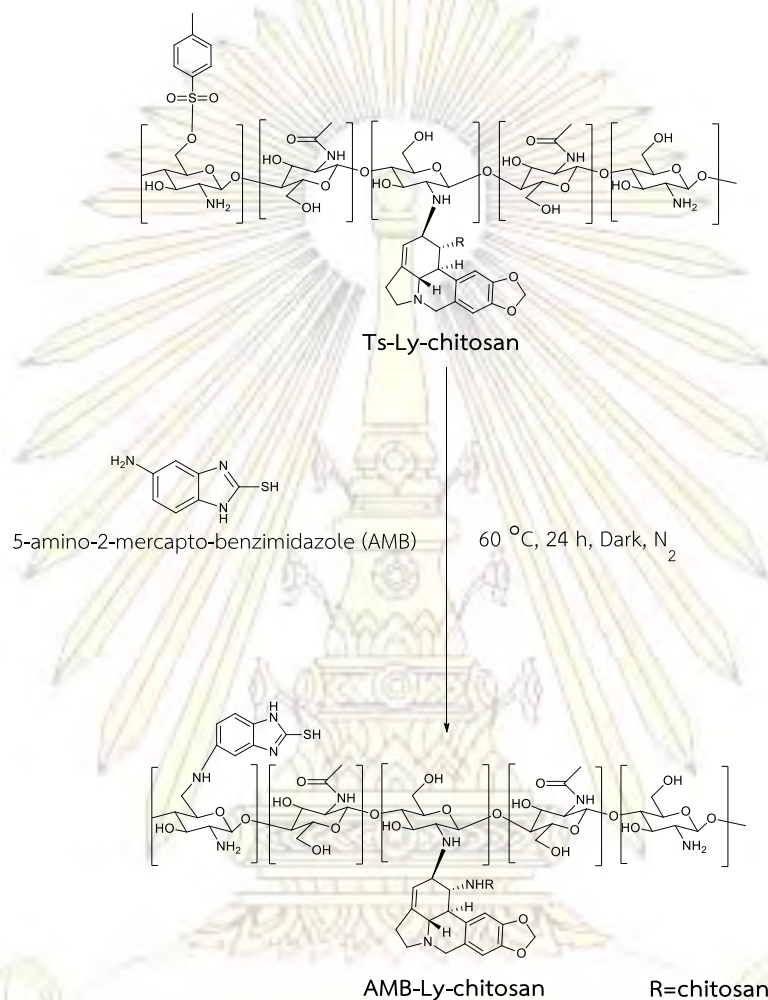


รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ Lycorine-chitosan

ซังโลโครีน (lycorine) 0.3020 กรัม (1.044 มิลลิโมล) เติม DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร คนสาร เติม sodium hydroxide 0.1699 กรัม (4.2 มิลลิโมล) คนสารที่อุณหภูมิห้องจนได้สารละลายใสสีเหลือง เติม tosyl chloride 0.5800 กรัม (3.044 มิลลิโมล) ที่ละลายในสารละลาย DMSO ปริมาตร 4 มิลลิลิตร คนสารที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จากนั้นเติมไคโตซานที่ละลายใน 2% v/v hydrochloric acid (จากขั้น 2.3.1) คนสารที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไดอะไลซิส (dialysis) ด้วยน้ำ ปราศจากไอออนเป็นเวลา 1 วัน และเอทานอล เป็นเวลา 1 วัน โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีค่ารูพรุน หรือค่า MWCO (Molecular Weight Cut Off) = 12-14 kDa หลังจากนั้นทำให้แห้ง โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy, $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy และ TGA

2.3.3 สังเคราะห์ [5-Amino-2-mercaptobenzimidazole]-Lycorine-chitosan

(AMB-Ly-chitosan)



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ AMB-Ly-chitosan

ซึ่ง Ts-Ly-chitosan (ผลิตภัณฑ์ที่ได้จริงจาก 2.3.2) 0.5000 กรัม ละลายใน 1% v/v acetic acid 50 มิลลิลิตร จากนั้นซึ่งสาร 5-amino-2-mercaptobenzimidazole (AMB) 0.5 กรัม ละลายในสารละลาย DMF 6.5 มิลลิลิตร และเติมลงในสารละลาย Lycorine-chitosan ทำปฏิกิริยาในที่มืด ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน และคนสารที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนในสภาวะเบส และเติมแอมิโตนให้มากเกินพอ กรองตะกอนแล้วนำไปไดอะไลซิสด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 1 วัน สุดท้ายทำให้แห้ง โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy, ¹H-NMR spectroscopy และ TGA

2.3.4 การหาปริมาณหมู่ไทออล

1) เตรียมสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 M, pH 8

- เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 M โดยชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 13.6086 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 1 M โดยชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 14.2000 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 M มา 6.8 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 1 M มา 93.2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
- ทำการเจือจางสารละลาย 2 เท่า จากนั้นปรับให้เป็น pH 8.0

2) เตรียม Ellman's reagent

ชั่ง DNBT 3 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 M, pH 8 ปรับปริมาตรจนมีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานซิสเตอีน (cystein) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- เตรียมสารละลายมาตรฐานซิสเตอีนความเข้มข้น 2000 μM 10 ml โดยชั่งซิสเตอีน 3.1 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.5 M, pH 8 ปรับปริมาตรจนเป็น 10 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายมาตรฐานซิสเตอีนที่ความเข้มข้นอื่นๆ โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานซิสเตอีนความเข้มข้น 2000 μM ที่ปริมาตรต่างๆกัน และปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 M, pH 8 ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารละลายซีสเทอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ (μM)

ความเข้มข้นสารละลาย ซีสเทอีน (μM)	ปริมาตรสารละลาย ซีสเทอีน 2000 μM (μL)	ปริมาตรสารละลาย ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.5 M pH 8 (μL)
1600	400	100
1400	350	150
1200	300	200
1000	250	250
800	200	300
600	150	350
400	100	400
200	50	450
100	25	475
10	2.5	497.5
1.0	*50	450
0.1	**50	450

* ปิเปตจากสารละลายซีสเทอีนความเข้มข้น 10 μM

** ปิเปตจากสารละลายซีสเทอีนความเข้มข้น 1.0 μM

4) เตรียม Blank เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy

ปิเปตสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 M, pH 8 ปริมาตร 500 ไมโคร-
ลิตร จากนั้นเติม Ellman's reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5) เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy

- ชั่งไคโตซาน 3.5 มิลลิกรัม และชั่ง AMB-Ly-chitosan 3.5 มิลลิกรัม เติมน้ำปราศ-
จากไอออน 250 ไมโครลิตร เติม 1% v/v acetic acid 100 ไมโครลิตร และเติม
สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 M, pH 8 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร
- เติม Ellman's reagent ในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายซีสเทอีนและตัวอย่าง
ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง
- ปิเปตสารแต่ละตัวอย่างมา 10 μL ใส่ใน 96 well plate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง
ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader

2.3.5 สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์

- 1) เตรียมสารละลายโซเดียมซีลีไนด์ (Na_2SeO_3) 5 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
 ชั่งโซเดียมซีลีไนด์ 8.7 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร
- 2) เตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) 20 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
 ชั่งกรดแอสคอร์บิก 35.2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร
- 3) สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
 - ผสมสารละลายโซเดียมซีลีไนด์กับพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.2
 - ค่อยๆหยดกรดแอสคอร์บิกปริมาตร 1000 ไมโครลิตร
 - เติมน้ำปราศจากไอออนเพื่อปรับให้ปริมาตรรวมเป็น 5 มิลลิลิตร
 - คนสารและทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีส้ม
 - ไดอะไลซิสในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 1 วัน

ตารางที่ 2.2 ปริมาตรของสารต่างๆที่ใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan และ AMB-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่างกัน

พอลิเมอร์	ปริมาตร Na_2SeO_3 (μL)	ปริมาตร พอลิเมอร์ (μL)	ปริมาตร Ascorbic acid (μL)	ปริมาตร DI water (μL)
Ts-Ly-chitosan 0.1 mg/mL	1000	100	1000	2900
Ts-Ly-chitosan 0.3 mg/mL	1000	300	1000	2700
Ts-Ly-chitosan 0.5 mg/mL	1000	500	1000	2500
Ts-Ly-chitosan 0.7 mg/mL	1000	700	1000	2300
AMB-Ly-chitosan 0.5 mg/mL	1000	500	1000	2500
AMB-Ly-chitosan 0.7 mg/mL	1000	700	1000	2300

2.4 วิธีการทดสอบสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้

2.4.1 การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Proton Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$)

การพิสูจน์ทราบสารตัวอย่างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ใช้เครื่อง Varian Mercury+ 400 NMR Spectrometer การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ทำได้ดังต่อไปนี้ ชั่งสารตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลอง เติมตัวทำละลายดีวทีเรียมออกไซด์ (Deuterium oxide; D_2O) ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร และเติม Trifluoroacetic acid (TFA) 2 หยดเพื่อละลายพอลิเมอร์ คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นดูดสารละลายใส่หลอด NMR ให้สูงประมาณ 4 เซนติเมตร และปิดด้วยจุกปิดหลอดแล้วนำไปวิเคราะห์

2.4.2 การพิสูจน์ทราบหมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

การพิสูจน์ทราบสารตัวอย่างด้วยเทคนิค FT-IR ใช้เครื่อง FT-IR ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Nicolet 6700 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ทำได้ดังต่อไปนี้ บดสารตัวอย่างให้ละเอียดแล้วร่อนผ่าน test sieve (0.0083 inches) จากนั้นใส่สารตัวอย่าง 1 ส่วนและใส่โพแทสเซียมโบรไมด์ที่ปราศจากความชื้น 10 ส่วน บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารใส่ลงใน holder อัดให้เป็นแผ่น จากนั้นนำไปวิเคราะห์ในช่วงความยาวคลื่น (wave number) $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ จำนวนครั้งในการสแกนเท่ากับ 32

2.4.3 การตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของสารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA)

การตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของสารตัวอย่าง เป็นการวัดน้ำหนักของสารที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยเครื่องชั่งความไวสูงที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆ โดยใช้เครื่อง Thermogravimetric Analyzer ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น Pyris 1 TGA) เตรียมตัวอย่างโดยการตักสารใส่ sample pan จากนั้นนำไปวิเคราะห์ในช่วงอุณหภูมิ $50\text{ }^{\circ}\text{C}\text{-}600\text{ }^{\circ}\text{C}$ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$

2.4.4 การตรวจสอบขนาดและประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยใช้เทคนิค

Dynamic Light Scattering (DLS) และ Electrophoretic Light Scattering

การตรวจสอบขนาดและประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ ใช้เครื่องมือ Zetasizer Nano ZSP ยี่ห้อ Malvern เตรียมตัวอย่างโดยเทสารละลายตัวอย่างใส่ cuvette ประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัด

2.4.5 การศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยใช้เครื่อง Scanning Electron

Microscope (SEM)

ตัด microscope slide ให้เป็นสี่เหลี่ยมขนาดเล็กประมาณ (0.5×0.5 เซนติเมตร) เรียงใส่จานกระจก จากนั้นหยดสารละลายตัวอย่างอนุภาคนาโนซีลีเนียมลงบน microscope slide ที่ตัดแล้ว ปิดฝาจานกระจกแล้วเก็บในเดซิเคเตอร์เพื่อดูดความชื้นทิ้งไว้ให้สารละลายแห้งเป็นเวลา 1 วัน ติดเทปกาวบน carbon planchets และใช้ปากคีบปลายแหลม (tweezers) คีบ microscope slide ติดกับ carbon planchets นำไปฉายด้วยทองคำ จากนั้นนำเข้าเครื่องเพื่อส่องดูลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

2.4.6 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติโดยวิธี MTT assay

วิธี MTT assay เป็นการวิเคราะห์เพื่อแสดงผลเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับสารตัวอย่าง และบอกความเป็นพิษของสารตัวอย่างด้วยค่า IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ ซึ่งค่า IC_{50} ใช้แบ่งประสิทธิภาพของยาเป็น 4 กลุ่มดังนี้

- 1) $IC_{50} < 1.00 \mu M$ แสดงว่า ยามีประสิทธิภาพสูง
- 2) $IC_{50} = 1.00-25.00 \mu M$ แสดงว่า ยามีประสิทธิภาพปานกลาง
- 3) $IC_{50} = 25.00-50.00 \mu M$ แสดงว่า ยามีประสิทธิภาพต่ำ
- 4) $IC_{50} > 50.00 \mu M$ แสดงว่า ยาไม่ออกฤทธิ์

วิธีการทดลอง

• เตรียมเซลล์ 6 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และ

เซลล์ปกติ (WI38) โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ออกก่อนโดยใช้ปิเปตดูด เติม เอนไซม์ trypsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละเซลล์ รอเป็นเวลาประมาณ 5 นาทีหรือจนเซลล์ เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวของขวด และดูดเอาเอนไซม์ trypsin ออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป ประมาณ 5 มิลลิลิตร ดูดสารขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อให้เซลล์เดี่ยวๆกระจายตัวอยู่อาหารเลี้ยงเชื้อ และดูดใส่หลอดปราศจากเชื้อ

• นับจำนวนเซลล์ โดยปิเปตมาประมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ hemacytometer แล้วนับ จำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยปริมาณเซลล์ทั้งหมดได้มาจากการคำนวณโดยสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณเซลล์ทั้งหมด (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \text{ปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่นับได้} \times \text{dilution factor} \times 10^4$$

เจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5,000 เซลล์/มิลลิลิตร ให้ได้ 20 มิลลิลิตร ต่อ plate

• ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์เดี่ยวกระจายอยู่ 200 ไมโครลิตร ลง 96 well-plate และ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เป็นเวลา 1 วัน

• เตรียมสารละลายอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย chitosan, Ts-Ly-chitosan, AMB-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้น 20 mM และเจือจางให้มีความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mM ตามลำดับ หลังจากนั้นปิเปตแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลง 96 well-plate ดังนั้นสุดท้ายความเข้มข้นของสารใน 96 well plate จะเท่ากับ 200, 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 μM บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เป็นเวลา 3 วัน

• ปิเปต MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม เคาะเบาๆเพื่อให้กระจายทั่วเท่ากันภายในหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

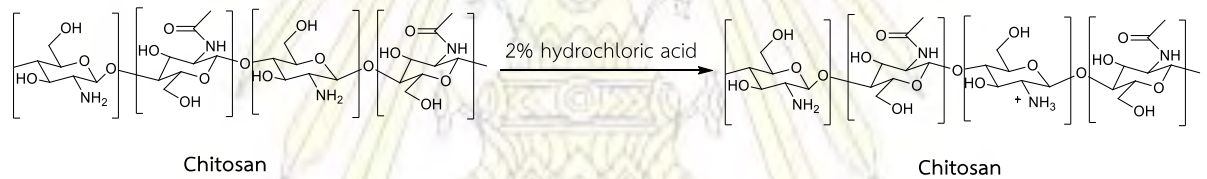
• จะเกิดผลึกสีม่วงของ formazan ที่ก้นหลุม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออกจากหลุม จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก formazan ได้เป็น สารละลายสีม่วงที่มีความเข้มต่างกัน เคาะเบาๆให้ผลึกละลายให้หมด จากนั้นนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การเตรียมไคโตซาน

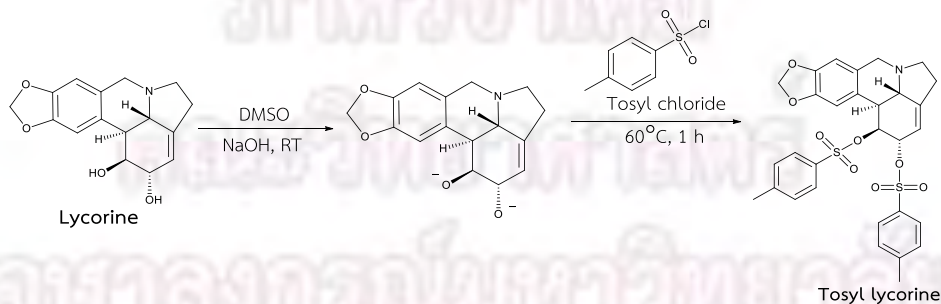
ไคโตซานสามารถละลายใน 2% v/v กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ได้เป็นสารละลายสีเหลืองอ่อนและมีลักษณะหนืด ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานมีค่า pKa ประมาณ 6.4 ดังนั้นจึงละลายน้ำได้ในสภาวะเป็นกรด และโครงสร้างของไคโตซานมีหมู่แอมิโน ($-NH_2$) ที่สามารถถูกโปรตอนด้วยไฮโดรเนียมไอออนได้ ทำให้กลายเป็น $-NH_3^+$ ซึ่งช่วยให้ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังละลายใน 1% v/v acetic acid ได้เช่นเดียวกัน



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการละลายของไคโตซานในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2% v/v

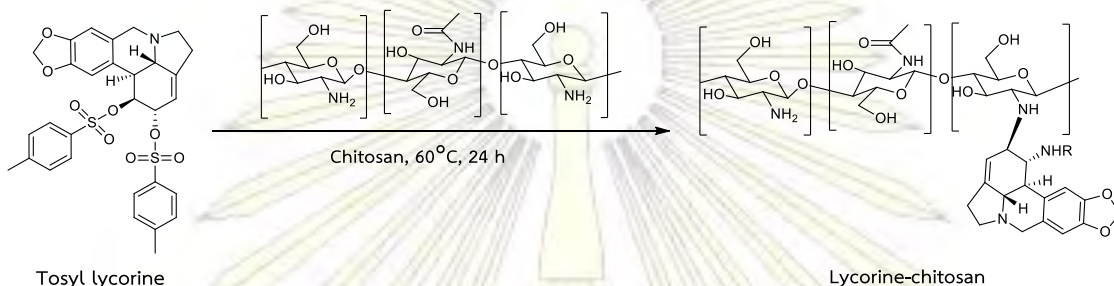
3.2 การสังเคราะห์ Lycorine-chitosan

แผนการสังเคราะห์ Lycorine-chitosan ขั้นแรกทำปฏิกิริยา Tosylation ของ lycorine ก่อน เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) ของ lycorine เป็นหมู่หลุดออก (Leaving Group) ที่ไม่ดี ดังนั้นหลังจากทำปฏิกิริยา Tosylation แล้ว หมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) จะเปลี่ยนเป็นหมู่ tosyl ($-OTS$) ตามรูปที่ 3.2 ซึ่งเป็นหมู่หลุดออกที่ดีมาก จากนั้นจึงนำไปทำปฏิกิริยากับไคโตซานซึ่งจะช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น



รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงแผนการสังเคราะห์ Tosyl lycorine

หมู่แอมิโน (-NH₂) ของไคโตซานเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ว่องไวกว่าหมู่ไฮดรอกซิลจะทำปฏิกิริยากับ Tosyl lycorine ผ่านปฏิกิริยาการแทนที่ กลไกแบบ bimolecular (S_N2) ทำให้หมู่ tosyl หลุดออกไป และคาดว่าจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น Lycorine-chitosan ตามรูปที่ 3.3 โดยกำหนดให้ NHR คือหมู่แอมิโนของไคโตซานที่เกิดปฏิกิริยาแทนที่หมู่ tosyl แล้วเกิดพันธะกับ lycorine



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงแผนการสังเคราะห์ Lycorine-chitosan หลังจาก lycorine ทำปฏิกิริยา tosylation

จากการทดลอง ซึ่ง lycorine (0.3022 กรัม, 1.044 มิลลิโมล) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว และละลายในตัวทำละลาย DMSO แต่ละลายไม่หมด นำไปทำปฏิกิริยากับ NaOH จะกลายเป็นสารละลายใสสีเหลือง และเมื่อเติม tosyl chloride (0.5800 กรัม, 3.044 มิลลิโมล) ที่ละลายใน DMSO เช่นเดียวกันลงไป และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเกิดตะกอนของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ก้นปิกเกอร์ จากนั้นเติม 1% m/v chitosan (1.0055 กรัม) ที่ละลายใน hydrochloric acid ลงไปเพื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อนที่มีความหนืด แล้วไดอะไลซิสด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 1 วัน และเอทานอล (ethanol) เป็นเวลา 1 วัน เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน และสารที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับไคโตซาน จากนั้นทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 60°C จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มสีน้ำตาลอ่อน น้ำหนัก 0.8710 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 86.6

3.2.1 การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$

$^1\text{H NMR}$ ของ lycorine ดังรูปที่ 3.5 (a) ใช้ตัวทำละลายเป็น DMSO ได้ผล $^1\text{H NMR spectra}$ ดังนี้ พีคที่ δ (ppm) = 6.78 (H_{10}), 6.66 (H_8), 5.93 (H_9), 5.92 (H_9), 5.34 (H_3), 4.89 (1-OH), 4.78 (2-OH), 4.24 (H_1), 3.97 (H_2), 3.31 (H_7), 3.28 (H_7), 3.17, 2.59 (H_{12}), 2.48 (H_{11}), 2.42 (H_5) และ 2.19 (H_6)

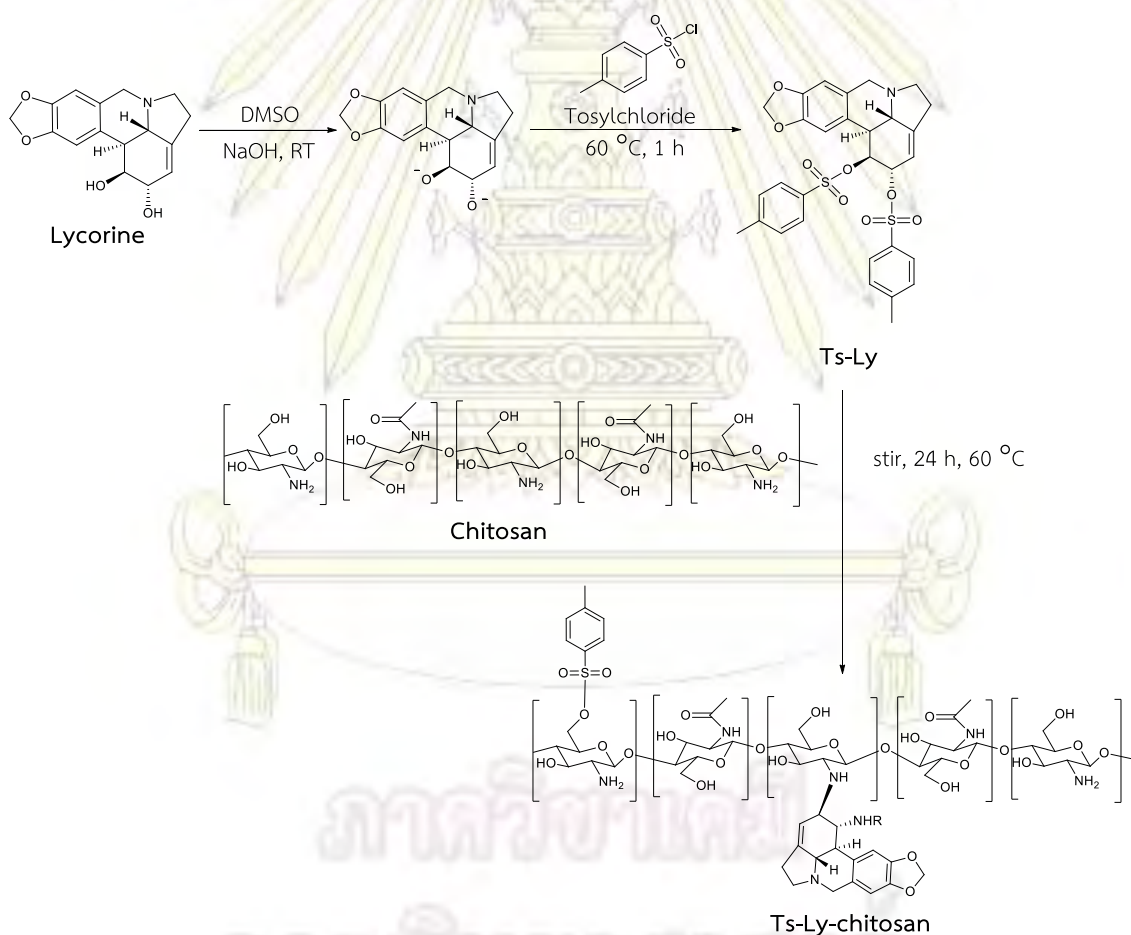
$^1\text{H NMR}$ ของ chitosan ดังรูปที่ 3.5 (b) ใช้ตัวทำละลายเป็น D_2O ได้ผล $^1\text{H NMR spectra}$ ดังนี้ พีคที่ δ (ppm) = 4.68 (D_2O), 3.61-3.42 (H_{15} , H_{16} , H_{17} , H_{18} ; โปรตอนในโครงสร้างไพราโนส), 2.88 (H_{14} , $-\text{NH}_2$) และ 1.77 (HN-COCH_3)

$^1\text{H NMR}$ ของโคโตซานที่ดัดแปลงกับ lycorine ดังรูปที่ 3.5 (c) พบพีคของโคโตซานที่ δ (ppm) = 3.65-3.47 แสดงถึงโปรตอนในโครงสร้างแบบไพราโนส (pyranose ring) 2.91 และ 1.80 แสดงถึงโปรตอนของหมู่แอมิโน ($-\text{NH}_2$) และโปรตอนของ N-acetylglucosamine (HN-COCH_3) ตามลำดับ อีกทั้งพบพีคของ lycorine ที่ δ (ppm) ประมาณ 5.98 และ 5.55 แต่เห็นไม่ชัดเนื่องจากอัตราส่วนปริมาณของสารระหว่างโคโตซานต่อ lycorine ที่ทำปฏิกิริยาต่างกันมาก (1.0055 กรัม : 0.3022 กรัม) ทำให้พีคขึ้นไม่ชัดและถูกกลบด้วยพีคของโคโตซาน และแสดงให้เห็นว่า lycorine เกิดพันธะกับโคโตซานในปริมาณที่น้อยมาก นอกจากนั้นยังพบพีคสัญญาณที่แสดงถึงหมู่ tosyl ทั้งหมด 3 พีคดังนี้ 1. พีคที่ δ (ppm) = 2.13 แสดงสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิลที่ตำแหน่งปลายของหมู่ tosyl และพีคที่เหลือมีลักษณะการ split แบบ doublet ที่ δ (ppm) ประมาณ 7.43 และ 7.10 ซึ่งแสดงโปรตอนในวงแหวนมาติกของ tosyl chloride ดังนั้นจึงบอกได้ว่าโคโตซานเกิดพันธะกับ lycorine ได้ แต่ยังมี tosyl chloride ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา tosylation ของ lycorine มาทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของโคโตซาน จึงไม่ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Lycorine-chitosan ดังรูปที่ 3.3 แต่จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น Ts-Ly-chitosan แทนดังรูปที่ 3.4

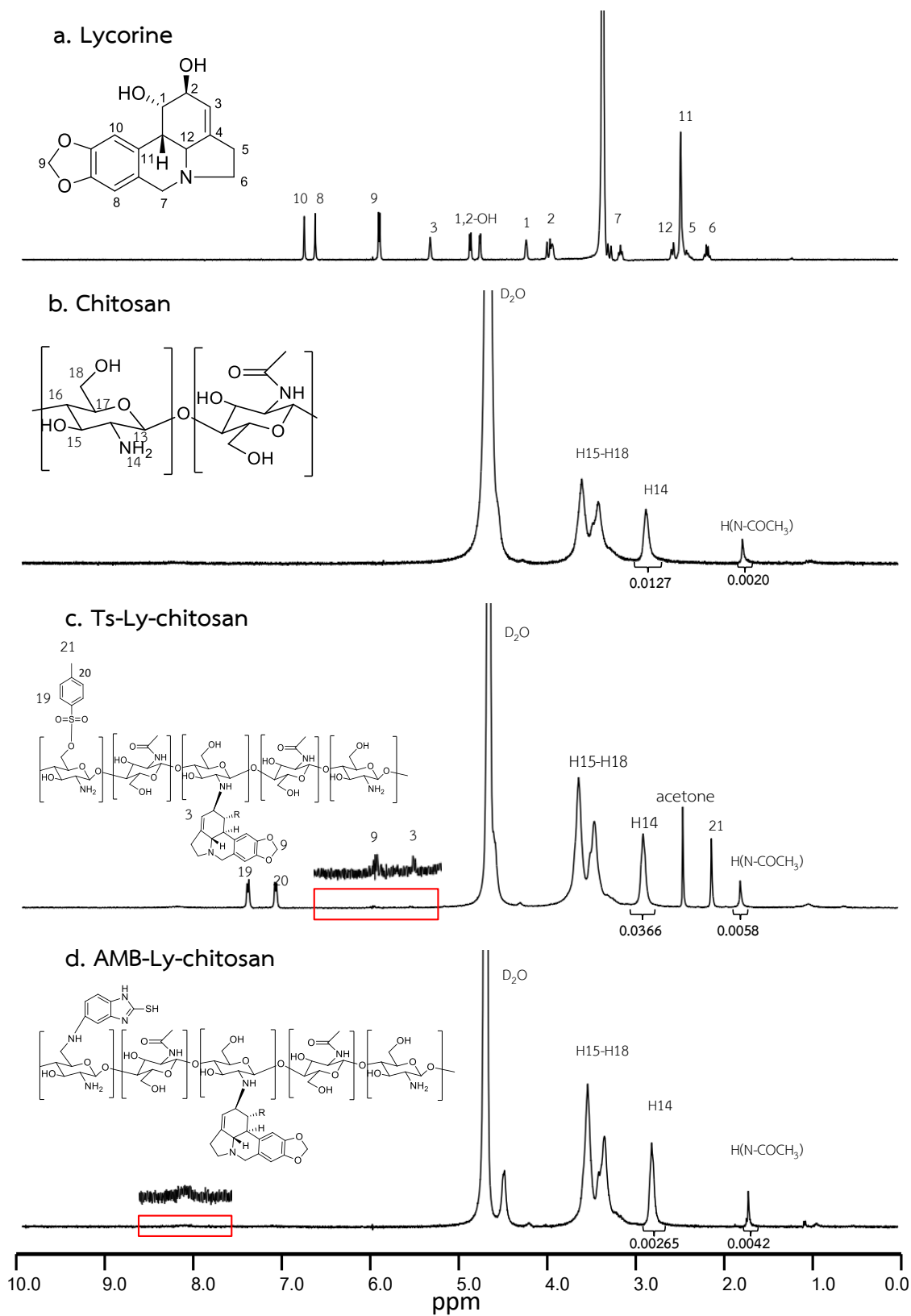
เพื่อเป็นการยืนยันว่า lycorine เกิดพันธะกับหมู่แอมิโนของโคโตซานได้จริง สามารถคำนวณอัตราส่วน integration โปรตอนของหมู่แอมิโน ($-\text{NH}_2$; H_{14}) ต่อโปรตอนของ N-acetylglucosamine (HN-COCH_3) ตามสมการดังนี้

$$\text{Integration ratio} = \frac{\text{integration of amino group}}{\text{integration of HN - acetylglucosamine}}$$

ถ้าเกิดพันธะกันอัตราส่วนของ integration จะลดลงเมื่อเทียบกับโคโตซานที่ไม่ได้ดัดแปลง เพราะโปรตอนของหมู่แอมิโน ($-NH_2$) จะหลุดออกเนื่องจากเกิดปฏิกิริยากับ lycorine ในขณะที่โปรตอนของ N-acetylglucosamine ($HN-COCH_3$) คงที่เนื่องจากไม่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเกิดปฏิกิริยาใดๆ จึงใช้อ้างอิงเทียบกับโปรตอนที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ จากการคำนวณอัตราส่วน integration ตามรูปที่ 3.5 (b) และ 3.5 (c) พบว่า Ts-Ly-chitosan มีอัตราส่วนเท่ากับ 6.31 ซึ่งน้อยกว่าโคโตซานที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 6.35 จึงเป็นการยืนยันได้ว่าเกิดพันธะระหว่าง lycorine กับโคโตซานจริงแต่ในอัตราส่วนที่น้อยมาก เนื่องจาก lycorine มี para-hydroxyl ซึ่งเกิด intramolecular hydrogen bond ที่แข็งแรงทำให้การโปรตอนเนตหมู่ไฮดรอกซิลทำได้ยาก

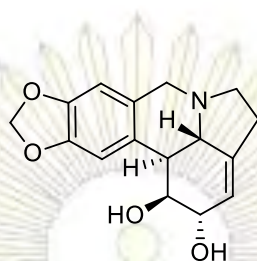


รูปที่ 3.4 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ Tosyl-Lycorine-chitosan (Ts-Ly-chitosan)



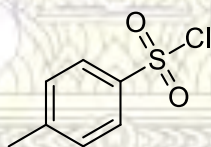
รูปที่ 3.5 ^1H NMR สเปกตรัมของ a) lycorine, b) chitosan, c) Ts-Ly-chitosan, d) AMB-ly-chitosan

3.2.2 การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค FT-IR



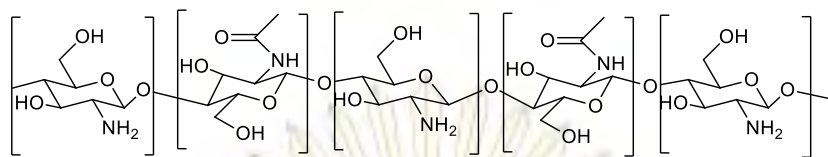
รูปที่ 3.6 โครงสร้าง lycorine

พิจารณา IR สเปกตรัม รูปที่ 3.10 (a) ของ lycorine พบว่ามีการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ 3340 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ O-H stretching พีคที่ 3109 และ 2892 cm^{-1} เป็นพีคของ C-H stretching ของวงแอโรมาติก และ C-H stretching ของ cycloalkane ตามลำดับ พีคที่ 1507 cm^{-1} และ 1488 cm^{-1} แสดงถึง C=C stretching ของวงแอโรมาติก และยังพบพีคที่ 1040 cm^{-1} เป็นพีคสัญญาณของ C-O-C stretching ของ saturated cyclic



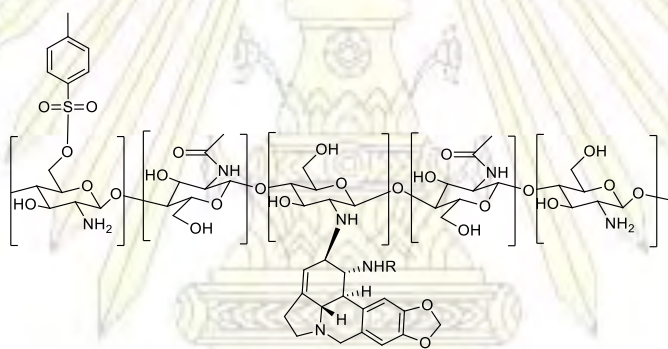
รูปที่ 3.7 โครงสร้าง tosyl chloride

พิจารณา IR สเปกตรัม รูปที่ 3.10 (b) ของ tosyl chloride พบว่าพีคในช่วง 3100 cm^{-1} - 3000 cm^{-1} รวมทั้งพีคในช่วง 2900 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคสัญญาณของ C-H stretching ของวงแอโรมาติกและ C-H stretching ของ methyl มีลักษณะกว้างไม่เห็นเป็นพีคแหลมอย่างที่ควร ทั้งนี้คาดว่าสารที่นำไปวิเคราะห์มีความชื้น ทำให้ปรากฏพีคของ O-H stretching ของน้ำ พีคที่ 1587 cm^{-1} และ 1493 cm^{-1} เป็นพีคแสดงสัญญาณของ C=C stretching ของวงแอโรมาติก และพีคที่สำคัญที่เป็นลักษณะเด่นคือ พีคที่ 1196 cm^{-1} แสดงสัญญาณของ SO_2 stretching แบบสมมาตรของหมู่ tosyl chloride



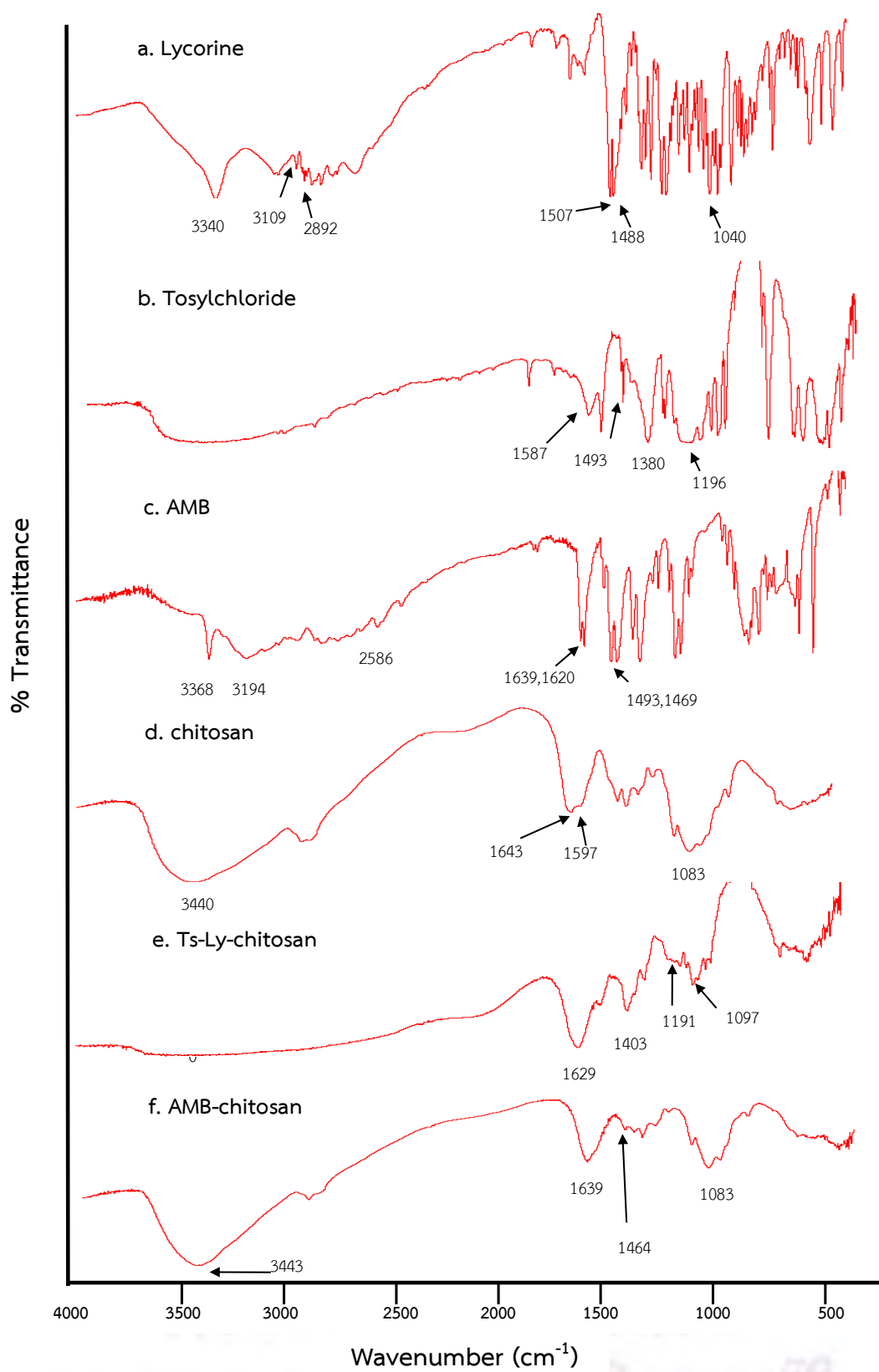
รูปที่ 3.8 โครงสร้างไคโตซาน

พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.10 (d) ของไคโตซาน พบว่ามีการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่น 3440 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ O-H stretching และ N-H stretching จะเห็นได้ว่าพีคมีลักษณะกว้างและเข้มเนื่องจากไคโตซานมีหมู่ $-\text{OH}$ และ $-\text{NH}_2$ ในโครงสร้างเป็นปริมาณมากและเกิดการซ้อนทับกัน พีคที่ 1643 cm^{-1} และ 1597 cm^{-1} เป็นพีคของ C=O stretching และ N-H bending ของหมู่เอไมด์ ตามลำดับ ส่วนพีคที่ 1083 cm^{-1} เป็นพีคของ C-OH stretching ของโครงสร้างไพราโนส



รูปที่ 3.9 โครงสร้าง Tosyl-Lycorine-chitosan (Ts-Ly-chitosan)

พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.10 (e) ของ Ts-Ly-chitosan พบว่ามีการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นคล้ายไคโตซาน แต่จะเห็นได้ว่าพีคที่แสดงสัญญาณของ C-O stretching ของโครงสร้างไพราโนสเกิดการ shift จากไคโตซานบริสุทธิ์คือที่ 1083 cm^{-1} เป็น 1097 cm^{-1} เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล ($-\text{OH}$) ของไคโตซานทำปฏิกิริยากับ tosyl chloride เกิดเป็นพันธะใหม่คือ C-OS จึงทำให้ C-O stretching ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างจากเดิม นอกจากนี้ยังพบพีคใหม่ที่ 1191 cm^{-1} เป็นพีคของ SO_2 stretching แบบสมมาตรของหมู่ tosyl ส่วนพีคของ lycorine คาดว่าซ้อนทับกับพีคของไคโตซานทำให้เห็นไม่ชัด



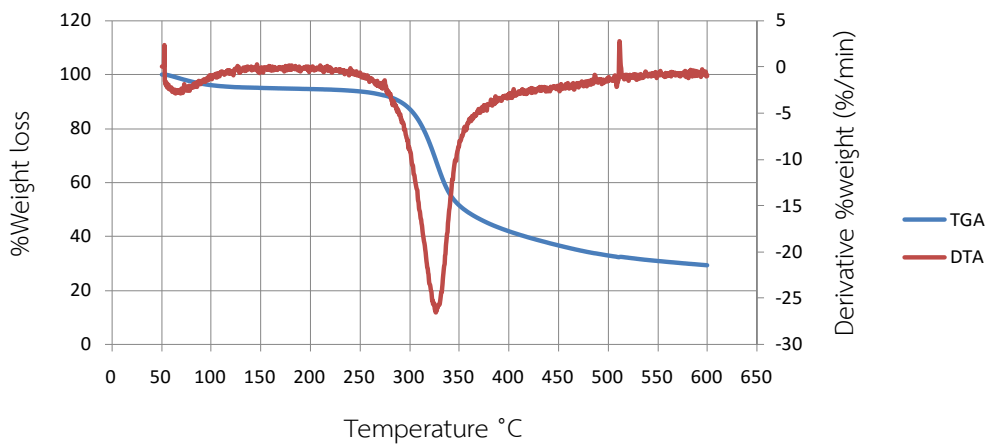
รูปที่ 3.10 FT-IR สเปกตรัมของ a) lycorine b) Tosyl chloride c) AMB d) chitosan e) Ts-Ly-chitosan และ f) AMB-Ly-chitosan

3.2.3 การตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของสารโดยใช้เทคนิค TGA

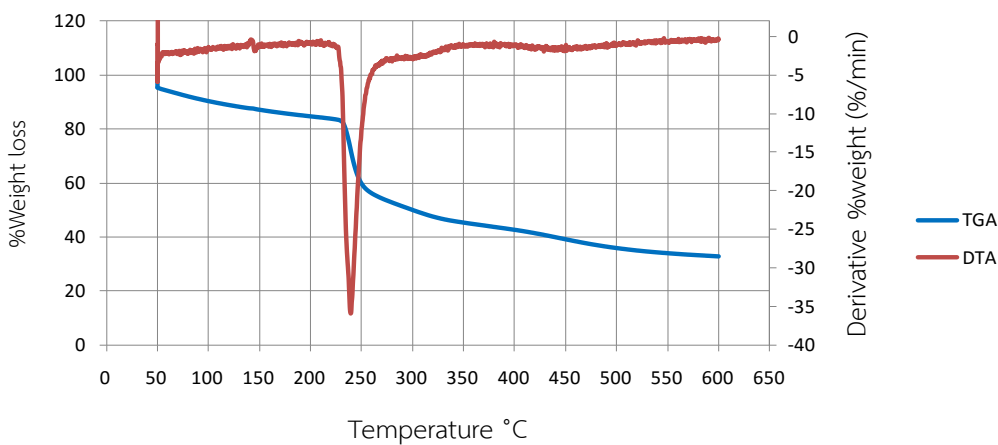
เทคนิค TGA ใช้หลักการวัดมวลที่หายไปของสารด้วยเครื่องชั่งที่มีความไวสูง เมื่อให้อุณหภูมิที่สูงขึ้น ซึ่งสารแต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิเฉพาะต่อการสลายตัวต่างกัน จึงนำเทคนิคนี้มาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างเช่น วิเคราะห์องค์ประกอบสารเติมแต่งในพอลิเมอร์และความเสถียรทางความร้อน เป็นต้น

การทดสอบความเสถียรทางความร้อนของไคโตซานและ Ts-Ly-chitosan จะแสดงผลด้วย Thermogravimetric Curve และ Differential Thermal Analysis (DTA) จากกราฟ DTA ของไคโตซานตามรูปที่ 3.11 (a) แสดงให้เห็นว่ามีการสลายตัว 2 ชั้น ชั้นแรกคือที่อุณหภูมิประมาณ 60°C เกิดการระเหยของน้ำที่อยู่บนอยู่ในพอลิเมอร์ มวลหายไปประมาณ 15% ของมวลทั้งหมด ชั้นที่สองคือที่อุณหภูมิ 327°C เป็นการสลายตัวของสายโซ่อนุพันธ์ของไคโตซาน (chitosan backbone) มวลหายไปประมาณ 89% ของมวลทั้งหมด ส่วนกราฟ DTA ของ Ts-Ly-chitosan รูปที่ 3.11 (b) พบว่าเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิ 239°C แสดงให้เห็นว่าไคโตซานที่ดัดแปลงกับ lycorine และ tosyl chloride มีความเสถียรทางความร้อนต่ำกว่าไคโตซานบริสุทธิ์เป็นอย่างมาก (อุณหภูมิต่างกัน 89°C) ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานที่ถูกดัดแปลงจะมีความเกาะเกาะมากขึ้นทำให้การจัดเรียงโครงสร้างทางผลึกของไคโตซานไม่เป็นระเบียบ อีกทั้งยังเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลได้น้อยลง

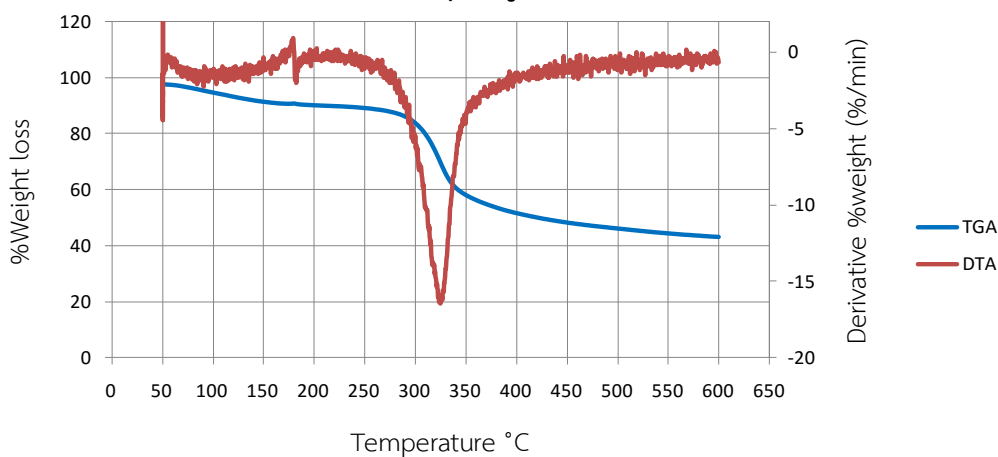
a. Chitosan สลายตัวที่อุณหภูมิ 327 °C



b. Ts-Ly-chitosan สลายตัวที่อุณหภูมิ 239 °C



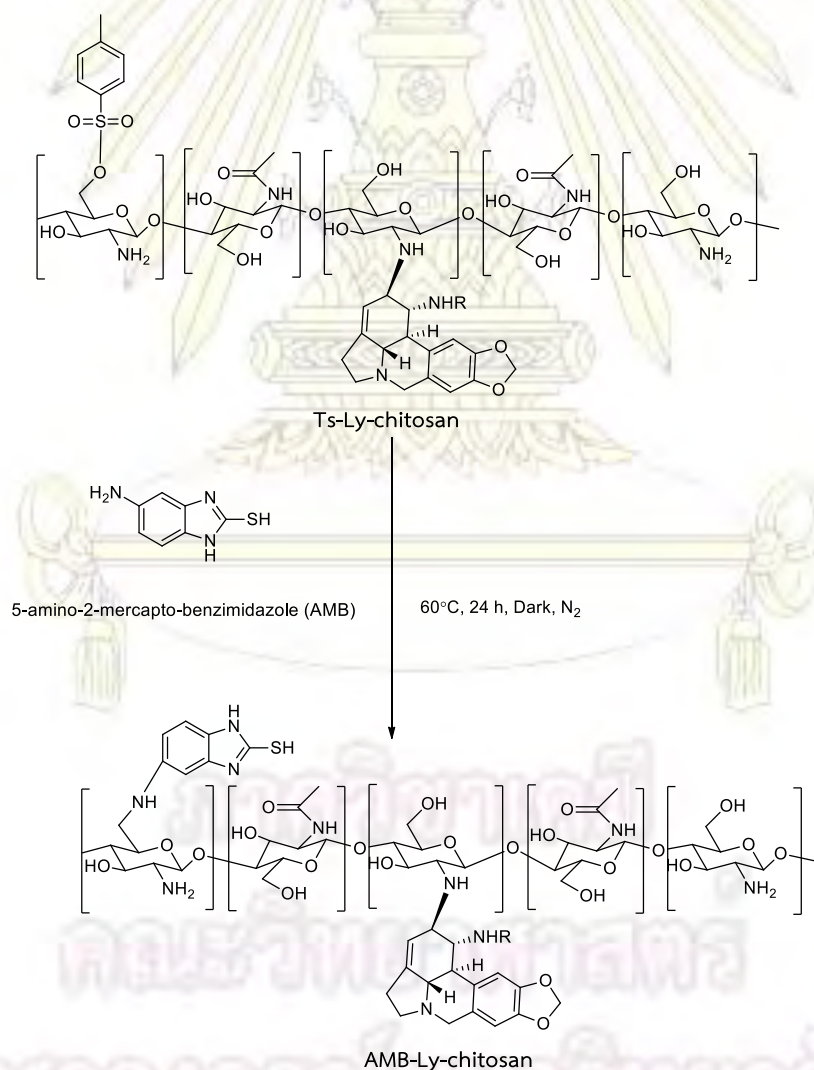
c. AMB-Ly-chitosan สลายตัวที่อุณหภูมิ 325 °C



รูปที่ 3.11 Thermogravimetric curve (TGA curve) และ Differential Thermal Analysis (DTA) ของ a) chitosan, b) Ts-Ly-chitosan และ c) AMB-Ly-chitosan

3.3 การสังเคราะห์ [5-Amino-2-mercaptobenzimidazole]-Lycorine-chitosan (AMB-Lycorine-chitosan)

จากการสังเคราะห์ในขั้น Lycorine-chitosan พบว่าได้ Ts-Ly-chitosan เนื่องจาก tosyl chloride มีมากเกินไปจึงทำปฏิกิริยา tosylation กับหมู่ไฮดรอกซิลของไคโตซานได้ เพื่อที่จะกำจัดหมู่ tosyl จึงนำสารนี้มาทำปฏิกิริยากับ 5-Amino-2-mercaptobenzimidazole (AMB) ซึ่งมีหมู่อะมิโน (-NH₂) เป็นนิวคลีโอไฟล์ที่จะเข้าไปแทนที่หมู่ tosyl บนไคโตซาน และมีหมู่ไทออล (-SH) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ คือจะไปเกิดพันธะไดซัลไฟด์กับมีวคัสไกลโคโปรตีน ทำให้จับกับเซลล์ได้ดีเนื่องจากเกิดการยึดติดแบบเยื่อเมือก ดังนั้นจึงคาดว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้น่าจะเป็น AMB-Ly-chitosan ที่จะช่วยนำส่งยาเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้นตามรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ AMB-Ly-chitosan

จากการทดลอง ชั่ง Ts-Ly-chitosan 0.5000 กรัม ละลายใน 1% v/v acetic acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตรได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน จากนั้นทำปฏิกิริยากับ AMB 0.5001 g ที่ละลายในตัวทำละลาย DMF ปริมาตร 6.5 มิลลิลิตร (สารละลายสีเหลือง) ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน หลังจากหยุดปฏิกิริยาจะได้สารละลายสีน้ำตาลดำ และทำการตกตะกอนในสถานะที่เป็นเบส โดยค่อยๆหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 M เนื่องจากโคโตซานมีค่า pKa ประมาณ 6.4 ดังนั้นในสถานะที่ $\text{pH} > 6.4$ โคโตซานจะตกตะกอน หลังจากนั้นจะเติมแอสิตอนให้มีปริมาณมากเกินไปเพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ นำไปกรองและไดอะไลซิสในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 1 วัน ระหว่างการไดอะไลซิสพบว่าน้ำเปลี่ยนเป็นสีเหลือง คาดว่า AMB บางส่วนไม่เกิดปฏิกิริยากับโคโตซาน สุดท้ายนำสารที่สังเคราะห์ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C ได้เป็นแผ่นฟิล์มขนาดเล็กๆสีดำดังรูปที่ 3.13 น้ำหนัก 0.3148 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 69.0



รูปที่ 3.13 สาร AMB-Ly-chitosan

3.3.1 การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$

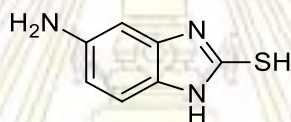
จาก $^1\text{H NMR}$ ของ Ts-Ly-chitosan ที่ดัดแปลงกับ AMB ดังรูปที่ 3.5 (d) พบว่าสัญญาณโปรตอนคล้ายกับสัญญาณโปรตอนของโคโตซานที่ไม่ได้ดัดแปลง และไม่พบพิกสัญญาณของหมู่ tosyl ที่ δ (ppm) ประมาณ 7.43 และ 7.10 ซึ่งเป็นพิกของโปรตอนในวงแอรอมาติก และพิกที่ δ (ppm) = 2.13 แสดงสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิลที่ตำแหน่งปลายของหมู่ tosyl ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าหมู่ tosyl หลุดออกไปจริง ส่วนพิกสัญญาณของ AMB พบที่ δ (ppm) = 8.11 แสดงโปรตอนของวงแอรอมาติก ซึ่งปรากฏให้เห็นไม่ชัดเจน ทั้งนี้คาดว่าสาร AMB ที่เกิดปฏิกิริยากับโคโตซานมีปริมาณน้อยมาก พิกของ AMB จึงถูกกลบด้วยพิกสัญญาณของโคโตซาน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่า AMB เกิดพันธะกับโคโตซานได้จริงจึงทำการทดสอบเพื่อหาปริมาณหมู่ไทเออลซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อ 3.3.4

เมื่อทำการคำนวณอัตราส่วน integration ของโปรตอนของหมู่แอมิโน ($-\text{NH}_2$) ต่อโปรตอนของ N-acetylglucosamine (HN-COCH_3) เพื่อเป็นการยืนยันว่า lycorine ยังคงเกิดพันธะกับหมู่แอมิโน

ของไคโตซานหรือไม่ พบว่าอัตราส่วน integration ของ Ts-Ly-chitosan ที่ดัดแปลงกับ AMB เท่ากับ อัตราส่วน integration ของ Ts-Ly-chitosan ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.31 แสดงว่าพันธะระหว่าง lycorine และไคโตซานยังคงอยู่

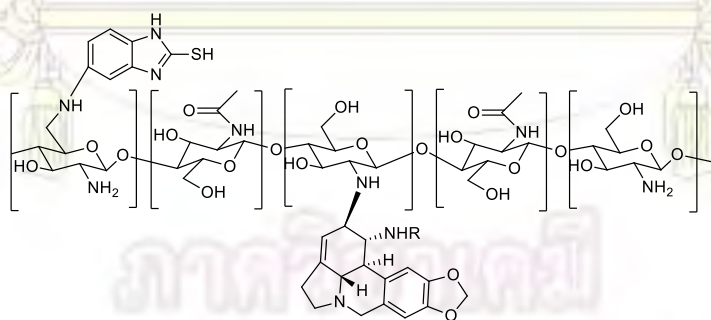
ดังนั้นจาก ^1H NMR การทำปฏิกิริยาระหว่าง Ts-Ly-chitosan กับ AMB ได้ผลิตภัณฑ์เป็น AMB-Ly-chitosan ซึ่งหมู่ tosyl หลุดออกจากโครงสร้างของไคโตซาน

3.3.2 การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค FT-IR



รูปที่ 3.14 โครงสร้าง 5-Amino-2-mercaptobenzimidazole (AMB)

พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.10 (c) ของ AMB พบว่ามีการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่น ที่ 3368 cm^{-1} พิกมีลักษณะแหลมแสดงสัญญาณของ N-H stretching พิกที่ 3194 cm^{-1} เป็นพิกสัญญาณของ C-H stretching ของแอลโรมาติก พิกที่ 1639 cm^{-1} และ 1620 cm^{-1} เป็นพิกสัญญาณของ C=C stretching นอกจากนั้นพิกที่ 1493 cm^{-1} และ 1469 cm^{-1} เป็นพิกสัญญาณของวงแอลโรมาติก และพิกที่สำคัญที่แสดงถึงหมู่ไทออล (-SH) ปรากฏที่ 2586 cm^{-1} ซึ่งเป็นสัญญาณแบบอ่อน



รูปที่ 3.15 โครงสร้าง AMB-Ly-chitosan

พิจารณา IR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ts-Ly-chitosan กับ AMB คือ AMB-Ly-chitosan ตามรูปที่ 3.10 (f) พบพิกสัญญาณเข้มและแหลมที่ 3443 cm^{-1} ซึ่งเกิดการดูดกลืนรังสีเนื่องจาก O-H stretching และ N-H stretching ของไคโตซาน และอาจเกิดการซ้อนทับ

กับพีค N-H stretching ของ AMB พีคที่ 1639 cm^{-1} แสดงสัญญาณของ C=O stretching ของหมู่เอไมด์ และจะเห็นได้ว่าพีคแสดงสัญญาณ C-O stretching เกิดการ shift จาก 1097 cm^{-1} กลับมาเป็น 1083 cm^{-1} ซึ่งเหมือนกับไคโตซานก่อนที่เกิดพันธะกับหมู่ tosyl แสดงว่าหมู่ tosyl หลุดออกไป และพบพีคใหม่ที่ 1464 cm^{-1} ซึ่งตรงกับพีคสัญญาณของวงแอโรมาติกของสาร AMB แต่พีคมีสัญญาณอ่อนเนื่องจากเกิดการซ้อนทับกับสัญญาณของไคโตซาน

3.3.3 การตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของสารโดยใช้เทคนิค TGA

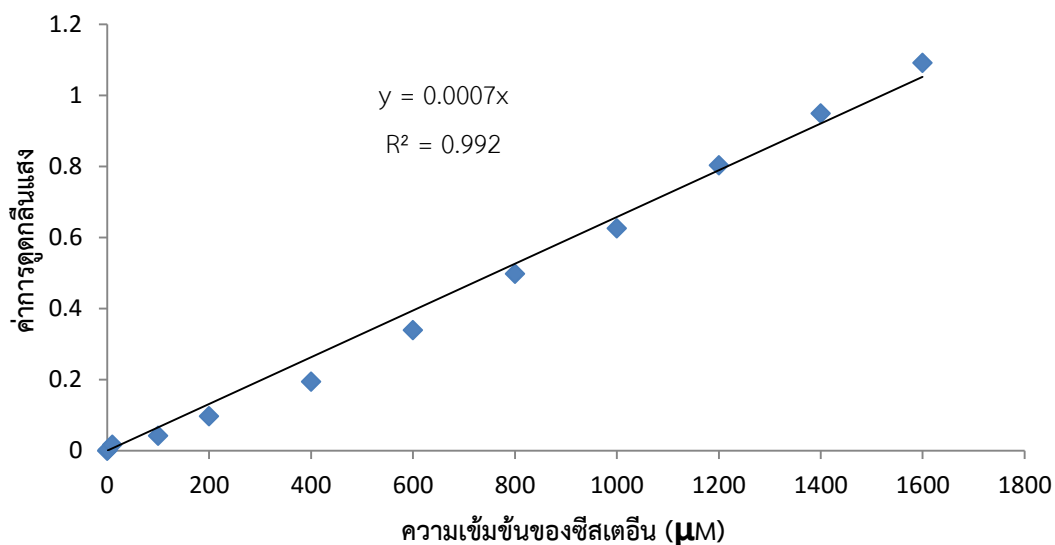
การทดสอบความเสถียรทางความร้อนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ts-Ly-chitosan และ AMB แสดงผลด้วย Thermogravimetric Curve และ Differential Thermal Analysis (DTA) จากกราฟ DTA รูปที่ 3.11 (c) พบว่าสารสลายตัวที่อุณหภูมิ 325°C ซึ่งมากกว่าการสลายตัวของสารตั้งต้นคือ Ts-Ly-chitosan ถึง 86°C แสดงว่าสารมีความเสถียรทางความร้อนที่สูงขึ้นเนื่องจากเกิดการหลุดออกของหมู่ tosyl ทำให้การจัดเรียงตัวของโครงสร้างผลึกไคโตซานเป็นระเบียบมากขึ้น และเมื่อพิจารณาเทียบกับไคโตซานบริสุทธิ์ (สลายตัวที่อุณหภูมิ 327°C) พบว่าความเสถียรทางความร้อนลดลงเล็กน้อย เพราะ AMB และ lycorine เกิดพันธะกับไคโตซานในปริมาณที่น้อยมาก จึงทำให้การจัดเรียงโครงสร้างผลึกของ AMB-Ly-chitosan เหมือนกับไคโตซานที่ไม่ได้ดัดแปลง

3.3.4 การหาปริมาณหมู่ไทออล

สาร AMB มีหมู่ไทออล (-SH) เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการทดสอบเพื่อหาปริมาณหมู่ไทออลของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จึงใช้ยืนยันได้ว่าสาร AMB เกิดพันธะกับไคโตซานได้จริงหรือไม่

การหาปริมาณหมู่ไทออลทำได้โดยใช้ Ellman's reagent ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไทออลและได้ผลิตภัณฑ์เป็น TNB^{2-} ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรได้ และปริมาณไทออลจะแปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-}

สร้างกราฟมาตรฐานของซิสเตอีน (cystein) รูปที่ 3.16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซิสเตอีน (μM) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานซิสเตอีนที่ความเข้มข้น 1600, 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 10, 1 และ $0.1\ \mu\text{M}$



รูปที่ 3.16 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายซีสเทอีนที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 3.3 ค่าการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-} และความเข้มข้นหมู่ไทออล ($\mu\text{M}/\text{mg}$) ของ blank, chitosan และ AMB-Ly-chitosan

สาร	ค่าการดูดกลืนแสง					ค่าการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-}	ความเข้มข้นหมู่ไทออล ($\mu\text{M}/\text{mg}$)
	1	2	3	4	เฉลี่ย		
blank	0.071	0.070	0.072	0.071	0.071	0	0
Chitosan	0.060	0.058	0.058	0.060	0.059	-0.012	-17.143
AMB-Ly-chitosan	0.077	0.076	0.076	0.077	0.077	0.005	7.857

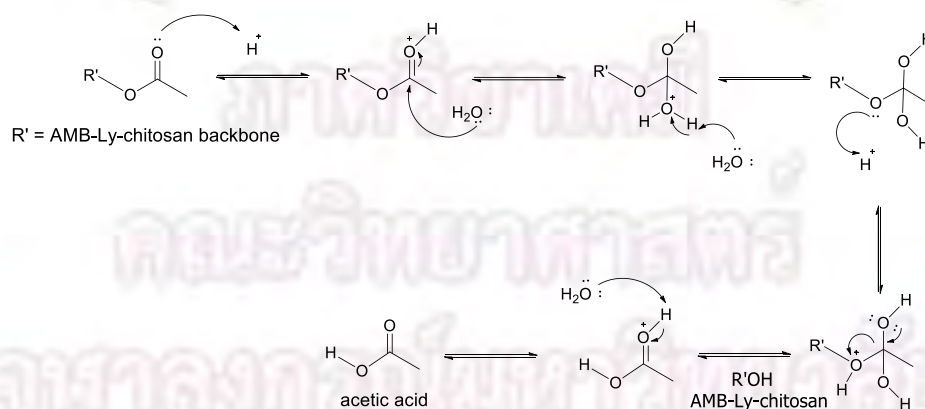
จากกราฟมาตรฐานของซีสเทอีนได้สมการเส้นตรง $y = 0.0007x$ มีค่า $R^2 = 0.992$ ต่อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของ blank chitosan และ AMB-Ly-chitosan ซึ่งชั่งสารตัวอย่างแต่ละชนิดมา 3.5 มิลลิกรัม ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 3.1 แต่เนื่องจากว่า blank เป็นสารละลายสีเหลืองอ่อนจึงสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่สัมพันธ์กับปริมาณไทออลที่แท้จริง คือค่าการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-} ซึ่งหาได้จากสมการ

ค่าการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-} = ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารตัวอย่าง - ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

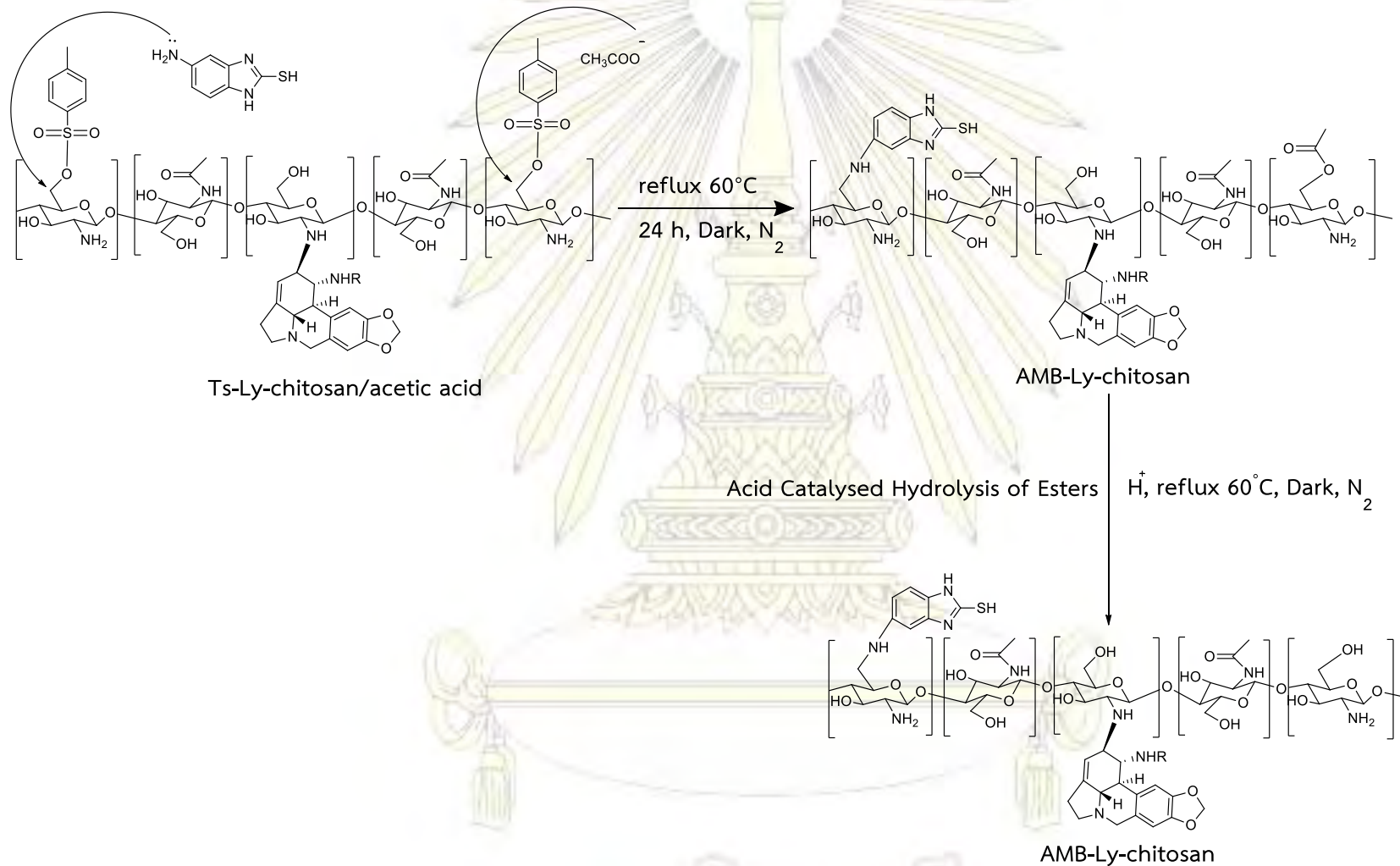
หลังจากคำนวณแล้วได้ค่าการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-} ของ chitosan เท่ากับ -0.012 แสดงว่า chitosan ไม่มีหมู่ไทออลเพราะไม่ดูดกลืนแสง แต่ AMB-Ly-chitosan มีหมู่ไทออลเนื่องจากเกิดการดูดกลืนแสงของ TNB^{2-} และมีค่าเท่ากับ 0.005 จากนั้นนำค่านี้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานซีสตันเพื่อคำนวณความเข้มข้นของหมู่ไทออล (μM) พบว่ามีความเข้มข้นของหมู่ไทออลเท่ากับ $7.857 \mu\text{M}$ ต่อสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร หรือมีปริมาณหมู่ไทออลเท่ากับ $2.2 \mu\text{mol/g}$ ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ts-Ly-chitosan กับ AMB คือ มี AMB เกิดพันธะกับไคโตซานจริงแต่มีในปริมาณที่น้อยมาก

สาเหตุที่คาดว่าส่งผลให้ AMB เกิดปฏิกิริยาแทนที่หมู่ tosyl แล้วเกิดพันธะกับไคโตซานได้น้อย เนื่องจาก Ts-Ly-chitosan ละลายใน 1% v/v acetic acid ทำให้ในปฏิกิริยามีหมู่แอซิเตต (CH_3COO^-) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไฟล์เช่นเดียวกันจึงทำให้ไปแข่งขันกับ AMB ในการเกิดปฏิกิริยาแทนที่หมู่ tosyl รูปที่ 3.18 อีกทั้งขนาดของหมู่แอซิเตตมีขนาดเล็กกว่าและมีปริมาณมากกว่าจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาแทนที่ได้ดีกว่า AMB

การเกิดปฏิกิริยาแทนที่หมู่ tosyl ของหมู่แอมิโนและแอซิเตต ดังรูปที่ 3.18 เมื่อหมู่แอซิเตตไปแทนที่หมู่ tosyl จะเกิดพันธะเอสเทอร์ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซิสด้วยการใช้กรดเจือจาง (1% v/v acetic acid) และความร้อน (ที่อุณหภูมิ 60°C) ซึ่งจะช่วยให้สมดุลมาข้างหน้า แสดงกลไกดังรูปที่ 3.17 ได้ ผลิตภัณฑ์กลับมาเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และ acetic acid ทั้งนี้จากสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ AMB-Ly-chitosan จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ของหมู่ tosyl โดยหมู่แอซิเตตได้ ดังนั้นหมู่ AMB จึงเกิดการแทนที่หมู่ tosyl ได้น้อย



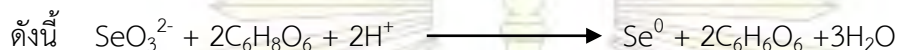
รูปที่ 3.17 แผนภาพแสดงกลไก Acid catalysed hydrolysis of esters



รูปที่ 3.18 แผนภาพแสดงการเกิดการแข่งขันแทนที่หมู่ tosyl ด้วยหมู่เอมีโนของสาร AMB และหมู่เอซิติเตดจากกรดเอซิติคแอซิด

3.4 สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์

การสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนของซีลีเนียมเพื่อให้นำส่ง lycorine ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งเข้าสู่เซลล์มะเร็ง สามารถสังเคราะห์ได้โดยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของโซเดียมซีลีไนด์และกรดแอสคอร์บิก โดยโซเดียมซีลีไนด์ (Se^{4+}) เป็นสารละลายใสไม่มีสีจะถูกรีดิวซ์ด้วยกรดแอสคอร์บิกได้เป็นอนุภาคระดับนาโนของซีลีเนียม (Se^0) ซึ่งเป็นสารละลายสีส้ม



แต่อนุภาคระดับนาโนมีความเสถียรต่ำจะรวมกันเป็นขนาดใหญ่ขึ้นได้อย่างรวดเร็วเนื่องจากพลังงานที่พื้นผิวสูง ดังนั้นจึงต้องมี stabilizer เพื่อช่วยเพิ่มเสถียรภาพและรักษาขนาดของอนุภาคให้อยู่ในระดับนาโนเมตร ในงานวิจัยนี้ stabilizer ที่ใช้คือ Ts-Ly-chitosan และ AMB-Ly-chitosan และทำการสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ต่างๆ ดังนี้ Ts-Ly-chitosan ใช้ความเข้มข้นที่ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ AMB-Ly-chitosan ใช้ความเข้มข้นที่ 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan แล้วพบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดซึ่งจะกล่าวต่อในหัวข้อที่ 3.5

หลังจากสังเคราะห์อนุภาคขนาดระดับนาโนของซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan และ AMB-Ly-chitosan จะทำการศึกษาขนาด ประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาค และศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคด้วยเทคนิคดังต่อไปนี้

3.4.1 การตรวจสอบขนาดและประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยใช้เทคนิค

Dynamic Light Scattering (DLS) และ Electrophoretic Light Scattering

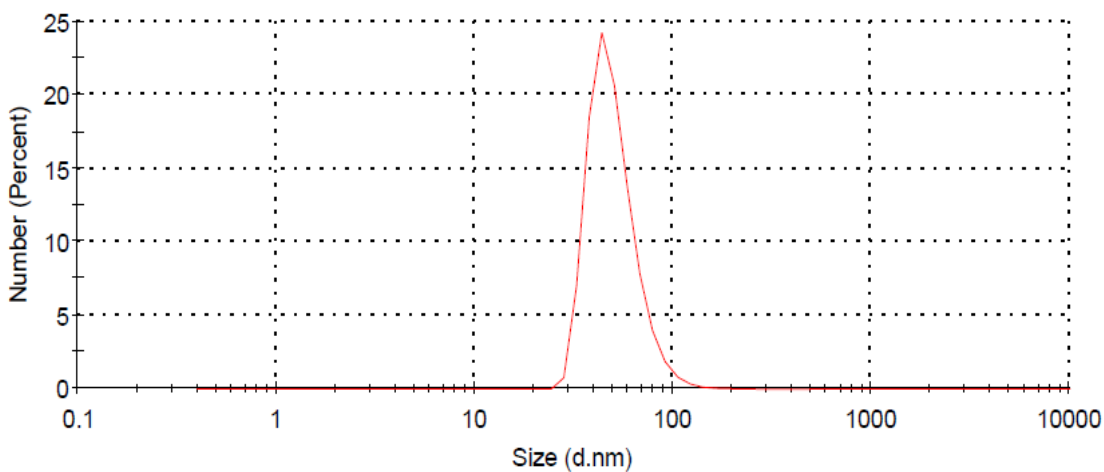
การศึกษาขนาดและประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาคจะตรวจสอบเฉพาะอนุภาคนาโนซีลีเนียม (SeNPs) ที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด

ค่าปัจจัยต่างๆของระบบตอนทำการวิเคราะห์มีค่าดังนี้

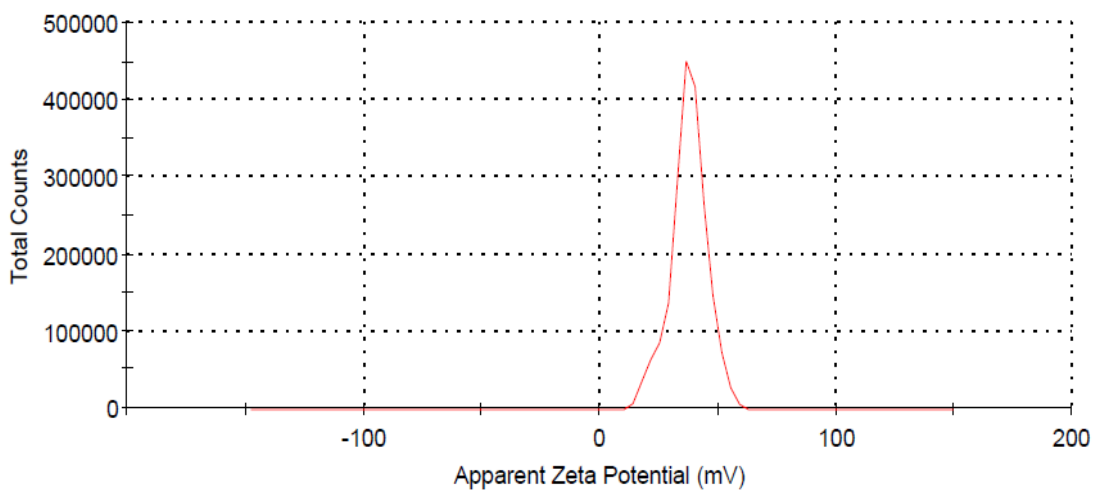
- ตัวทำละลาย: น้ำปราศจากไอออน
- Viscosity (cP): 0.8872 ได้ผลการทดลองดังนี้
- อุณหภูมิ: 25°C
- เวลาที่ใช้ในการวัด: 60 วินาที

1.) Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- ขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 83.92 ± 15.11 nm รูปที่ 3.19
- ประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียม (zeta potential) เฉลี่ยเท่ากับ $+37.6 \pm 7.77$ mV รูปที่ 3.20



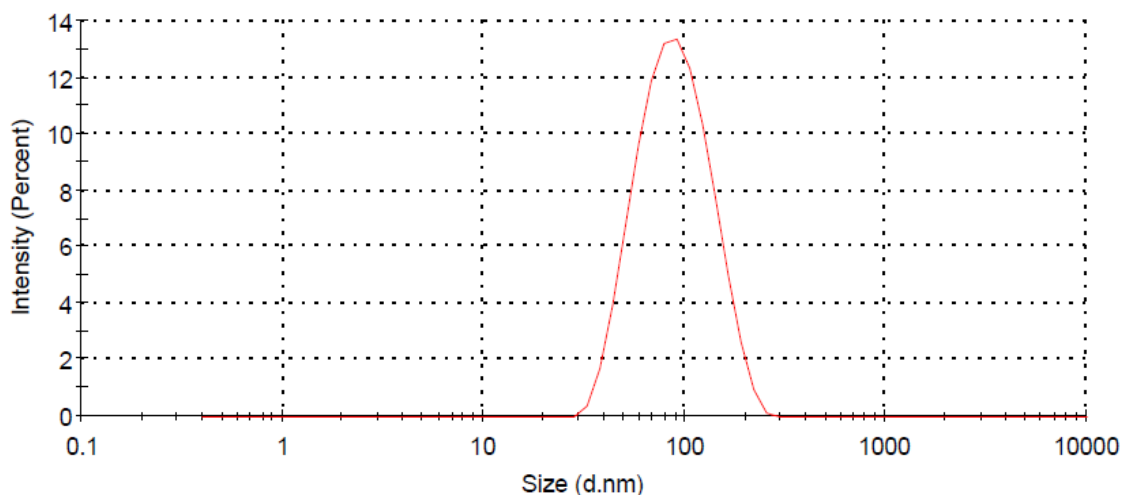
รูปที่ 3.19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (nm) กับ จำนวนอนุภาค (percent)



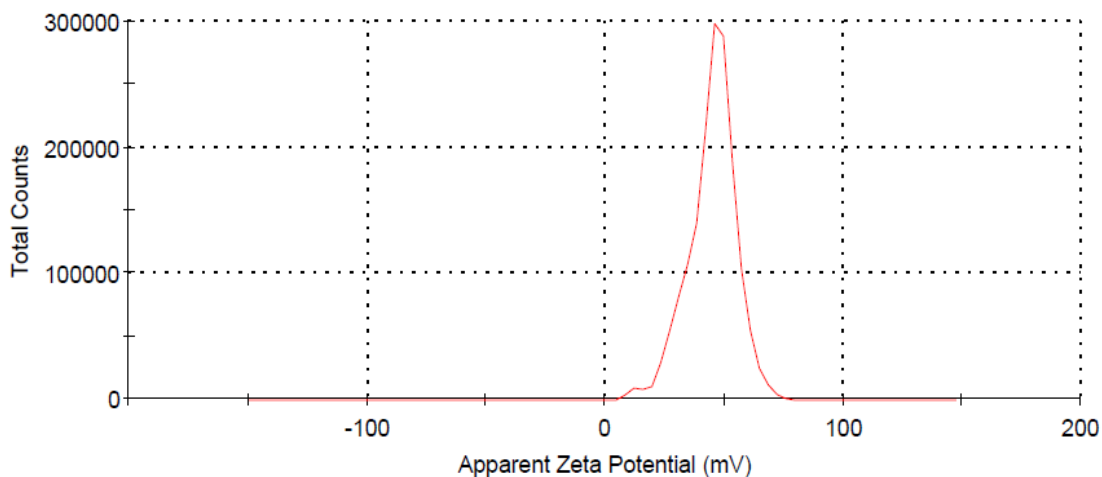
รูปที่ 3.20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง apparent zeta potential (mV) กับ total counts ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.) Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- ขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 80.31 ± 38.50 nm รูปที่ 3.21
- ประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียม (zeta potential) เฉลี่ยเท่ากับ $+44.9 \pm 9.65$ mV รูปที่ 3.22



รูปที่ 3.21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (nm) กับ จำนวนอนุภาค (percent)



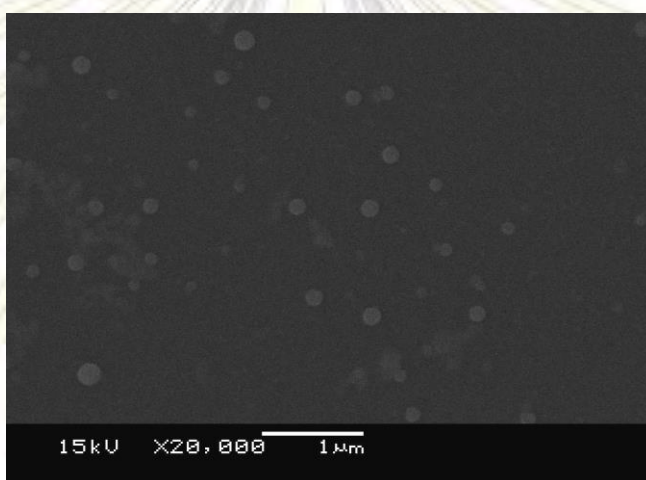
รูปที่ 3.22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง apparent zeta potential (mV) กับ total counts อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลอง อนุภาคนาโนของซีลีเนียมที่ 2 ความเข้มข้นของ Ts-Ly-chitosan มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 80 นาโนเมตร และมีความเป็นประจุบวกที่ผิวของอนุภาคสูงกว่า 30 mV แสดงให้เห็นว่าอนุภาคมีความเสถียรสูงเนื่องจากแต่ละอนุภาคจะเกิดแรงผลักระหว่างประจุบวก

3.4.2 การศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)

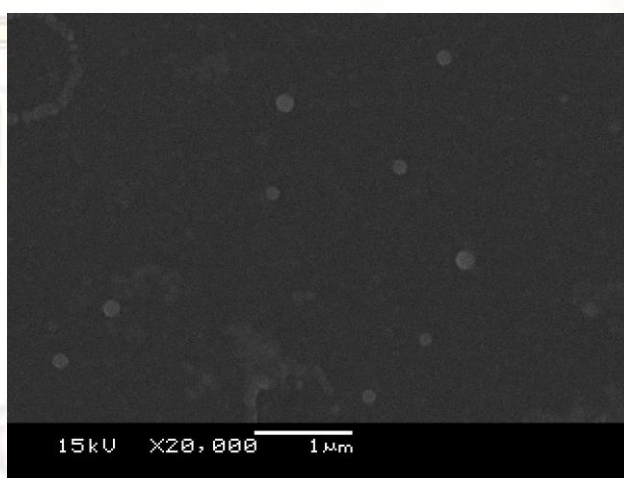
จากการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) จะให้ภาพของอนุภาคที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ดังนี้

1. อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.1 mg/mL)



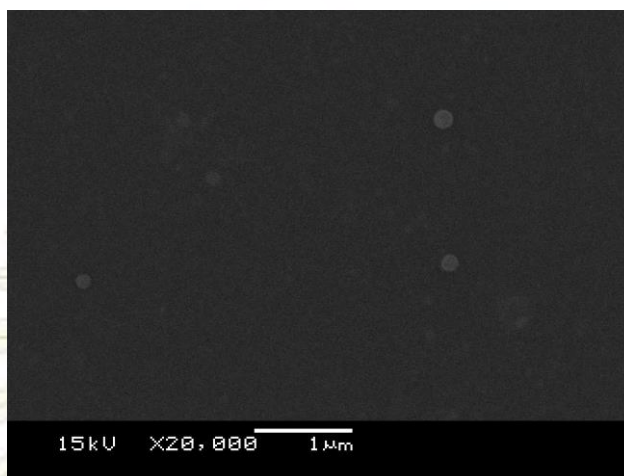
รูปที่ 3.23 ภาพ SEM ของ อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.1 mg/mL)

2. อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.3 mg/mL)



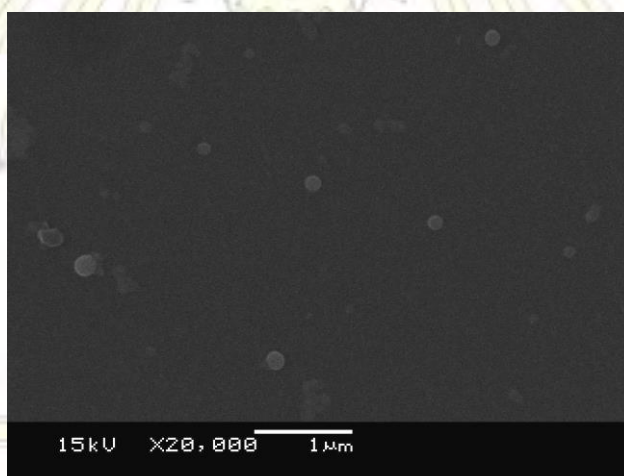
รูปที่ 3.24 ภาพ SEM ของ อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.3 mg/mL)

3. อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.5 mg/mL)



รูปที่ 3.25 ภาพ SEM ของ อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.5 mg/mL)

4. อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.7 mg/mL)



รูปที่ 3.26 ภาพ SEM ของ อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (0.7 mg/mL)

จากภาพของ SEM จะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นต่ำคือ 0.1 mg/mL (รูปที่ 3.23) และ 0.3 mg/mL (รูปที่ 3.24) พบว่าขนาดของอนุภาคไม่ค่อนคงที่มีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ อีกทั้งอนุภาคยังอยู่ใกล้กันแสดงว่าการกระจายหรือความเสถียรของอนุภาคไม่ดีเท่าที่ควรเพราะมีโอกาสที่อนุภาคจะเกิดการรวมกลุ่มกลายเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้นได้ง่าย แต่ขณะที่เมื่อความเข้มข้นของ Ts-Ly-chitosan เพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.5 mg/mL (รูปที่ 3.25) และ 0.7 mg/mL (รูปที่ 3.26) จะพบว่าขนาดอนุภาคมีความใกล้เคียงกันมากกว่า และยังอยู่กระจายกันหรือมีความเสถียรที่สูงขึ้น

3.5 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ใช้วิธี MTT assay เพื่อแสดงผลเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับสารตัวอย่าง และสามารถบอกความเป็นพิษของสารตัวอย่างด้วยค่า IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% ซึ่งวิธีนี้จะอาศัยลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่มีชีวิต คือเซลล์ที่มีชีวิตสามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ไปรีดิวซ์ MTT ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง ให้เปลี่ยนเป็น formazan ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีม่วงทำให้มีความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับยา}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่รับยา}} \times 100$$

การทดลองนี้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย chitosan, Ts-Ly-chitosan และ AMB-Ly-chitosan โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชั้น ดังนี้

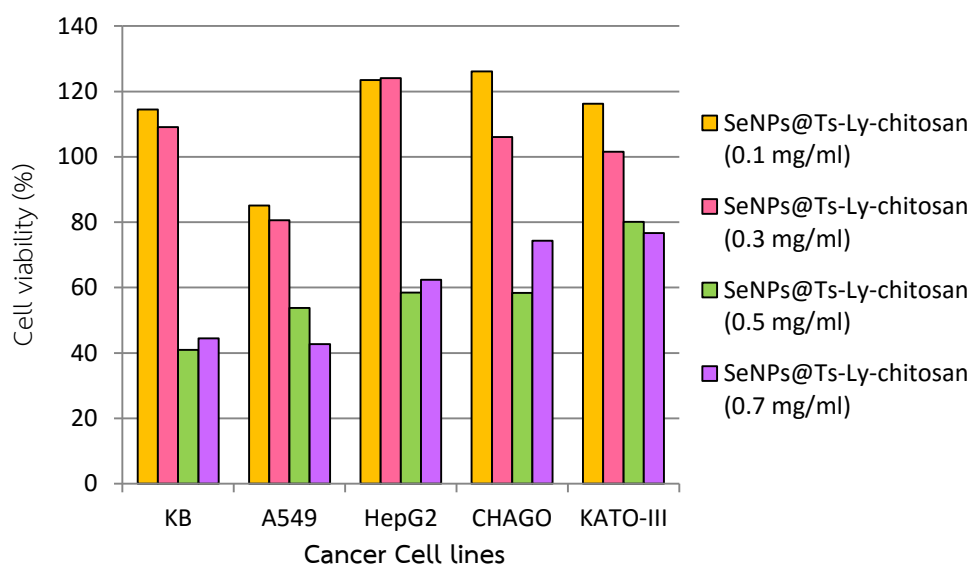
3.5.1 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

เป็นการทดลองเพื่อศึกษาว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียร Ts-Ly-chitosan และ AMB-Ly-chitosan มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งชนิดใด

1) ผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียร Ts-Ly-chitosan ความเข้มข้น 10 μM

โดยจะทดสอบกับเซลล์ 5 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) จากกราฟ รูปที่ 3.27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์กับชนิดของเซลล์มะเร็ง พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 0.5 และ 0.7 mg/mL มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดโดยเฉพาะกับเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (A549) มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ประมาณ 40% เนื่องจากพอลิเมอร์มีหน้าที่เป็น stabilizer คือช่วยคงขนาดของอนุภาคให้อยู่ในระดับนาโนเมตร โดยอาศัยความเกาะกัของสายพอลิเมอร์ที่ไปล้อมรอบอนุภาค อีกทั้งโคโคโตซาน

มีประจวบทำให้เกิดแรงผลักระหว่างอนุภาคที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซาน ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์ให้สูงขึ้น (0.5 และ 0.7 mg/mL) จะช่วยให้อนุภาคระดับนาโนมีความเสถียรเพิ่มมากขึ้นและมีขนาดของอนุภาคที่พอเหมาะต่อการเข้าสู่เซลล์

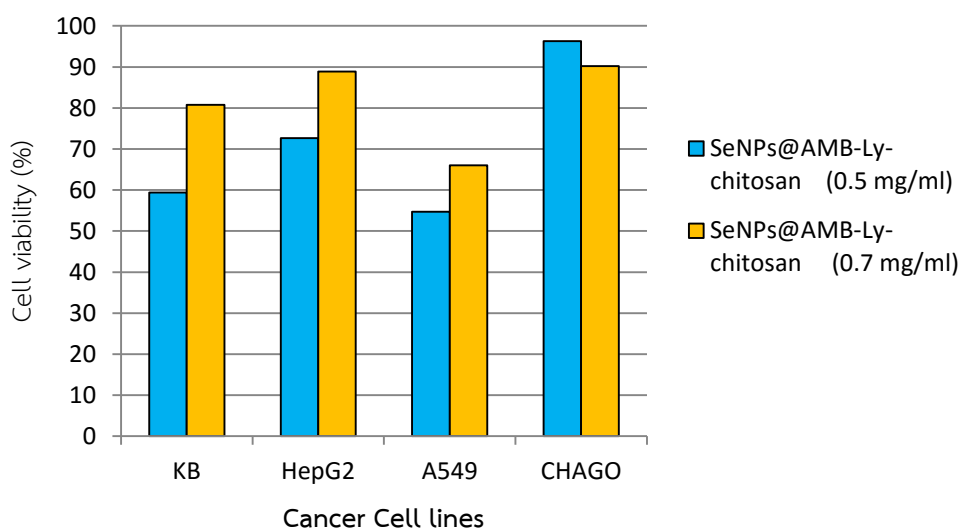


รูปที่ 3.27 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียร Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด (KB, A549, HepG2, CHAGO, KATO-II)

1.2) ผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย AMB-Ly-chitosan ความเข้มข้น 10 μ M

โดยจะทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย AMB-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 0.5 และ 0.7 mg/mL เท่านั้น เนื่องจากผลของการทดลองขั้น 1.1) พบว่าความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 0.5 และ 0.7 mg/mL มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มากที่สุด และทดสอบกับเซลล์ 4 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) จากกราฟ รูปที่ 3.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์กับชนิดของเซลล์มะเร็ง พบว่า อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย AMB-Ly-chitosan มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งไม่ค่อยดี มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ประมาณ 50%-60% ทั้งนี้ จากผลการทดลองหาปริมาณหมู่ไทอลด้วย Ellman's reagent พบว่า มีปริมาณหมู่ไทอลประมาณ 2.2 ไมโครโมลต่อ 1 กรัม AMB-Ly-chitosan ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณที่

น้อยมาก ดังนั้นฤทธิ์ทางชีวภาพของหมู่ไทออลจึงไม่แสดงผล แต่ Ts-Ly-chitosan ให้ผลที่ดีกว่าเนื่องจากอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan มีหมู่ tosyl และ lycorine ซึ่งเป็น hydrophobic ทำให้เข้ากันได้กับเยื่อหุ้มเซลล์และสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น และโครงสร้างที่แบนราบและมีวงแอโรมาติกของ lycorine และหมู่ tosyl จะเข้าไปแทรกระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งได้ดี ทำให้มีความเสถียรสูงส่งผลให้โครงสร้างของสายดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิม ดังนั้นจึงช่วยยับยั้งการจำลองตัวเองและกระบวนการถอดรหัส ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการแบ่งตัวและตายในที่สุด อีกทั้งโคโตซานที่มีประจุบวกยังเกิด electrostatic adsorption กับประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าสู่เซลล์ผ่านวิธี endocytosis ได้



รูปที่ 3.28 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียร AMB-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด (KB, A549, HepG2, CHAGO)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่มีความเข้มข้นพอลิเมอร์เท่ากับ 0.5 และ 0.7 mg/mL มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (A549) ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ดังนั้นในขั้น 2) จึงทดสอบเพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (IC_{50})

3.5.2 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและแสดงผลด้วยค่า IC₅₀

ศึกษาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (A549) ผลการทดลองพบว่าค่า IC₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (ความเข้มข้นพอลิเมอร์เท่ากับ 0.5 และ 0.7 mg/mL) มีค่าดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.4 ค่า IC₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan และ doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (A549)

Tumor cell lines	IC ₅₀ (μM)		
	SeNPs@Ts-Ly-chitosan (0.5 mg/mL)	SeNPS@Ts-Ly-chitosan (0.7 mg/mL)	Doxorubicin
KB	3.907	5.677	0.023
A549	4.561	6.279	0.401

จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ความเข้มข้นพอลิเมอร์เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งในเซลล์เยื่อบุช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (A549) ได้ดีกว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์โดยใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากกราฟแสดงขนาดอนุภาคพบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ความเข้มข้นพอลิเมอร์เท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 80.31 ± 38.50 nm ซึ่งมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมากหรือกล่าวได้ว่าขนาดของอนุภาคระดับนาโนเมตรมีขนาดตั้งแต่ 30-120 นาโนเมตร ซึ่งขนาดที่เล็กเกินไปหรือใหญ่เกินไปก็จะส่งผลทำให้เข้าสู่เซลล์และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่ดีเท่าที่ควร และเมื่อพิจารณาค่า IC₅₀ เทียบกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งคือ Doxorubicin พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้น้อยกว่า แต่อนุภาคที่เราสังเคราะห์ขึ้นคาดว่าจะช่วยลดผลข้างเคียงจากการทำลายเซลล์ปกติได้ดีกว่าเนื่องจากมีขนาดที่เหมาะสมที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งดังนั้นในอนาคตขั้นการสังเคราะห์ Lycorine-chitosan จะต้องใส่ปริมาณ

lycorine ในอัตราส่วนต่อโคโคซานให้มากกว่าเดิมเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

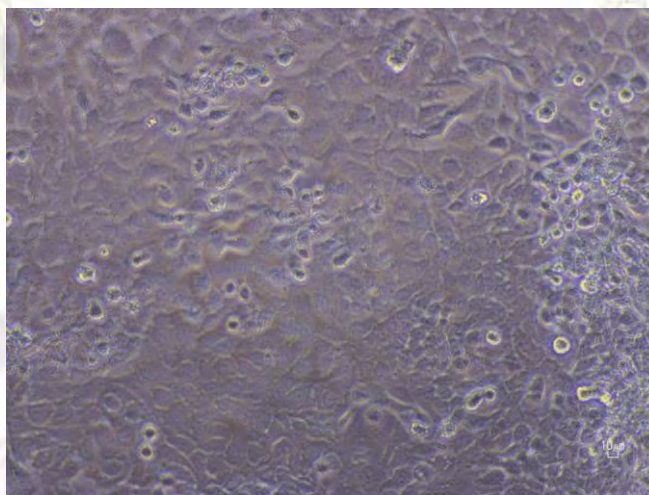
3.5.3 ภาพแสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและการเข้าสู่เซลล์

ศึกษาอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นพอลิเมอร์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น เนื่องจากมีประสิทธิภาพยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (A549) ได้ดีที่สุดในขั้นก่อนที่จะเปิดสาร MTT เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ จะนำเซลล์ที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ความเข้มข้น 200, 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 μM มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค ลักษณะของเซลล์หลังจากได้รับสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง และประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

จะพบว่าใน blank รูปที่ 3.29 ที่ไม่มีอนุภาคนาโนซีลีเนียมเซลล์มะเร็งจะโตขึ้น มีขนาดใหญ่ อยู่ติดๆกัน แต่เมื่อเซลล์ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่มีสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งซึ่งก็คือ lycorine จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้น 200 และ 100 μM เซลล์มะเร็งจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโต มีขนาดเล็ก และฝ่อ อีกทั้งเห็นอนุภาคนาโนซีลีเนียม (จุดสีส้ม) เข้าสู่เซลล์ได้ แต่เมื่อความเข้มข้นลดน้อยลง ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและเข้าสู่เซลล์ก็ลดน้อยลงด้วยจึงทำให้เห็นว่ายังมีเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่เยอะ มีการเติบโตเรียงชิดติดกัน

1. ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB)

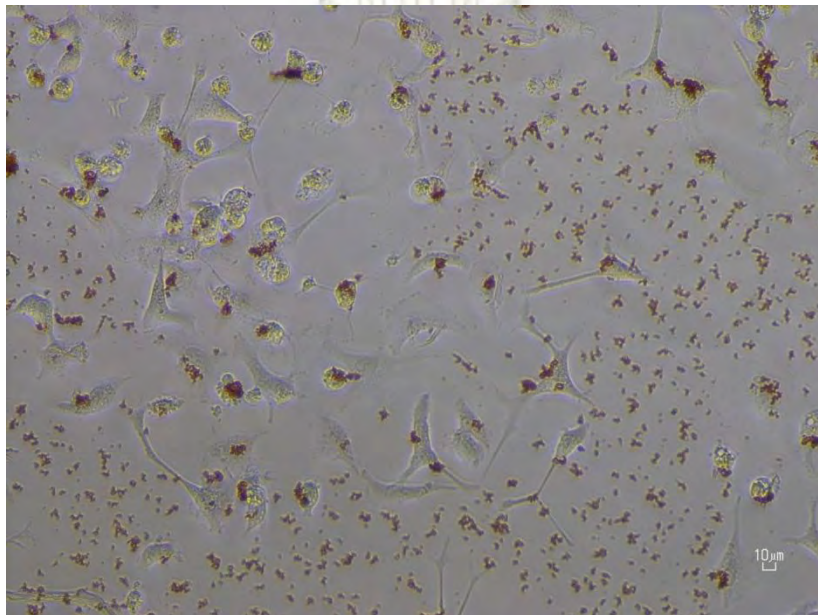
1.1) Blank ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม (blank)



รูปที่ 3.29 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) ที่ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม (blank)

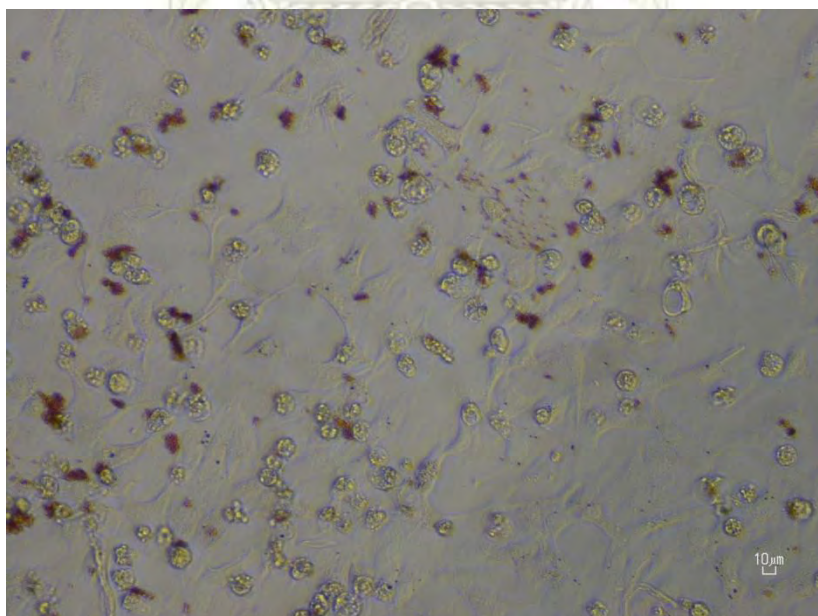
1.2) อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan

1.2.1 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม 200 μM



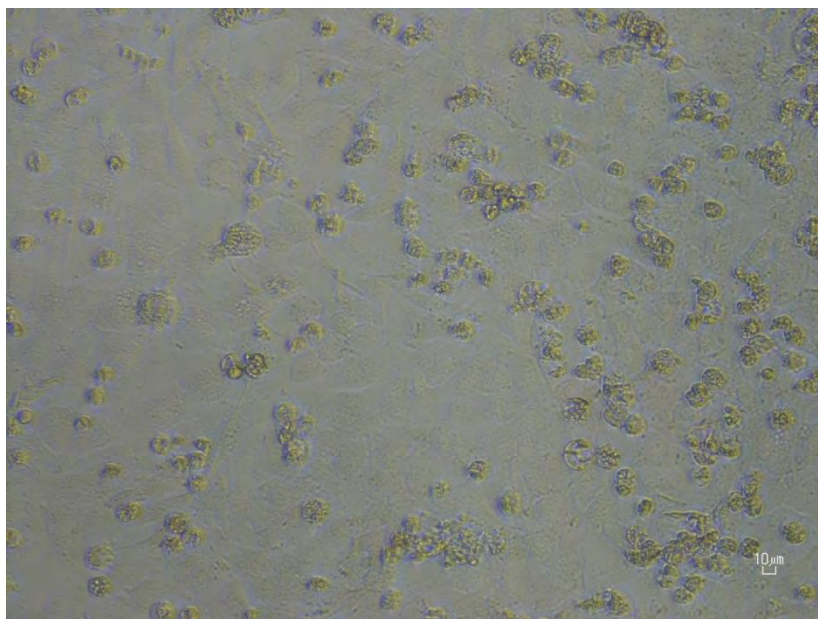
รูปที่ 3.30 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม 200 μM

1.2.2 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม 100 μM



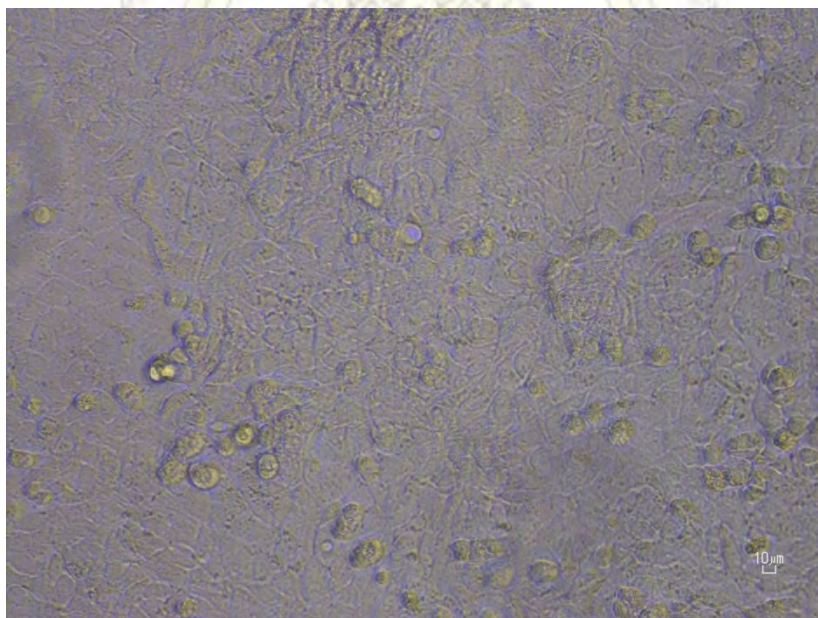
รูปที่ 3.31 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม 100 μM

1.2.3 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลิเนียม 10 μM



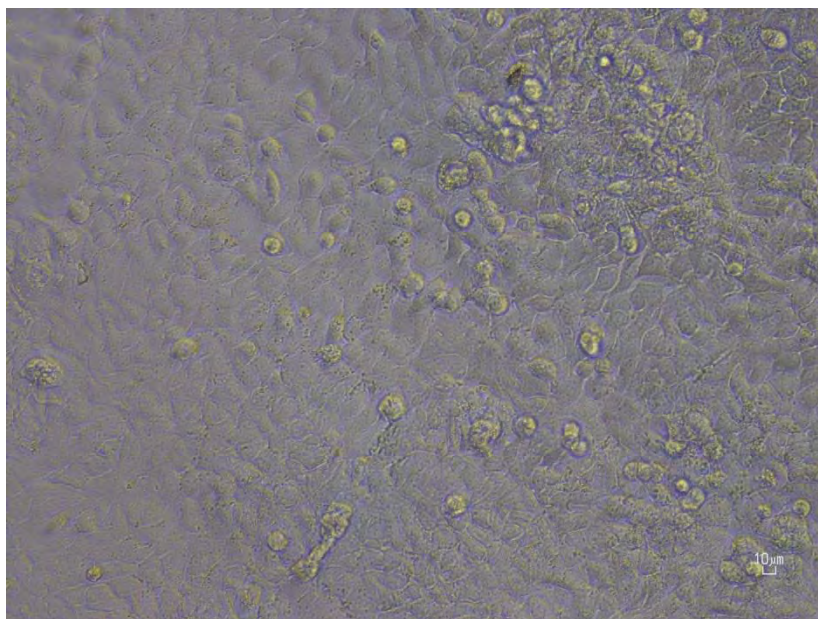
รูปที่ 3.32 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 10 μM

1.2.4 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลิเนียม 1 μM



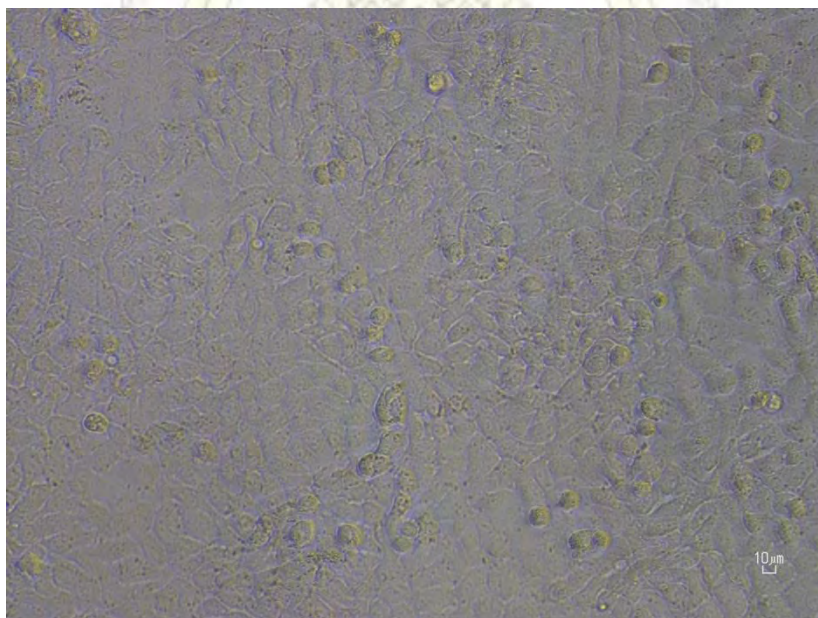
รูปที่ 3.33 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 1 μM

1.2.5 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.1 μM



รูปที่ 3.34 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.1 μM

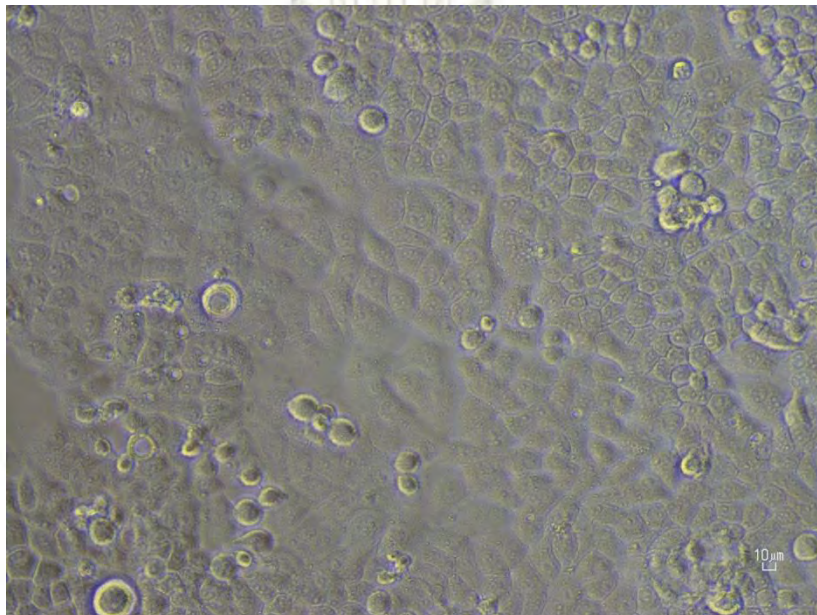
1.2.6 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.01 μM



รูปที่ 3.35 ภาพของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.01 μM

2. ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549)

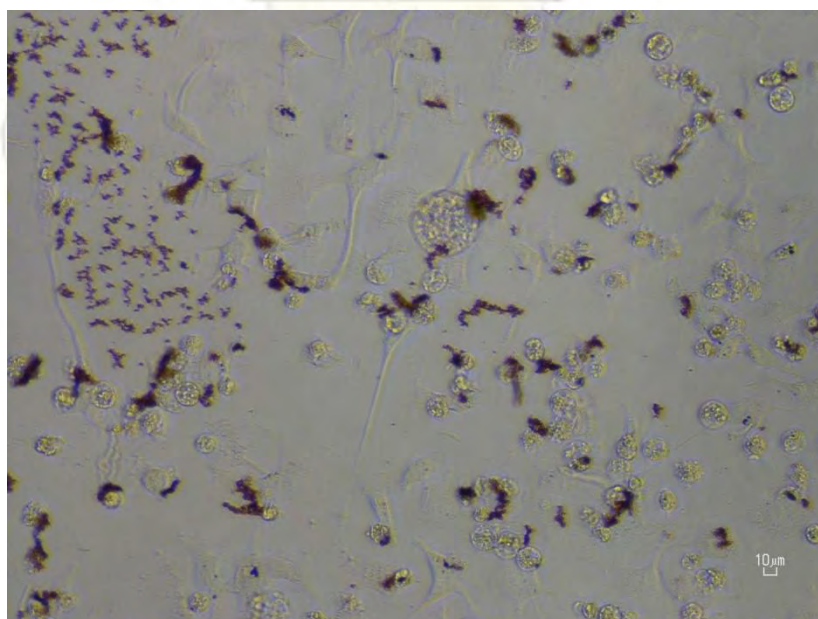
2.1) Blank ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม (blank)



รูปที่ 3.36 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม (blank)

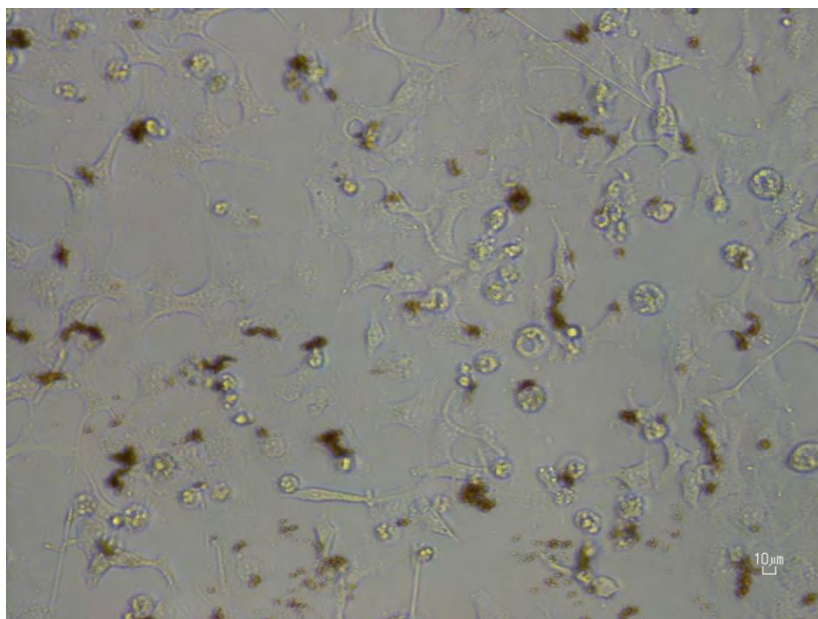
2.2) อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan

2.2.1 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม 200 μM



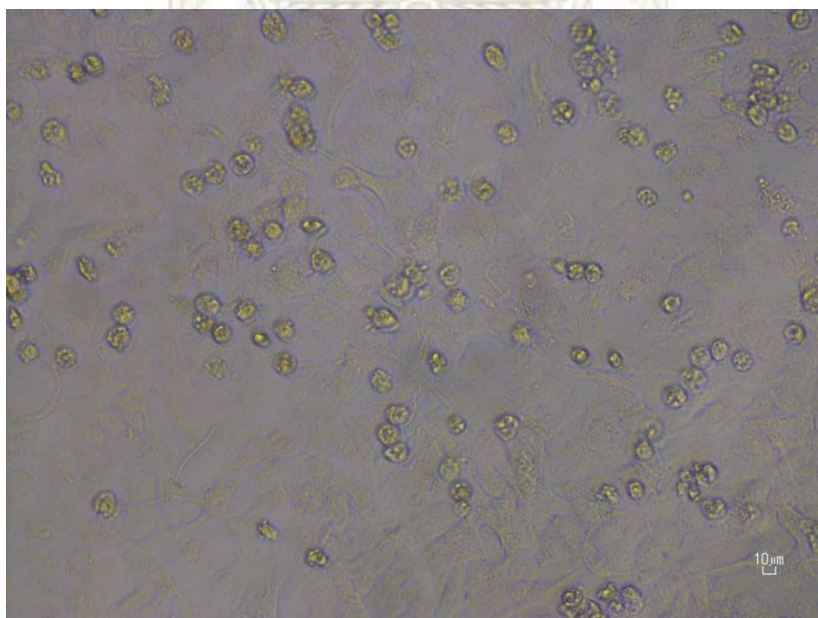
รูปที่ 3.37 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม 200 μM

2.2.2 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม 100 μM



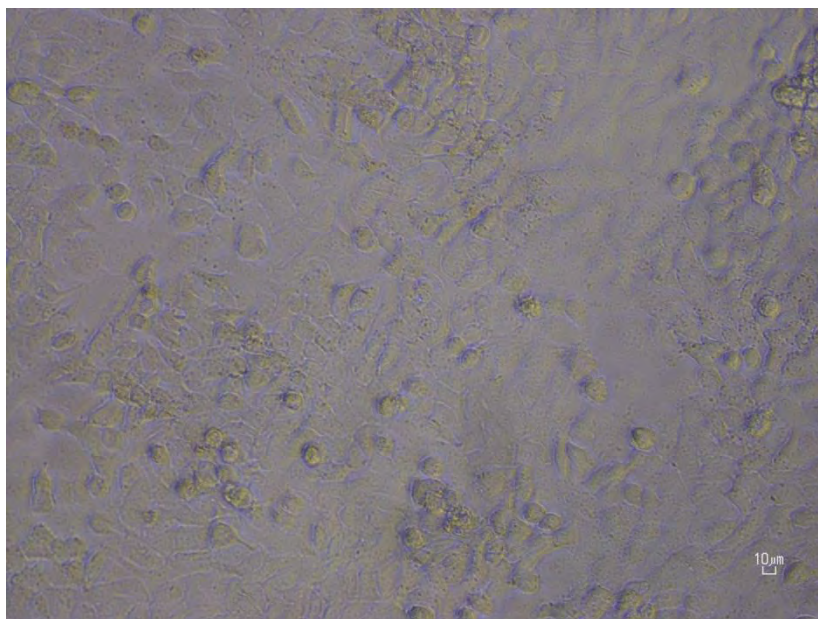
รูปที่ 3.38 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม 100 μM

2.2.3 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม 10 μM



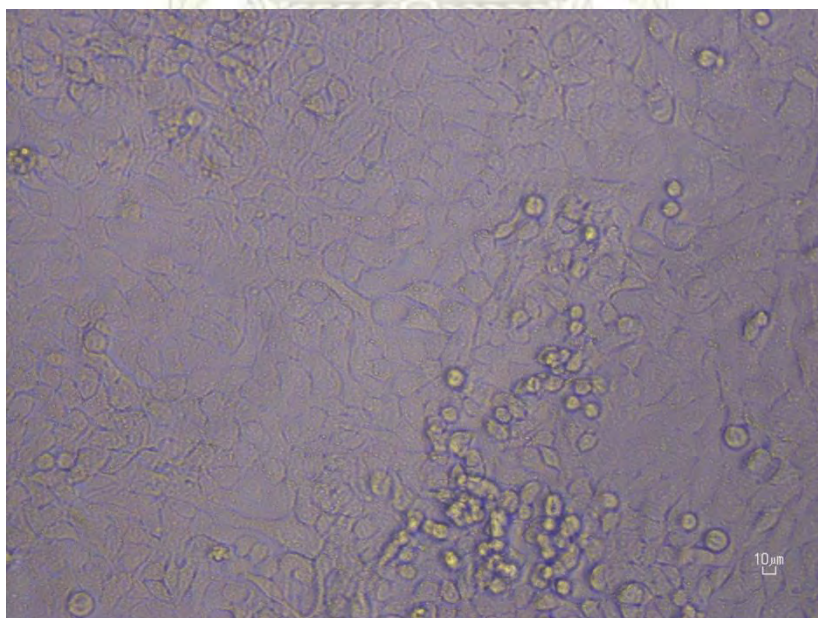
รูปที่ 3.39 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม 10 μM

2.2.4 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม 1 μM



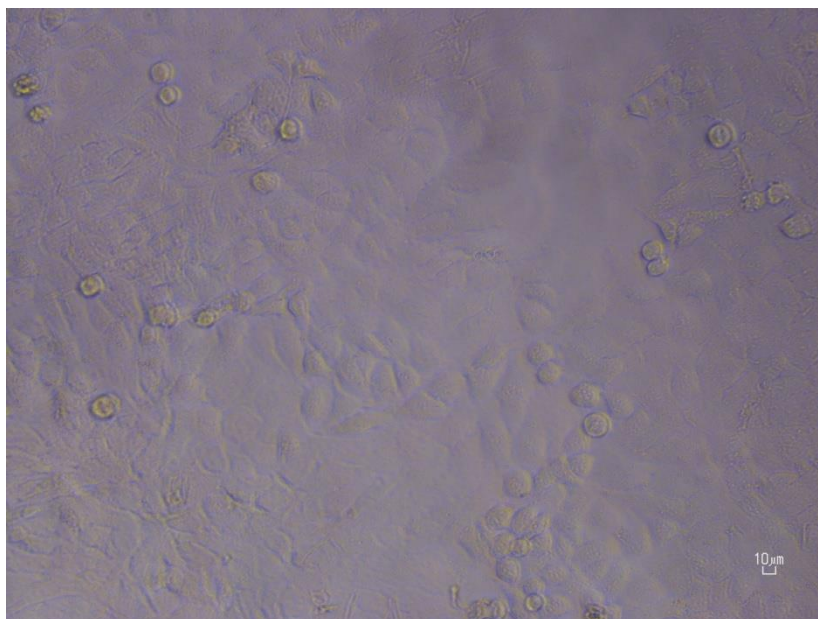
รูปที่ 3.40 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม 1 μM

2.2.5 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม 0.1 μM



รูปที่ 3.41 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียม 0.1 μM

2.2.6 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.01 μM



รูปที่ 3.42 ภาพของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียม 0.01 μM



3.6 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

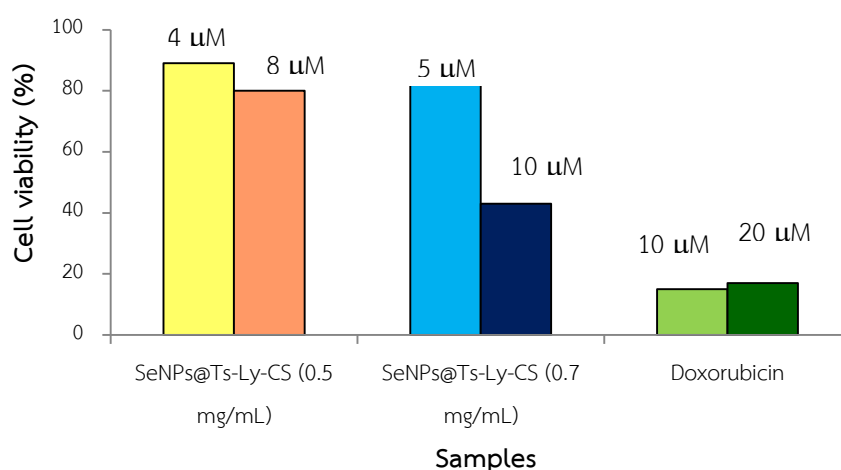
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (WI-38) ของ doxorubicin และอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 0.5 และ 0.7 mg/mL ใช้วิธี MTT assay เช่นเดียวกับการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แสดงผลด้วยกราฟรูปที่ 3.43 ดังนี้

เซลล์ปกติที่ได้รับ doxorubicin ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 μ M และ 20 μ M พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 15 และ 17 ตามลำดับ

เซลล์ปกติที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 0.5 mg/mL) ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเท่ากับ 4 μ M และ 8 μ M พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 89 และ 80 ตามลำดับ

เซลล์ปกติที่ได้รับอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 0.7 mg/mL) ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเท่ากับ 5 μ M และ 10 μ M พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 83 และ 43 ตามลำดับ

จะเห็นว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan นั้นจะทำให้เซลล์ปกติมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่าการใช้ยา doxorubicin ดังนั้นสรุปได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 0.5 และ 0.7 mg/mL มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่ำกว่า doxorubicin เนื่องจาก lycorine เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่ำกว่าการใช้ doxorubicin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัด

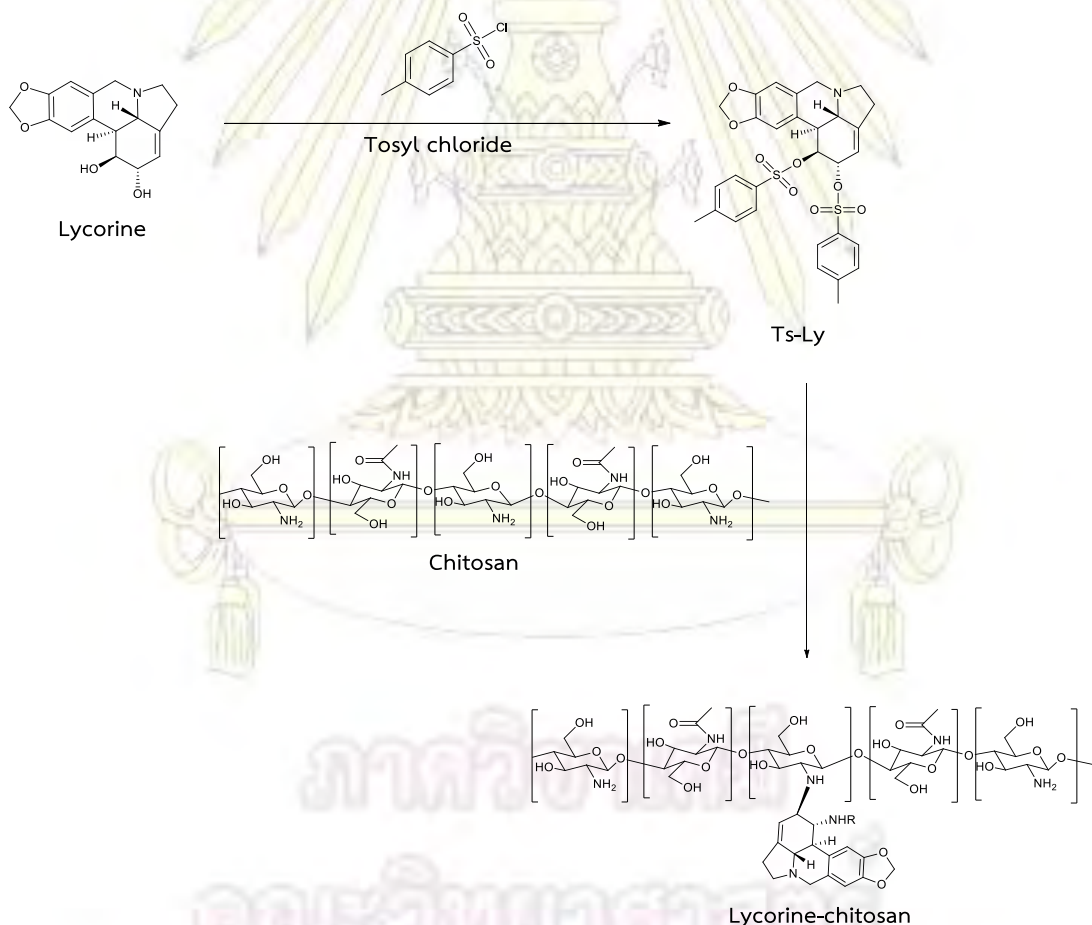


รูปที่ 3.43 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติกับ doxorubicin และอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 mg/mL

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

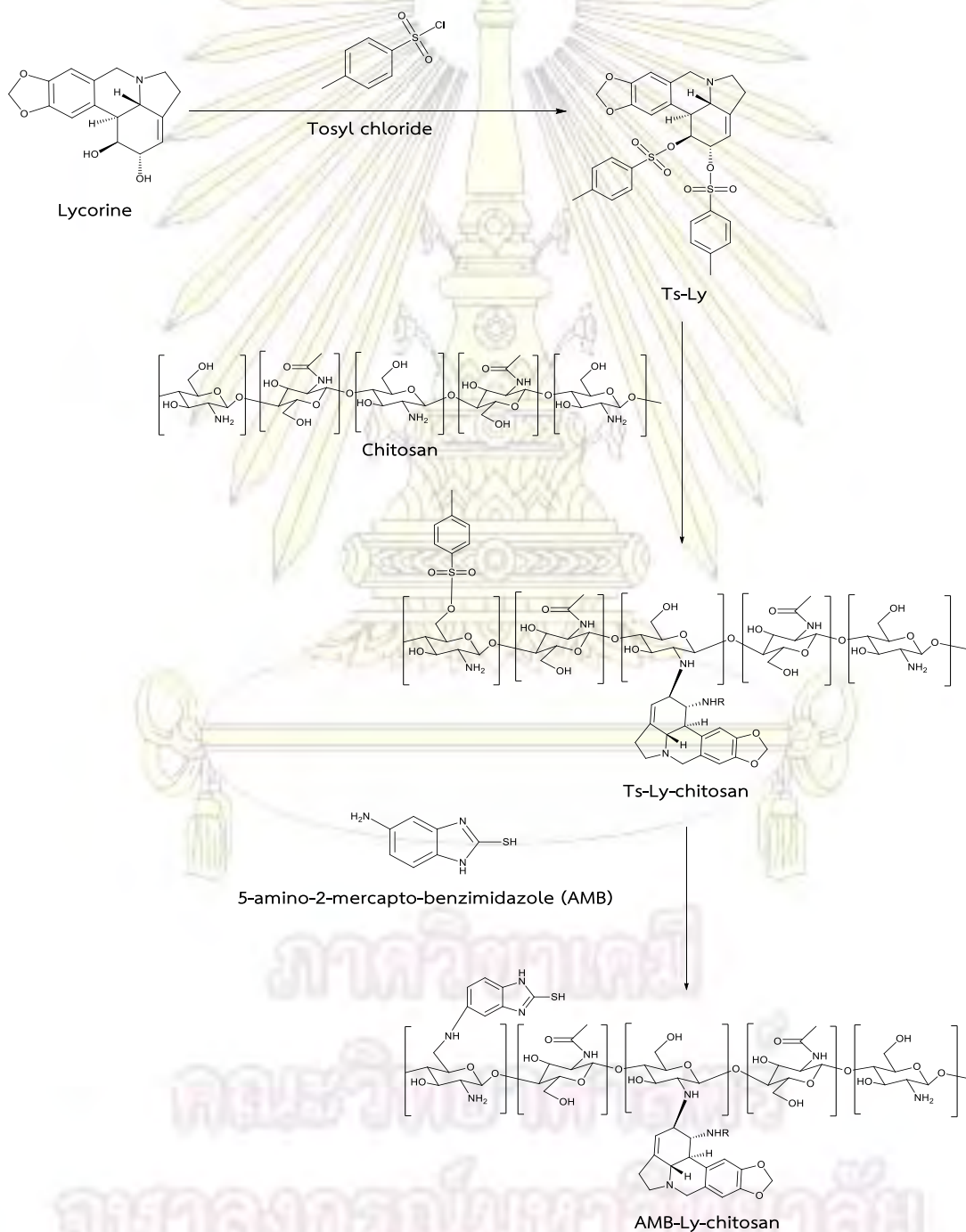
งานวิจัยนี้ต้องการสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนของซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซานและนำส่ง lycorine เข้าสู่เซลล์มะเร็งเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ การทดลองแบ่งเป็น 2 ชั้นหลักคือ ชั้นดัดแปลงไคโตซานกับ lycorine และชั้นสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยไคโตซานที่ดัดแปลง ดังนั้นจึงทำปฏิกิริยา tosylation ของ lycorine ก่อนแล้วค่อยนำไปทำปฏิกิริยากับไคโตซานเพื่อให้ได้ Lycorine-chitosan ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แผนภาพสรุปการสังเคราะห์ Lycorine-chitosan

แต่จากการสังเคราะห์เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิค ¹H-NMR, FT-IR และ TGA พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็น Ts-Ly-chitosan เนื่องจาก Tosyl chloride ที่มากเกินไปสามารถไป

ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของโคโตซานได้ และเพื่อที่จะกำจัดหมู่ tosyl ออกจึงนำมาทำปฏิกิริยากับ AMB ซึ่งมีหมู่เอมีโนเป็นนิวคลีโอไฟล์และมีหมู่ไทออล (-SH) เป็นองค์ประกอบ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น AMB-Ly-chitosan ดังรูปที่ 4.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, FT-IR และ TGA อีกทั้งใช้ Ellman's reagent เพื่อหาปริมาณหมู่ไทออลใน AMB-Ly-chitosan พบว่ามีหมู่ไทออลเป็นองค์ประกอบเท่ากับ $2.2 \mu\text{mol/g}$



รูปที่ 4.2 แผนภาพสรุปการสังเคราะห์สารทั้งหมดของงานวิจัย

จากนั้นสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ Ts-Ly-chitosan และ AMB-Ly-chitosan โดยลองเปลี่ยนความเข้มข้นของพอลิเมอร์ดังนี้ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากภาพ SEM พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมมีขนาดเป็นทรงกลม และศึกษาขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan (ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยเทคนิค DLS พบว่ามีขนาดเท่ากับ 83.92 ± 15.11 nm และ 80.31 ± 38.50 nm ตามลำดับ นอกจากนี้ศึกษาประจุที่พื้นผิวของอนุภาคด้วยเทคนิค Electrophoretic Light Scattering พบว่ามีค่าเท่ากับ $+37.6 \pm 7.77$ mV และ $+44.9 \pm 9.65$ mV ตามลำดับ

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT assay กับเซลล์ 5 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ (Ts-Ly-chitosan และ AMB-Ly-chitosan) ที่มีความเข้มข้นของพอลิเมอร์เท่ากับ 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ โดยเฉพาะกับ KB และ A549 ซึ่งอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ทำให้เสถียรด้วย Ts-Ly-chitosan ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด และมีค่า IC_{50} ของ KB เท่ากับ $3.907 \mu M$ และ IC_{50} ของ A549 เท่ากับ $4.561 \mu M$ เมื่อพิจารณาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเทียบกับยา doxorubicin พบว่ามีความเป็นพิษน้อยกว่า แต่มีข้อดีคือช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเนื่องจาก lycorine เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และอนุภาคนาโนซีลีเนียมมีขนาดที่เหมาะสม (ขนาดอยู่ในช่วง 30-200 นาโนเมตร) ทำให้เกิดความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนสาเหตุที่ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งน้อยเนื่องจากปริมาณของ lycorine ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเกิดพันธะกับโคโตซานปริมาณน้อยมาก ดังนั้นในขั้นการสังเคราะห์ Ts-Ly-chitosan จะต้องเพิ่มปริมาณ lycorine ให้มากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

1. Wang, P.; Yuan, H.-H.; Zhang, X.; Li, Y.-P.; Shang, L.-Q.; Yin, Z. Novel Lycorine Derivatives as Anticancer Agents: Synthesis and In Vitro Biological Evaluation. *Molecules*. **2014**, *19*, 2469-2480.
2. M, F.; Kievit; Zhang, M. Cancer Nanotheranostics: Improving Imaging and Therapy. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H217-H247.
3. Masood, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Mat. Sci. Eng. C*. **2016**, 569-578.
4. Jia, F.; Liu, X.; Li, L.; Mallapragada, S.; Narasimhan, B.; Wang, Q. Multifunctional nanoparticles for targeted delivery of immune activating and cancer therapeutic agents. *J. Control. Release*. **2013**, *172* (3), 1020-1034.
5. Santos, H. A.; Bimbo, L. M.; Peltonen, L.; Hirvonen, J. Inorganic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery and Imaging. In *Targeted Drug Delivery : Concepts and Design*; Devarajan, P. V., Jain, S., Eds.; Springer International Publishing: Helsinki, 2015; pp 571-613.
6. Kamaly, N.; Xiao, Z.; Valencia, P. M.; Radovic-Morenob, A. F.; Farokhzad, O. C. Targeted Polymeric Therapeutic Nanoparticles: Design, Development and Clinical Translation. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2971-3010.
7. Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387-6392.
8. Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G. Drug Targeting to Tumors: Principles, Pitfalls and (pre-) Clinical Progress. *J. Control. Release*. **2012**, *161*, 175-187.
9. Sharma, G.; Sharma, A. R.; Bhavesh, R.; Park, J.; Ganbold, B.; Nam, J.-S.; Lee, S.-S. Biomolecule-Mediated Synthesis of Selenium Nanoparticles Using Dried *Vitis vinifera*

- (Raisin) Extract. *Molecules*. **2014**, *19*, 2761-2770.
10. Liu, W.; Li, X.; Wong, Y.-S.; Zheng, W.; Zhang, Y.; Cao, W.; Chen, T. Selenium Nanoparticles as a Carrier of 5-Fluorouracil to Achieve Anticancer Synergism. *Acs Nano*. **2012**, *6* (8), 6578-6591.
 11. Zhang, J.; Wang, X.; Xu, T. Elemental Selenium at Nano Size (Nano-Se) as a Potential Chemopreventive Agent with Reduced Risk of Selenium Toxicity: Comparison with Se-Methylselenocysteine in Mice. *Toxicol Sci*. **2008**, *101*, 22-31.
 12. Juntaprama, K.; Praphairaksitb, N.; Siraleartmukulc, K.; Muangsin, N. Synthesis and characterization of chitosan-homocysteine thiolactone as a mucoadhesive polymer. *Carbohyd Polym*. **2012**, *87*, 2399-2048.
 13. Liu, W.; Li, X.; Wong, Y.-S.; Zheng, W.; Zhang, Y.; Cao, W.; Chen, T. Selenium Nanoparticles as a Carrier of 5-Fluorouracil to Achieve Anticancer Synergism. *Acs Nano*. **2012**, *6* (8), 6578-6591.
 14. Yu, B.; Zhang, Y.; Zheng, W.; Fan, C.; Chen, T. Positive Surface Charge Enhances Selective Cellular Uptake and Anticancer Efficacy of Selenium Nanoparticles. *Inorg. Chem*. **2012**, *51*, 8956–8963.
 15. Chen, W.; Li, Y. f.; Yang, S.; Yue, L.; Jiang, Q.; Xia, W. Synthesis and Antioxidant Properties of Chitosan and Carboxymethylchitosan-Stabilized Selenium Nanoparticles. *Carbohyd Polym*. **2015**, *132*, 574-581.
 16. Lopez-Heras, I.; Sanchez-Diaz, R.; Anunciação, D. S.; Madrid, Y.; Luque-Garcia, J. L.; Camara, C. Effect of Chitosan-Stabilized Selenium Nanoparticles on Cell Cycle Arrest and Invasiveness in Hepatocarcinoma Cells Revealed by Quantitative Proteomics. *J Nanomed Nanotechnol* **2014**, *5* (5), 1-10.
 17. <http://rise.duke.edu/seek/pages/page.html?0205> (accessed March 2, 2016).
 18. NEUROtiker. Wikimedia Commons.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitosan_Synthese.svg
(accessed March 2, 2016).

19. adminHerb. ThaiHerbal.org. <http://thaiherbal.org/2734/2734>

(accessed March 3, 2016).

20. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay (accessed March 3, 2016).



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

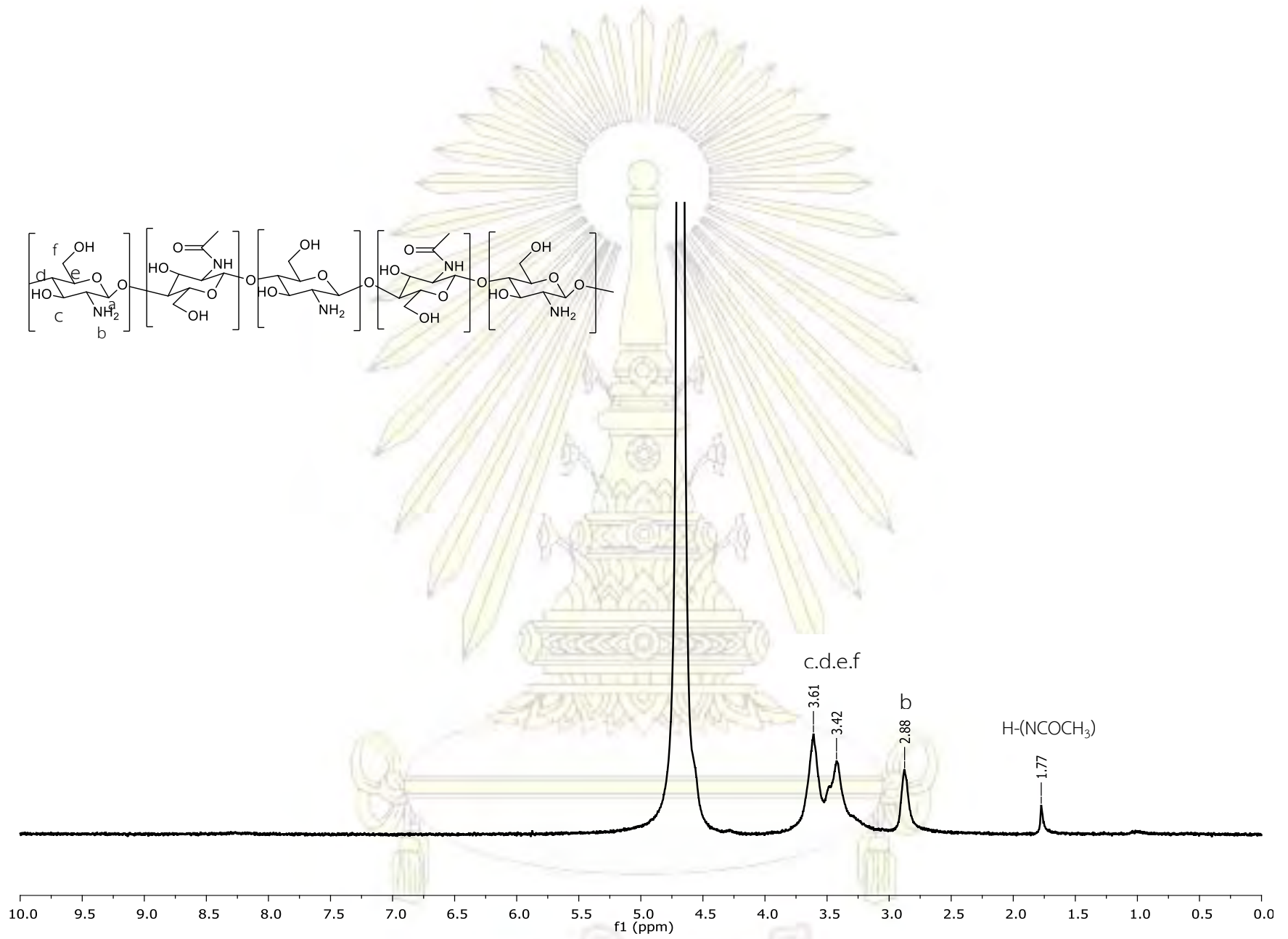
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



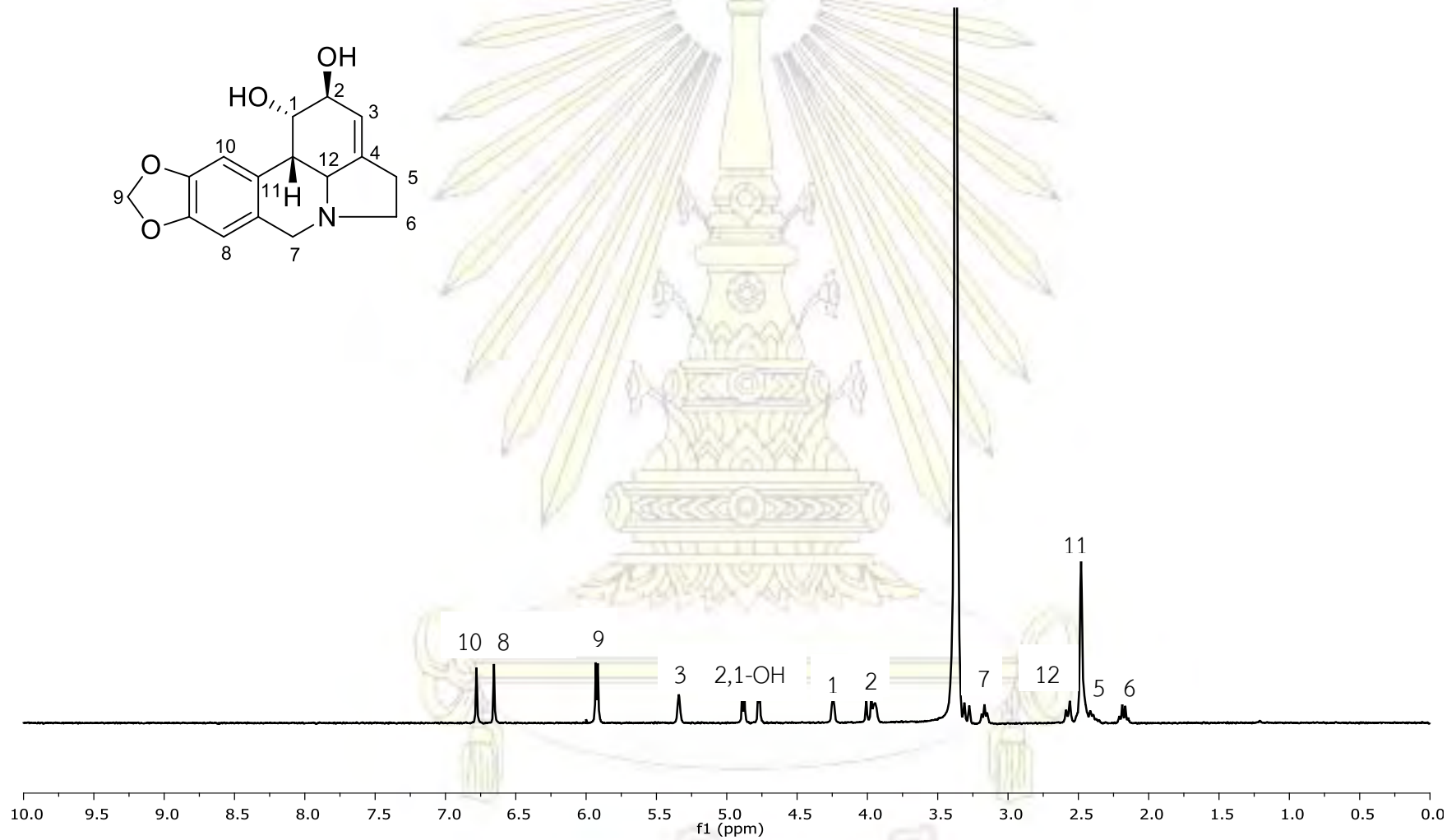
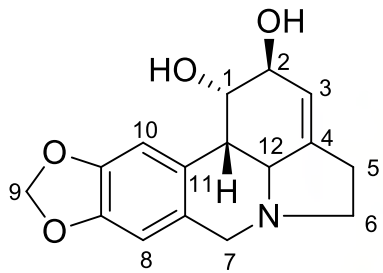
ภาคผนวก ก

^1H NMR สเปกตรัม

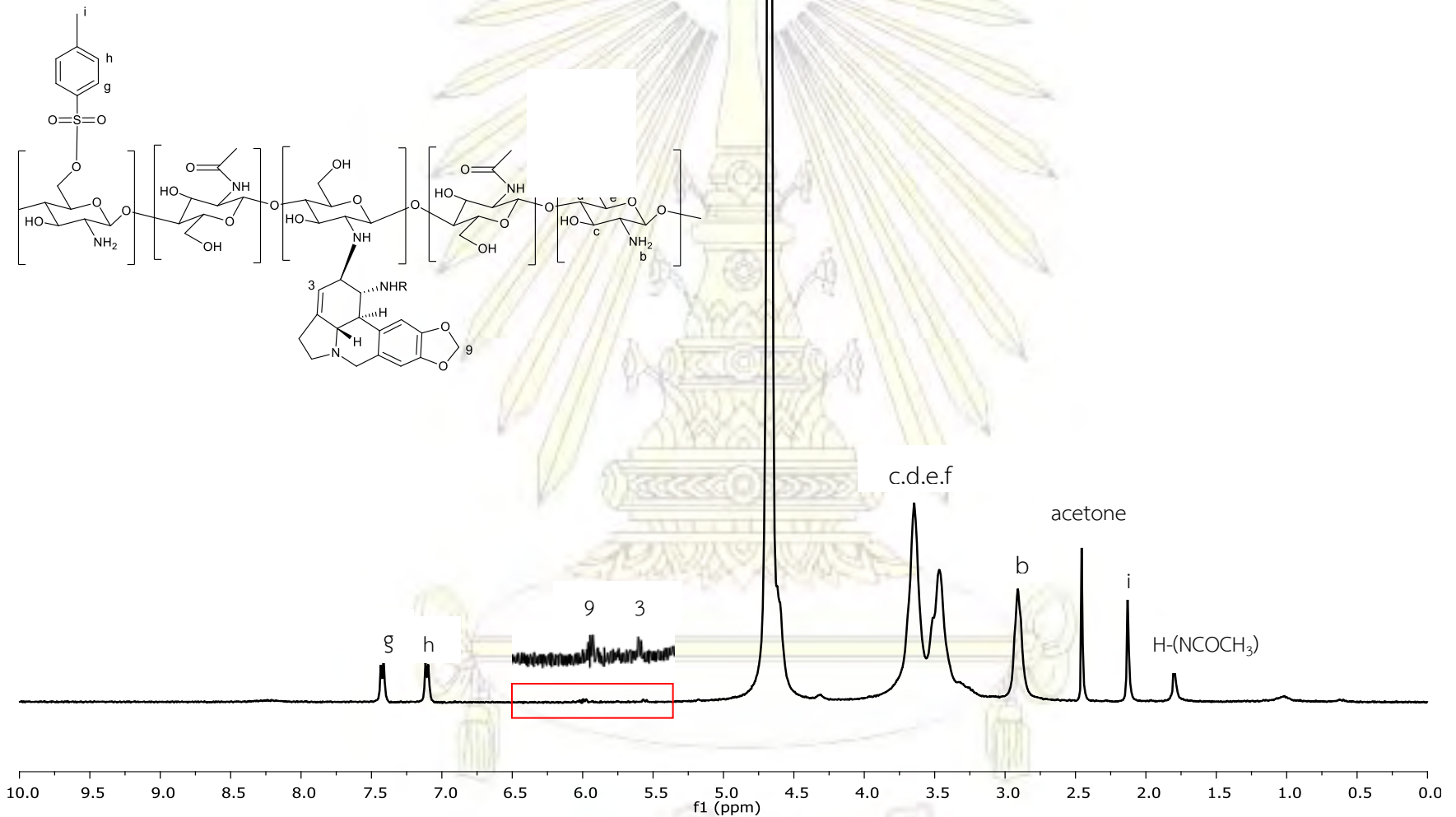
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



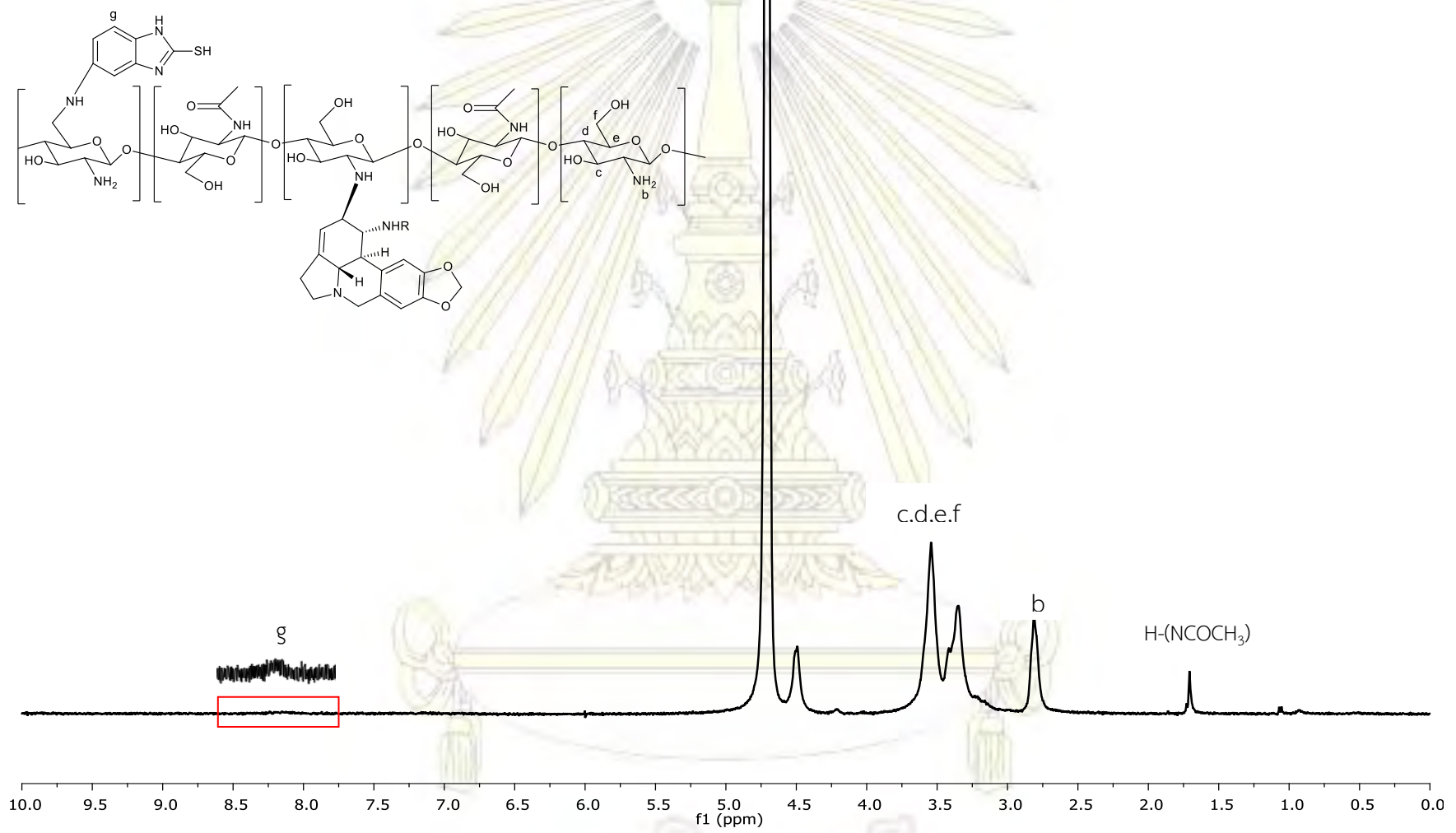
รูปที่ ก-1 ¹H NMR สเปกตรัมของ chitosan



รูปที่ ก-2 ^1H NMR สเปกตรัมของ lycorine



รูปที่ ก-3 ¹H NMR สเปกตรัมของ Ts-Ly-chitosan



รูปที่ ก-4 ¹H NMR สเปกตรัมของ AMB-Ly-chitosan



ภาคผนวก ข

ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายซิสเตอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของสารละลายซีส테인
ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ สารละลายซีส테인 (μM)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร				ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	
0.1	0.072	0.070	0.070	0.072	0.071
1	0.073	0.073	0.072	0.075	0.073
10	0.091	0.085	0.090	0.087	0.088
100	0.115	0.114	0.115	0.111	0.114
200	0.163	0.204	0.156	0.151	0.169
400	0.282	0.283	0.296	0.202	0.266
600	0.400	0.427	0.414	0.401	0.411
800	0.573	0.587	0.544	0.572	0.569
1000	0.693	0.741	0.683	0.670	0.697
1200	0.915	0.911	0.913	0.759	0.875
1400	1.007	1.060	0.961	1.053	1.020
1600	1.172	1.222	1.135	1.123	1.163

หมายเหตุ แต่ละความเข้มข้นของสารละลายซีส테인ทำ 4 ซ้ำ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้ทำวิจัย

นางสาวปัทมาธิ์ย์ ปิ่นประสงค์ เกิดเมื่อวันที่ 26 เมษายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 1044/11 แขวงบางจาก เขตพระโขนง จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10260 อีเมล pantaree.p@chula.ac.th



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย