โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของแคลเซียมซิเทรตเพื่อศึกษาการควบคุมการปลดปล่อย
Synthesis of calcium citrate nanoparticles for controlled-release study

ชื่อนิสิต นายณัฐชนน หริ่มสืบ

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของแคลเซียมซิเทรตเพื่อศึกษาการควบคุมการปลดปล่อย

Synthesis of calcium citrate nanoparticles for controlled-release study

โดย
นายณัฐชนน หริ่มสืบ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559

โครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของแคลเซียมซิเทรตเพื่อศึกษาการควบคุมการปลดปล่อย

โดย นายณัฐชนน หริ่มสืบ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สกุลสุข อุ่นอรุโณทัย)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหนาภาควิชาเคมี

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

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของแคลเซียมซิเทรตเพื่อศึกษาการควบคุมการปลดปล่อย
ชื่อนิสิตในโครงการ นายณัฐชนน หริ่มสืบ เลขประจำตัว 5633070323
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนของแคลเซียมซิเทรตผ่านวิธีตกตะกอนทางเคมี โดยฝังสีย้อม ฟลูออเรสซีนไอโซไทโอไซยาเนตไว้ภายในเพื่อศึกษาการปลดปล่อยสารฟลูออเรสเซนต์ ผลิตภัณฑ์ทุกชนิดพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์เทอร์โมกราวิเมตริก การวิเคราะห์ศักย์ซีตา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด อนุภาคนาโนที่ติดสารเรืองแสงบ่มกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ภาพจากกล้องคอนโฟคอลตรวจพบฟลูออเรสเซนต์สีเขียวที่มีลักษณะเฉพาะภายในเซลล์ ยืนยันว่าอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตสามารถใช้เป็นตัวพาชนิดใหม่นำเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: แคลเซียมซิเทรต อนุภาคนาโน ฟลูออเรสซีนไอโซไทโอไซยาเนต การนำส่งยา

Project Title Synthesis of calcium citrate nanoparticles for controlled-release study

Student Name Mr. Natchanon Rimsueb Student ID 5633079023

Advisor Name Assistant Professor Rojrit Rojanathanes, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016

Abstract

In this research, calcium citrate nanoparticles were synthesised *via* chemical precipitation method. A fluorescent dye, Fluorescein isothiocyanate (FITC), was encapsulated for controlled-release study. All products were characterised by Thermal Gravimetric Analysis (TGA), Zeta potential analysis and scanning electron microscope. Fibroblast cells were incubated with the fluorescent-tagged nanoparticles. Characteristic green fluorescent in the cells was detected by confocal microscope confirming that the calcium citrate nanoparticles can potentially be used as novel drug carriers.

keywords: Calcium citrate, nanoparticles, Fluorescein isothiocyanate, Drug delivery

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ มาโดยตลอดด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ขอพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นส่วนหนึ่งของบททดสอบชีวิตนิสิตในรั้วจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ต้องทุ่มเทแรงกาย แรงใจ ความรู้ ความสามารถ ฝ่าฟันอุปสรรคต่าง ๆ ให้ผ่านพ้นด้วยดี นับเป็นความภูมิใจที่จะติดตัวของผู้วิจัยตลอดไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	6
1.3.1 Thermogravimetric Analysis (TGA)	6
1.3.2 Zeta potential	7
1.3.3 Confocal Laser Scanning Microscopy	8
1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	9
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	9
บทที่ 2 การทดลอง	10
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์	10
2.2 สารเคมี	11
2.3 วิธีการทดลอง	12
2.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตที่บรรจุสีย้อม FITC	12
2.3.2 การระบุเอกลักษณ์	12
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	14
3.1 ขนาดอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	14
3.2. วิเคราะห์หา %FITC ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA)	16
3.3 ค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของแคลเซียมซิเทรต (Zeta potential)	17
3.4 การเปรียบเทียบความสามารถในการกระจายของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรต และแคลเซียมคาร์บอเนตในน้ำ	18
3.5 การทดสอบการปลดปล่อยสารฟลูออเรสเซนต์ของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตในเซลล์	19

หน้า

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 20
เอกสารอ้างอิง 21
ประวัติผู้วิจัย 22

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลสารเคมี 11

ตารางที่ 2.2 แสดงน้ำหนักสารที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรต 12

ตารางที่ 3.1 แสดงค่า Zeta potential ของแคลเซียมซิเทรต 17

สารบัญรูป

รูปภาพ **หน้า**

รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของกรดซิทริก 1

รูปที่ 1.2 โครงสร้างผลึกของแคลเซียมซิเทรตเตตระไฮเดรต ($[Ca_3(C_6H_5O_7)_2(H_2O)_2]\bullet 2H_2O$) 2

รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของ Fluorescein isothiocyanate 3

รูปที่ 1.4 รูปที่ 1.4 (ก) แสดงความเสถียรของอนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนตที่ pH ต่างกัน (ข) การทำงานของอนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนตที่บรรจุยาต้านมะเร็ง DOX ไว้ภายในและดัดแปลงพื้นผิวด้วย Aptamer 3

รูปที่ 1.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตในอัตราส่วนระหว่างเอทานอลและน้ำที่แตกต่างกัน (ก) เอทานอล:น้ำ = 2:1 ที่กำลังขยาย 30000 (ข) เอทานอล:น้ำ = 2:1 ที่กำลังขยาย 100000 (ค) เอทานอล:น้ำ = 1:2 ที่กำลังขยาย 30000 (ง) เอทานอล:น้ำ = 1:2 ที่กำลังขยาย 100000 4

รูปที่ 1.6 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TGA ระหว่างร้อยละน้ำหนักที่เสียไปกับอุณหภูมิ (°C) 6

รูปที่ 1.7 แสดงศักย์ไฟฟ้าที่ระยะห่างแตกต่างกันของพื้นผิวอนุภาคที่อยู่ในกระจายตัวแบบคอลลอยด์ (colloidal dispersions) 7

รูปที่ 1.8 แสดงกลไกการทำงานของ Confocal Laser Scanning Microscopy 8

รูปที่ 3.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตในอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออน เท่ากับ 3:2 ที่กำลังขยาย 15000 (ข) แคลเซียมไอออน:ซิเทรตไอออน เท่ากับ 3:2 ที่กำลังขยาย 30000 (ค) แคลเซียมไอออน:ซิเทรตไอออน เท่ากับ 1:1 ที่กำลังขยาย 15000 (ง) แคลเซียมไอออน:ซิเทรตไอออน เท่ากับ 1:1 ที่กำลังขยาย 30000 14

รูปที่ 3.2 ร้อยละของน้ำหนักที่เสียไปที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรต 16

รูปที่ 3.3 ร้อยละของน้ำหนักที่เสียไปที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตที่ฝังสีย้อม FITC 16

รูปที่ 3.4 แสดงความสามารถในการกระจายของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตและแคลเซียมคาร์บอเนตในน้ำ (ก) ถ่ายภาพ ณ ชั่วโมงที่ 1 (ข) ถ่ายภาพ ณ ชั่วโมงที่ 4 18

รูปที่ 3.5 แสดงภาพเซลล์ที่บ่มด้วยแคลเซียมซิเทรตฝัง FITC ไว้ภายใน จากกล้อง confocal laser scanning หลังจากผ่านไปเป็นเวลา (ก) 24 ชั่วโมง (ข) 48 ชั่วโมง 19

สัญลักษณ์และคำย่อ

DAPI	: 4,6-diamidino-2-phenylindole
DOX	: Doxorubicin
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
PBS	: Phospate buffer saline
TGA	: Thermogravimetric Analysis

บทที่ 1

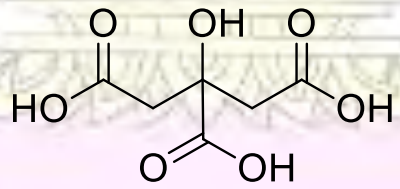
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันงานวิจัยด้านการขนส่งหรือควบคุมการปลดปล่อยยาไปยังอวัยวะหรือเซลล์เป้าหมายในร่างกายตามต้องการ ที่เรียกว่าระบบนำส่งยา (drug delivery system) เป็นที่แพร่หลายในวงการแพทย์ โดยอนุภาคนาโนของสารประกอบไอออนิกของแคลเซียม มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการเป็นตัวพายา (carrier) ไปยังเซลล์เป้าหมาย

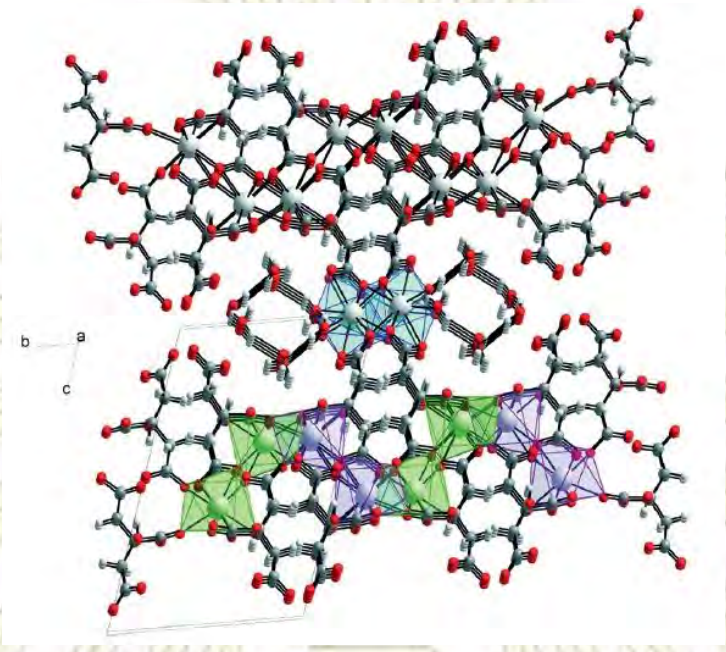
แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นเกลือของแคลเซียมที่ราคาถูก เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatible) ไวต่อสภาวะกรดเบส และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย แคลเซียมคาร์บอเนตจึงถูกใช้เป็นตัวนำพายาได้หลายชนิด เช่น ใช้ขนส่งยาต้านมะเร็งไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมาย[1] เป็นต้น

แคลเซียมซิเทรตเป็นเกลืออีกชนิดหนึ่งของแคลเซียม มีสมบัติบางประการที่คล้ายคลึงกับแคลเซียมคาร์บอเนต เช่น ถูกย่อยสลายได้ง่ายและดูดซึมเข้าร่างกายได้ดีเช่นเดียวกับแคลเซียมคาร์บอเนต[2] ซิเทรตเป็นเกลือของกรดซิทริก มีหมู่คาร์บอกซิลิก 3 หมู่ แสดงในรูปที่ 1.1 เป็นสารสำคัญในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ โดยเป็นผลิตภัณฑ์แรกในวัฏจักรเครบส์ แคลเซียมซิเทรตจึงเป็นวัสดุที่ย่อยสลายได้ (biodegradable) และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (biocompatible) ซิเทรตสามารถเกิดปฏิกิริยากับแคลเซียมไอออนได้ตะกอนแคลเซียมซิเทรต ผลึกที่เสถียรของแคลเซียมซิเทรต จะมีลักษณะเป็นเข็ม อยู่ในรูปแคลเซียมซิเทรตเตตระไฮเดรต ($[Ca_3(C_6H_5O_7)_2(H_2O)_2]\cdot 2H_2O$)[3]



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของกรดซิทริก

โครงผลึกแคลเซียมซิเทรตประกอบด้วยแคลเซียมไอออน ที่มี 8 โคออร์ดิเนต จับกับออกซิเจน 8 อะตอม โดย 6 อะตอม มาจากซิเทรต และอีก 2 อะตอมมาจากน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 1.2

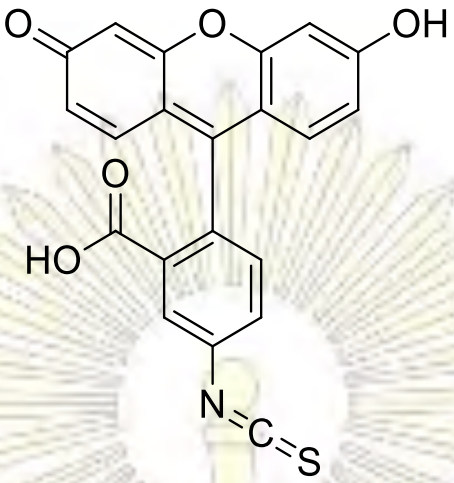


รูปที่ 1.2 โครงสร้างผลึกของแคลเซียมซิเทรตเตตระไฮเดรต ($[Ca_3(C_6H_5O_7)_2(H_2O)_2]\cdot 2H_2O$)

ในปี 2016 มีการนำแคลเซียมซิเทรตมาใช้ในทางการแพทย์ เพื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมในเนื้อเยื่อกระดูก ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย[5] จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมซิเทรตมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ ไม่เป็นพิษ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะออกแบบแคลเซียมซิเทรตเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

ผู้วิจัยต้องการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะใช้แคลเซียมซิเทรตเป็นตัวพาสารต่าง ๆ ที่บรรจุอยู่ภายในจึงติดสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ไว้ภายในอนุภาคแคลเซียมซิเทรตเพื่อติดตามการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียมซิเทรตสารดังกล่าวคือ ฟลูออเรสซีนไอโซไทโอไซยาเนต (Fluorescein isothiocyanate) หรือเรียกว่า FITC โดยศึกษาด้วยกล้อง confocal laser scanning และใช้เซลล์ fibroblast เป็นเซลล์เป้าหมาย เนื่องจากผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำแคลเซียมซิเทรตนำส่งยาผ่านผิวหนังต่อไป

FITC เป็นสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้แพร่หลายในงานทางชีววิทยา เนื่องจากให้ fluorescence quantum yield สูง และละลายในน้ำได้ง่าย[6] มีโครงสร้างดังแสดงในรูป 1.3

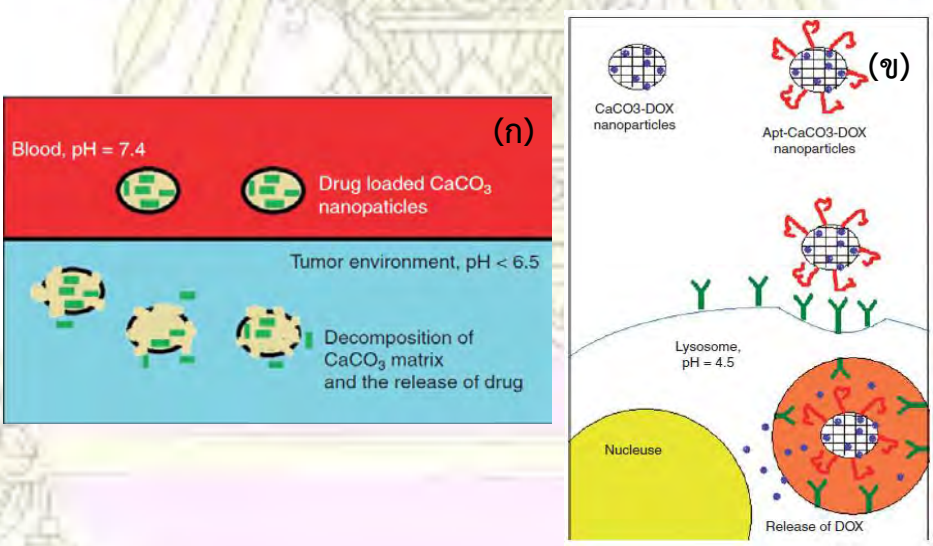


รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของ Fluorescein isothiocyanate

จากรูปที่ 1.3 โครงสร้างของ FITC ประกอบไปด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก ซึ่งสามารถจับกับแคลเซียมไอออนได้ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้สีย้อมชนิดนี้ฝังในอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรต

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

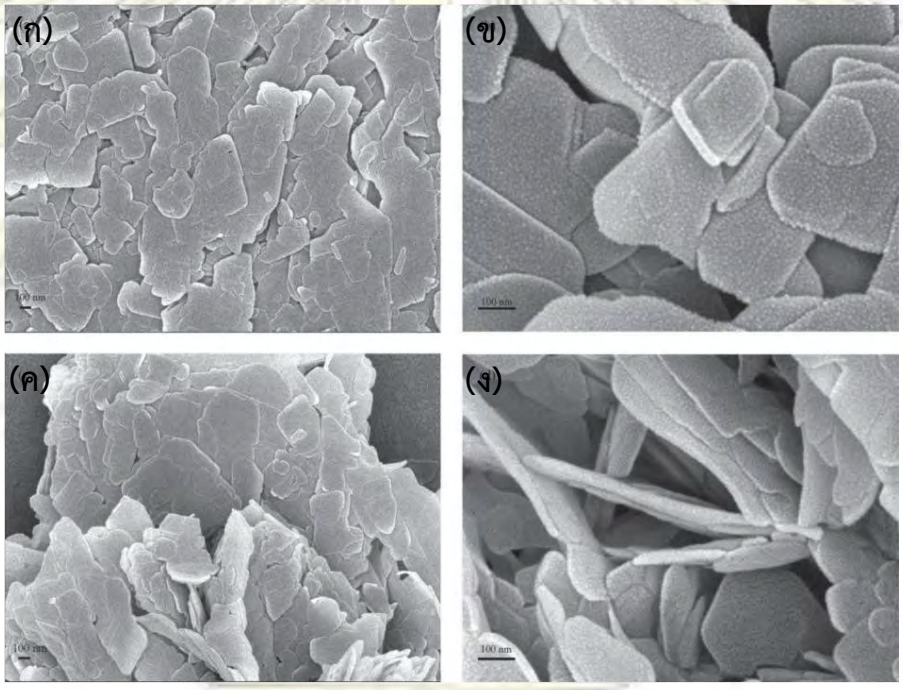
Solmaz Maleki Dizaj และคณะ[1] ศึกษาการใช้อนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนตส่งยาต้านมะเร็งไปยังเซลล์เป้าหมาย โดยอาศัยความเป็นกรดของเซลล์มะเร็ง สลายอนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนตออกเพื่อปลดปล่อยยาในเซลล์เป้าหมายได้



รูปที่ 1.4 (ก) แสดงความเสถียรของอนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนตที่ pH ต่างกัน (ข) การทำงานของอนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนตที่บรรจุยาต้านมะเร็ง DOX ไว้ภายในและดัดแปรพื้นผิวด้วย Aptamer[1]

จากรูปที่ 1.4 (ก) แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมคาร์บอเนตที่บรรจุยา Doxorubicin (DOX) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เสถียรที่ pH 7.4 และจะสลายตัวที่ pH น้อยกว่า 6.5 จากรูปที่ 1.4 (ข) แสดงกลไกการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยกระบวนการเซลล์เอนโดไซโทซิส (endocytosis) เมื่อเอนโดโซมกลายสภาพเป็นไลโซโซมที่มี pH ในช่วง 4.5-5.5 จะทำให้อนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนต สลายตัวและปลดปล่อยยา DOX ออกมาภายในเซลล์มะเร็งได้ และอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตถูกดัดแปลงผิวด้วย Aptamer เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง

ในปี 2016 Junfeng Li และคณะ[5] สังเคราะห์แผ่นนาโนแคลเซียมซิเทรต (calcium citrate nanosheets) โดยตกตะกอนแคลเซียมซิเทรตในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออน เท่ากับ 3:2 และใช้อัตราส่วนตัวทำละลายระหว่างเอทานอลและน้ำ เท่ากับ 1:2 และ 2:1 เพื่อศึกษาขนาดและรูปร่างของแคลเซียมซิเทรตภายใต้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกัน



รูปที่ 1.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตในอัตราส่วนระหว่างเอทานอลและน้ำที่แตกต่างกัน (ก) เอทานอล:น้ำ = 2:1 ที่กำลังขยาย 30000 (ข) เอทานอล:น้ำ = 2:1 ที่กำลังขยาย 100000 (ค) เอทานอล:น้ำ = 1:2 ที่กำลังขยาย 30000 (ง) เอทานอล:น้ำ = 1:2 ที่กำลังขยาย 100000

แผ่นนาโนแคลเซียมซิเทรตที่สังเคราะห์ขึ้นเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมซิเทรต ด้วยอัตราส่วนโดยโมลของแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออนเท่ากับ 3:2 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ไอออนทั้งสองทำปฏิกิริยาพอดีกัน และใช้ปริมาณตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 2 อัตราส่วนคือ อัตราส่วนระหว่างเอ

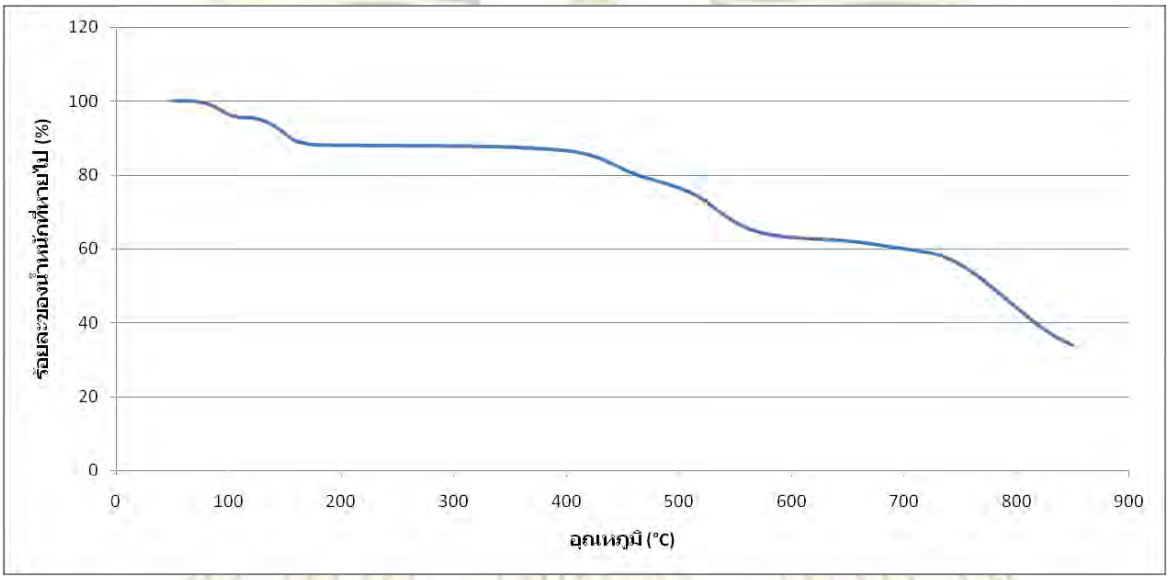
ทานอลและน้ำเท่ากับ 1:2 และ 2:1 จากรูปที่ 1.5 แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมซิเทรตที่เกิดจากการสังเคราะห์โดยใช้ตัวทำละลายอัตราส่วนระหว่างเอทานอลและน้ำเท่ากับ 1:2 ให้แผ่นนาโนที่บางกว่าอัตราส่วนระหว่างเอทานอลและน้ำเท่ากับ 2:1 เนื่องจากเอทานอลมีขั้วน้อยกว่าน้ำ เมื่อเกิดแคลเซียมซิเทรตขึ้นตะกอนที่ได้จะเข้าไปกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ดี ทำให้อนุภาคไม่รวมตัวกันเป็นขนาดใหญ่ แคลเซียมซิเทรตที่ใช้ตัวทำละลายอัตราส่วนระหว่างเอทานอลและน้ำเท่ากับ 1:2 จึงมีขนาดเล็กกว่า เมื่อนำมาศึกษาการสร้างกระดูกใหม่ (bone regeneration) ในเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกของกระต่ายที่เป็นโรคกระดูก พบว่าแคลเซียมซิเทรตมีความเข้ากันได้กับเซลล์เนื้อเยื่อกระดูก (biological compatibility) และมีการสร้างกระดูกใหม่ขึ้นมาทดแทนโดยใช้แคลเซียมไอออนจากแคลเซียมซิเทรต

จากงานวิจัยต่าง ๆ ข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ปัจจุบันการใช้อนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวพายา ส่งไปยังเซลล์เป้าหมาย มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสูง อนุภาคนาโนแคลเซียมคาร์บอเนตมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกายและย่อยสลายได้ดี ในขณะที่แคลเซียมซิเทรตมีข้อได้เปรียบที่เหนือกว่าแคลเซียมคาร์บอเนตในแง่ของการกระจายตัวเป็นสารละลาย อีกทั้งจากงานวิจัย แคลเซียมซิเทรตยังถูกนำมาใช้ในการสร้างกระดูกใหม่ (bone regeneration) ในเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอย่างมีประสิทธิภาพ และใช้เป็นอาหารเสริมให้กับสิ่งมีชีวิตได้[2] แสดงให้เห็นว่า แคลเซียมซิเทรตมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรต เพื่อให้สามารถเป็นตัวพายา ส่งไปยังเซลล์เป้าหมายเช่นเดียวกับแคลเซียมคาร์บอเนต โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะใช้แคลเซียมซิเทรตเป็นตัวพา สีย้อมฟลูออเรสเซนต์เข้าสู่เซลล์

1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 Thermogravimetric Analysis (TGA)

เทคนิคการวิเคราะห์ TGA อาศัยการเพิ่มอุณหภูมิสารที่วิเคราะห์ เพื่อเปลี่ยนลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสารนั้นๆ ใช้เพื่อการระบุเอกลักษณ์ของสาร โดยวิเคราะห์น้ำหนักที่เสียไป (mass loss) จากการสลายตัว (decomposition)[4]

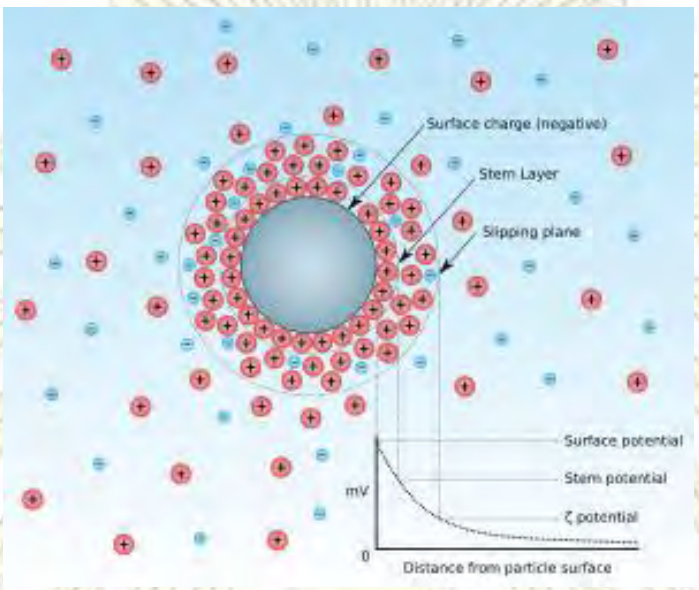


รูปที่ 1.6 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TGA ระหว่างร้อยละน้ำหนักที่เสียไปกับอุณหภูมิ (°C)

สารแต่ละชนิดมีลักษณะการสลายตัวที่อุณหภูมิแตกต่างกัน จากรูปที่ 1.6 สามารถหาร้อยละน้ำหนักที่หายไปในแต่ละช่วงอุณหภูมิได้ ซึ่งจากกราฟเป็นลักษณะการสลายตัวที่เฉพาะตัวของแคลเซียมซิเทรต จึงสามารถใช้พิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารได้

1.3.2 Zeta potential

Zeta potential คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าบนผิวของสารที่มีการกระจายตัวแบบคอลลอยด์ (colloidal dispersions)[8]

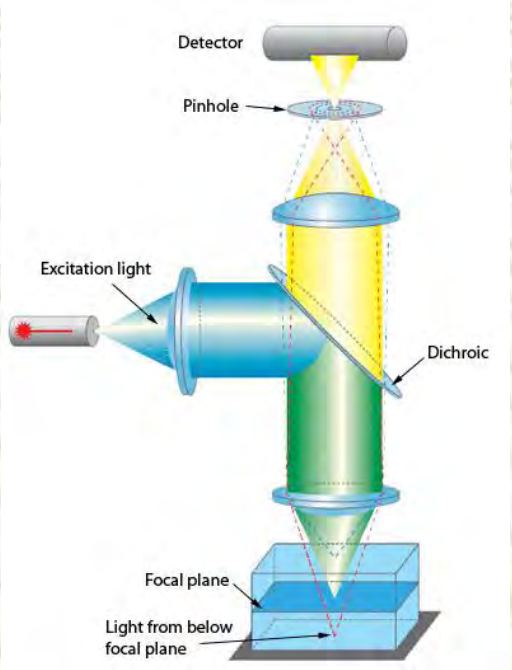


รูปที่ 1.7 แสดงศักย์ไฟฟ้าที่ระยะห่างแตกต่างกันของพื้นผิวอนุภาคที่อยู่ในกระจายตัวแบบคอลลอยด์ (colloidal dispersions)[8]

ประจุรวมที่ผิวของอนุภาคจะส่งผลต่อไอออนที่กระจายตัวอยู่ในสารละลาย ทำให้ความเข้มข้นของประจุที่ตรงข้ามกับประจุของอนุภาคเพิ่มขึ้นตาม ดังรูปที่ 1.7 ชั้นของของเหลวแบ่งออกเป็นสองประเภทคือ ชั้นใน (inner region) เรียกว่า Stern layer เป็นชั้นที่มีไอออนหนาแน่นเกาะอยู่บนผิวของอนุภาค และชั้นนอก (outer region) คือชั้นที่ไอออนเกาะอยู่เบาบางกว่าชั้นใน อนุภาคจะเกิดสมดุลไดนามิกกับไอออนในสารละลาย เมื่ออนุภาคเคลื่อนที่ ไอออนที่ล้อมรอบอนุภาคจะเคลื่อนที่ไปตามอนุภาคด้วย แต่ไอออนอิสระที่อยู่ในสารละลายจะไม่เคลื่อนที่ตามอนุภาค บริเวณรอยต่อของอนุภาคที่ล้อมรอบกับไอออนในสารละลายเรียกว่า hydrodynamic shear หรือ slipping plane ค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณนี้คือค่า Zeta potential ค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้เป็นค่าศักย์ไฟฟ้าของประจุบนพื้นผิวของอนุภาคคอลลอยด์ เมื่อมีค่าบวกหรือลบมาก ๆ จะยิ่งทำให้อนุภาคคอลลอยด์กระจายตัวในสารละลายได้ดีจาก electrostatic repulsion [8]

1.3.3 Confocal Laser Scanning Microscopy

Confocal Laser Scanning Microscopy คือกล้องที่มีกลไกการทำงานเช่นเดียวกับ widefield fluorescence microscopy แต่มีข้อได้เปรียบกว่าคือ มี optical resolution ที่สูงมาก เนื่องจากใช้เลเซอร์เป็นแหล่งกำเนิดพลังงานและเพิ่มอุปกรณ์ตัดภาพที่ไม่เกิดจุดโฟกัส ที่เรียกว่า spatial pinhole ทำให้สามารถเลือกจุดโฟกัสเป็นจุดๆได้ เหมาะกับงานทางด้านชีววิทยาเช่น ส่องเซลล์ที่ซ้อนกันหลายชั้นได้ กล้อง Confocal Laser Scanning สามารถที่จะเลือกชั้นใดชั้นหนึ่งของเซลล์เพื่อถ่ายภาพได้โดยจะไม่เห็นภาพของเซลล์ชั้นอื่น แผ่น spatial pinhole[8] แสดงดังรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 แสดงกลไกการทำงานของ Confocal Laser Scanning Microscopy[4]

1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตและทดสอบการปลดปล่อยสารฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescein isothiocyanate) ของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตในเซลล์

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตที่กักเก็บและปลดปล่อยสารฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescein isothiocyanate) เข้าสู่เซลล์ได้

บทที่ 2

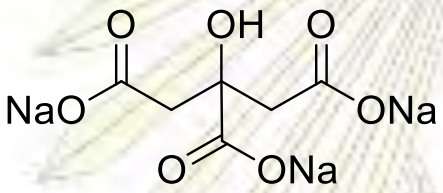
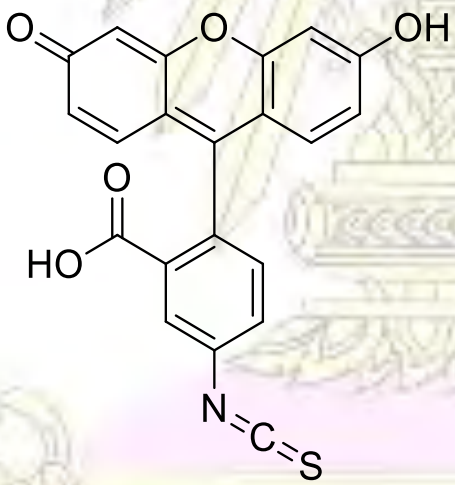
การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Mettler Toledo รุ่น MS204S
- ไมโครปิเปต Eppendorf Research plus ขนาด 200-1000 ไมโครลิตร
- เครื่อง vortex -Genie II
- เครื่อง rocking HeidolphDuomax 1030
- เซนตริฟิวจ์ Hettich ZENTRIFUGEN รุ่น D-78532 Tuttlingen
- โซนิเคเตอร์ Power Sonic series 420 ultrasonic
- เครื่องวิเคราะห์ TGA PerkinElmer รุ่น Pyris 1 TGA
- เครื่องวิเคราะห์ Zetapotential Malvern
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) JEOL series JSM-6480LV
- Confocal Laser Scanning Microscopy LSM800 Carl Zeiss

2.2 สารเคมี

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลสารเคมี

ชื่อและโครงสร้างสารเคมี	ข้อมูลสารเคมี
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) For analysis, M&B	น้ำหนักสูตร : 110.98
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) For analysis, EMSURE	น้ำหนักสูตร : 40.00
ไตรโซเดียมซิเทรต ($Na_3C_6H_5O_7$)  Pro Analysis, Merck	น้ำหนักโมเลกุล : 294.10
ฟลูออเรสซีน ไอโซไทโอไซยาเนต (FITC)  For R&D, SIGMA-ALDRICH	น้ำหนักโมเลกุล : 389.38

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตที่บรรจุสีย้อม FITC

บรรจุแคลเซียมคลอไรด์ 0.333 กรัม (3.00 มิลลิโมล) ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15.0 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำ deionized ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร เติมสารละลายสีย้อม FitC ปริมาตร 375 ไมโครลิตร เข้มข้น 1.00% โดยมวลต่อปริมาตร เติมสารละลายไตรโซเดียมซิเทรต 0.882 กรัม (3.00 มิลลิโมล) ในน้ำ deionized ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ผสมและ vortex เป็นเวลา 5 นาที ผสมแบบโยก (rocking) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงอนุภาคนาโนที่ได้ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สลับกับการล้างด้วยน้ำ deionized จนกระทั่งสารละลายด้านบนใสไม่มีสี แล้วอบให้แห้งที่ 100 องศาเซลเซียส เก็บอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตที่บรรจุสีย้อม FITC เพื่อนำไประบุเอกลักษณ์และทดสอบกับเซลล์ต่อไป การสังเคราะห์แคลเซียมซิเทรตนี้ ทดลองสังเคราะห์เป็น 2 อัตราส่วน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงน้ำหนักสารที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรต

อัตราส่วนโดยโมล Ca^{2+}: $C_6H_5O_7^{3-}$ / ปริมาณสาร	3:2	1:1
มวลแคลเซียมคลอไรด์ (กรัม)	0.333	0.333
มวลไตรโซเดียมซิเทรต (กรัม)	0.588	0.882
น้ำ Deionized (มิลลิลิตร)	2.00	2.00

2.3.2 การระบุเอกลักษณ์

2.3.2.1 Thermogravimetric Analysis (TGA)

นำสารตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส มาประมาณ 5-10 มิลลิกรัม ให้ความร้อนด้วยอัตรา 20-25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 850 องศาเซลเซียส เพื่อดูลักษณะการสลายตัวของสารตัวอย่าง

2.3.2.2 Scanning electron microscopy (SEM)

นำสารตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิกรัม มากระจายตัวในน้ำ deionized 1 มิลลิลิตร ด้วยการโซนิเคต ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 15 นาที หยดสารละลายปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนกระจก ทำให้แห้งในเดซิกเคเตอร์ เคลือบทองบนผิวของอนุภาคนาโนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2.3.2.3 Zeta potential

นำสารตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิกรัม มากระจายตัวในน้ำ deionized 1 มิลลิลิตร ด้วยการโซนิเคต ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 15 นาที นำอนุภาคที่กระจายอยู่ในตัวทำละลายไปวัดค่า Zeta potential

2.3.2.4 การทดสอบการนำส่งสีย้อมในเซลล์

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มา เพิ่มจำนวนใน petridish เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตที่ฝังสีย้อม FITC ปริมาณ 5.00 ไมโครลิตร เข้มข้น 1.00% โดยมวลต่อปริมาตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM) 2.00 มิลลิลิตร เทผสมลงกับเซลล์แล้ว บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง

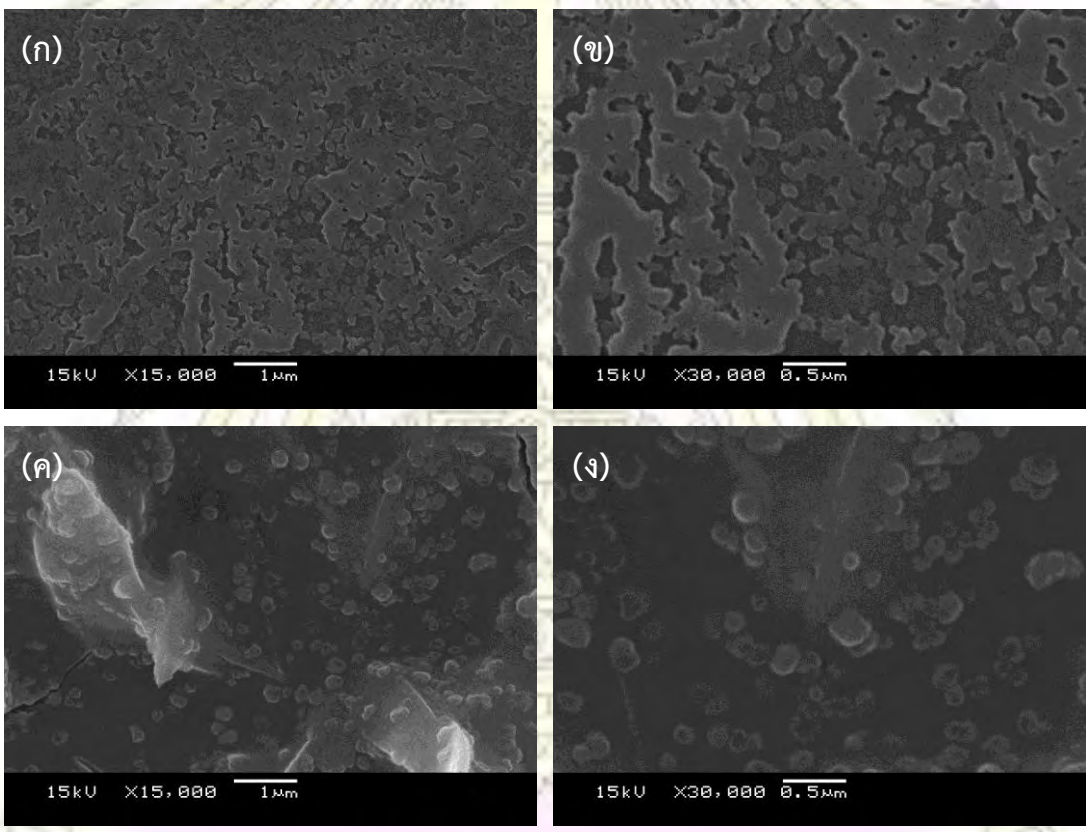
ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกก่อนด้วย Phospate buffer saline (PBS) แล้วเติม 4% formaldehyde ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อทำให้เซลล์ตาย ล้างด้วย PBS อีก 2 รอบ แล้วย้อมเติมสีนิวเคลียสด้วย 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI dye) ล้างสีที่มากเกินพอออกด้วย PBS อีกครั้งหนึ่ง ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย กล้อง Confocal Laser Scanning

บทที่ 3

ผลการทดลองและและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 ขนาดอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการทดลองสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรต ใช้อัตราส่วนโมลระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออน 2 อัตราส่วน คือ 3:2 และ 1:1 เพื่อศึกษาขนาดและลักษณะรูปร่างของอนุภาคแคลเซียมซิเทรตที่เหมาะสม



รูปที่ 3.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตในอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออน เท่ากับ 3:2 ที่กำลังขยาย 15000 (ข) แคลเซียมไอออน:ซิเทรตไอออน เท่ากับ 3:2 ที่กำลังขยาย 30000 (ค) แคลเซียมไอออน:ซิเทรตไอออน เท่ากับ 1:1 ที่กำลังขยาย 15000 (ง) แคลเซียมไอออน:ซิเทรตไอออน เท่ากับ 1:1 ที่กำลังขยาย 30000

ผลการทดลองจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่าอนุภาคแคลเซียมซิเทรตในอัตราส่วนโมลระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออนที่ 3:2 อนุภาคของแคลเซียมซิเทรตมีรูปร่างเป็นก้อนติดกัน มีขนาดใหญ่อยู่ในระดับไมโครเมตร ขณะที่อนุภาคแคลเซียมซิเทรตในอัตราส่วนโมลระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออนที่ 1:1 อนุภาคของแคลเซียมซิเทรตมีรูปร่างกลม ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100-250 นาโนเมตร ผู้ทดลองจึงเลือกอัตราส่วนนี้ เพื่อใช้ทดสอบการปลดปล่อยสารฟลูออเรส-เซนต์

ในการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์แคลเซียมซิเทรต จะต้องใช้อัตราส่วนโมลของแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออนเท่ากับ 3:2 จึงจะเกิดปฏิกิริยาพอดี แสดงในสมการดังนี้

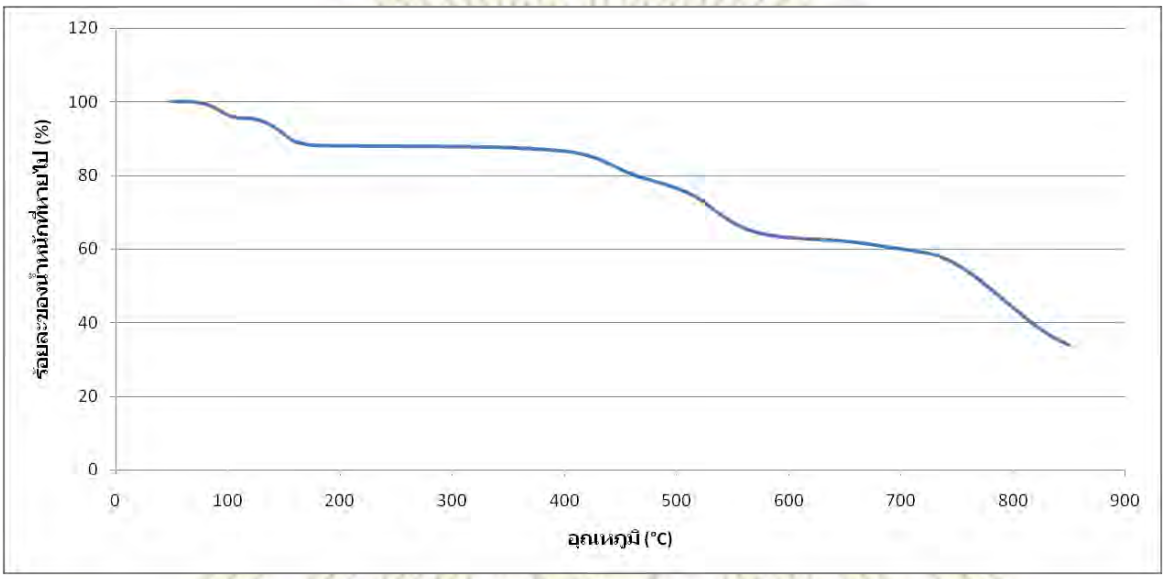
$$3CaCl_{2(aq)} + 2Na_3C_6H_5O_{7(aq)} \longrightarrow Ca_3(C_6H_5O_7)_{2(s)} + 6NaCl_{(aq)}$$

แคลเซียมซิเทรตที่สังเคราะห์ได้ มีน้ำหนัก 0.3170 กรัม คิดเป็น 64% yield สาเหตุที่ %yield มีค่าไม่สูงมากนั้น เนื่องจากในขั้นตอนการทดลอง ปฏิกิริยาการเกิดอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตจะเกิดอย่างช้า ๆ โดยสารละลายใส จนกระทั่งผ่านไป 1 ชั่วโมง สารละลายเริ่มขุ่น และจะขุ่นทึบแสงเมื่อผ่านไป 2 ชั่วโมง ในขณะเกิดอนุภาคนาโน ปริมาณซิเทรตที่มากเกินพอจะล้อมรอบอนุภาคแคลเซียมซิเทรตทำให้เกิดเป็น nucleation ที่มีขนาดเล็ก ซึ่งในการเกิด nucleation อาจจะมีอนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กกว่า 50 นาโนเมตร เกิดขึ้น ทำให้ในขั้นตอนการล้างอนุภาคแคลเซียมซิเทรต ถูกชะล้างออกไป ทำให้ส่งผลต่อ %yield ที่ได้

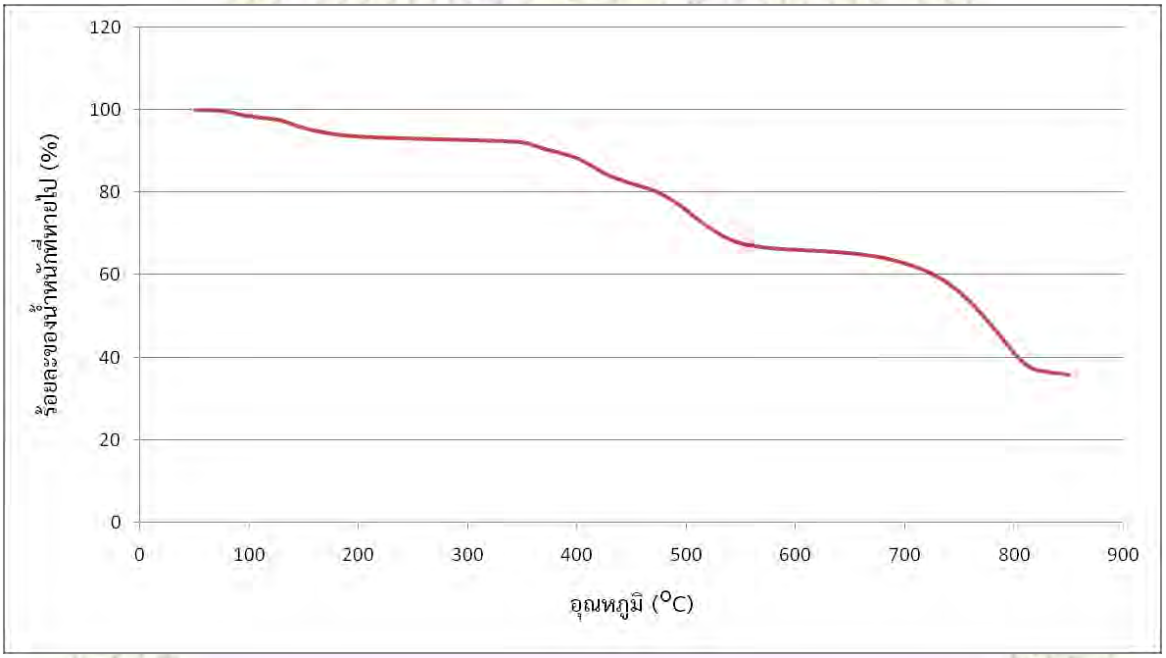
สาเหตุที่อนุภาคแคลเซียมซิเทรตที่สังเคราะห์จากอัตราส่วนโมลระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออนที่ 1:1 อยู่ในระดับนาโนเมตรและอนุภาคมีรูปร่างกลม เนื่องจากปริมาณซิเทรตที่เหลือในการเกิดปฏิกิริยา จะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดผลึกของแคลเซียมซิเทรตที่ใหญ่ ประกอบกับโครงสร้างของซิเทรตที่มีความเกะกะ สามารถป้องกันการรวมกัน (aggregate) ของแคลเซียมซิเทรตที่อาจทำให้อนุภาคใหญ่ขึ้นได้ ทำให้อนุภาคแคลเซียมซิเทรตที่เกิดขึ้นเสถียร (stabilize)

3.2 วิเคราะห์หา %FITC ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA)

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA) ของสารตัวอย่าง 2 ชนิด คือ แคลเซียมซิเทรตและ แคลเซียมซิเทรตที่ฝังสีย้อม FITC ไว้ภายใน แสดงด้วยกราฟต่อไปนี้



รูปที่ 3.2 ร้อยละของน้ำหนักที่เสียไปที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรต



รูปที่ 3.3 ร้อยละของน้ำหนักที่เสียไปที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตที่ฝังสีย้อม FITC

จากผลการวิเคราะห์ TGA ในรูปที่ 3.1 แคลเซียมซิเทรตจะให้การสลายตัวครั้งแรกที่อุณหภูมิ 80-120 องศาเซลเซียส และครั้งที่สองที่อุณหภูมิ 120-180 องศาเซลเซียส แสดงถึงการสลายตัวของน้ำในโมเลกุลของแคลเซียมซิเทรตที่อยู่ในรูปผลึกของ แคลเซียมซิเทรตเตตระไฮเดรต ($[Ca_3(C_6H_5O_7)_2(H_2O)_2]\cdot 2H_2O$)[4] ดังสมการ

$$[Ca_3(C_6H_5O_7)_2(H_2O)_2]\cdot 2H_2O_{(s)} \longrightarrow Ca_3(C_6H_5O_7)_2\cdot 2H_2O_{(s)} + 2H_2O_{(g)} \longrightarrow Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + 2H_2O$$

ที่อุณหภูมิ 398-560 องศาเซลเซียส เป็นกราฟเอกลักษณ์การสลายตัวของแคลเซียมซิเทรตเปลี่ยนเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต ดังสมการ

$$Ca_3(C_6H_5O_7)_{2(s)} \longrightarrow 3CaCO_{3(s)} + 5H_2O_{(g)} + 9C_{(s)}$$

การสลายตัว ณ อุณหภูมิที่ 620-755 องศาเซลเซียส เป็นการสลายตัวของแคลเซียมคาร์บอเนตเกิดเป็นแคลเซียมออกไซด์[9] ดังสมการ

$$CaCO_{3(s)} \longrightarrow CaO_{(s)} + CO_{2(g)}$$

ในขณะที่รูปที่ 3.3 เป็นกราฟการสลายตัวของแคลเซียมซิเทรตที่ฝังสีย้อม (FITC) มีการสลายตัวที่อุณหภูมิ 345-395 องศาเซลเซียสเพิ่มมา แสดงถึงการสลายตัวของสีย้อม FITC ซึ่งมีร้อยละของน้ำหนักที่เสียไปประมาณ 3.5% โดยน้ำหนัก

3.3 ค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของแคลเซียมซิเทรต (Zeta potential)

ตารางที่ 3.1 แสดงค่า Zeta potential ของแคลเซียมซิเทรต

สารตัวอย่าง	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV)
แคลเซียมซิเทรต	-9.25
แคลเซียมซิเทรตที่ฝังสีย้อม (FITC)	-8.54

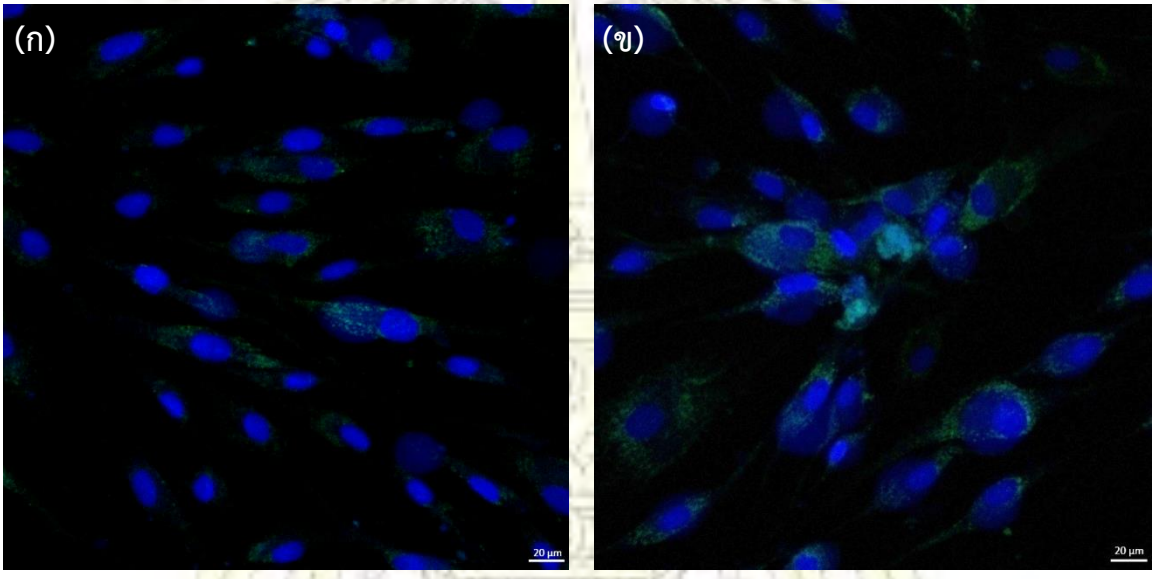
จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวแคลเซียมซิเทรตและแคลเซียมซิเทรตที่ฝังสีย้อม FITC มีค่าอยู่ในช่วงลบ แสดงถึงประจุลบจากหมู่คาร์บอกซิลิกในซิเทรต ทำให้แคลเซียมซิเทรตสามารถทำให้กระจายตัวในน้ำได้ง่าย

3.4 การเปรียบเทียบความสามารถในการกระจายของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตและแคลเซียมคาร์บอเนตในน้ำ

รูปที่ 3.4 แสดงความสามารถในการกระจายของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตและแคลเซียมคาร์บอเนตในน้ำ (ก) ถ่ายภาพ ณ ชั่วโมงที่ 1 (ข) ถ่ายภาพ ณ ชั่วโมงที่ 4

จากรูปที่ 3.4 เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเท่ากันที่ 0.1% และ 1.0% โดยมวลต่อปริมาตรของแคลเซียมซิเทรตและแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าที่เวลา 1 ชั่วโมง สารละลายทุกหลอดมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ แต่เมื่อผ่านไปที่เวลา 4 ชั่วโมง จะเห็นว่าแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.1% โดยมวลต่อปริมาตรมีตะกอนขาวอยู่ที่ก้นหลอดและจะเห็นได้ชัดเจนที่แคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1.0% โดยมวลต่อปริมาตร ในขณะที่แคลเซียมซิเทรตเมื่อเวลาผ่านไป ไม่พบตะกอนที่ก้นหลอด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแคลเซียมซิเทรตมีการกระจายตัวที่มีประสิทธิภาพดีกว่าแคลเซียมคาร์บอเนต

3.5 การทดสอบการปลดปล่อยสารฟลูออเรสเซนต์ของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตในเซลล์



รูปที่ 3.5 แสดงภาพเซลล์ที่บ่มด้วยแคลเซียมซิเทรตฝัง FITC ไว้ภายใน จากกล้อง confocal laser scanning หลังจากผ่านไปเป็นเวลา (ก) 24 ชั่วโมง (ข) 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 3.5 สีน้ำเงินคือ ฟลูออเรสเซนต์จาก 4',6-diamidino-2-phenylindole หรือ DAPI เป็นสารที่ใช้ย้อมนิวเคลียส มีคุณสมบัติผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (membrane permeability)[10] สีเขียวเป็นฟลูออเรสเซนต์จากสีย้อม FITC จากรูปพบว่าภายในไซโทพลาซึม มีสารฟลูออเรสเซนต์ FITC เรืองแสงออกมาแสดงถึงแคลเซียมซิเทรตถูกย่อยสลายได้ด้วยไลโซโซมภายในเซลล์ อีกทั้งแคลเซียมซิเทรตที่ใส่ลงไปในเซลล์นาน 48 ชั่วโมง ให้ฟลูออเรสเซนต์ที่มากกว่า 24 ชั่วโมง แสดงถึงแคลเซียมซิเทรตถูกย่อยสลายมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจากผลการทดลองดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าแคลเซียมซิเทรตสามารถเป็นสารตัวพา นำสารฟลูออเรสเซนต์เข้าสู่เซลล์และมีความเข้ากันได้กับเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตฝังสีย้อม FITC ที่มีรูปร่างกลมและมีขนาดอยู่ในช่วง 100-250 นาโนเมตร โดยอัตราส่วนการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออนส่งผลต่อขนาดอนุภาคแคลเซียมซิเทรต กล่าวคืออนุภาคแคลเซียมซิเทรตที่สังเคราะห์จากอัตราส่วนโมลระหว่างแคลเซียมไอออนและซิเทรตไอออน เท่ากับ 1:1 อนุภาคแคลเซียมซิเทรตอยู่ในระดับนาโนเมตร ผลิตภัณฑ์ถูกนำมาวิเคราะห์ Thermal gravimetric analysis พบว่า ลักษณะการสลายตัวเป็นเอกลักษณ์ของการสลายตัวของแคลเซียมซิเทรตและหาปริมาณสีย้อมในแคลเซียมซิเทรต เท่ากับ 3.5% โดยน้ำหนัก หรือ 5.1% โดยโมล เมื่อนำไปทดสอบการปลดปล่อยสารฟลูออเรสเซนต์ของอนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตในเซลล์ พบว่าสารละลายแคลเซียมซิเทรตมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อและสารสีย้อม FITC สามารถปลดปล่อยฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์ผ่านกล้อง Confocal อนุภาคนาโนแคลเซียมซิเทรตถูกระบุเอกลักษณ์ด้วยเทนนิคอื่นๆเช่น Zetapotential เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Solmaz Maleki Dizaj.; Mohammad Barzegar-Jalali.; Mohammad Hossein.; Zarrintan.; Khosro Adibkia.; Farzaneh Lotfipour. Calcium carbonate nanoparticlesas cancer drug delivery system. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2015**, *12*, 1649-1660.
2. Robert P. Heaney.; M. Susan Dowell.; June Bierman.; Cecilia A. Hale.; Adrianne Bendich. Absorbability and Cost Effectiveness in Calcium Supplementation. *Journal of the American College of Nutrition* **2013**, *20*, 239-246.
3. Eberhardt Herdtweck.; Tobias Kornprobst.; Roland Sieber.; Leo Straver.; Johann Plank. Crystal Structure, Synthesis, and Properties of *tri*-Calcium *di*-Citrate *tetra*-Hydrate $[Ca_3(C_6H_5O_7)_2(H_2O)_2]\cdot 2H_2O$. *Zeitschrift fur anorganische und allgemeine chemie* **2011**, *637*, 655–659.
4. Stefan Wilhelm. Confocal Laser Scanning Microscopy by Zeiss. *Carl zeiss microimaging GMbH*; Jena; Germany, **2010**; Vol.35; p 5.
5. Junfeng Li.; Yuqing Liu.; Yang Gao.; Liangzhao Zhong.; Qin Zou.; Xuefei Lai. Preparation and Properties of Calcium Citrate Nanosheets for Bone Graft Substitute. *Bioengineered* **2016**, *7* (5), 376-381.
6. Fluorescein (FITC) https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/fluorescein.html, 17 November 2016.
7. Zetapotential http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.html, 17 April 2017.
8. Hunter R.J. Foundations of Colloid Science. Oxford University Press, 1989 ISBN 0198551894.
9. Lina Zhao.; Yaodan Zhang.; Yang Miao.; Lijun Nie. Controlled synthesis, characterization and application of hydrophobic calcium carbonate nanoparticles in PVC. *Powder Technology* **2016**, *288*, 184-190.
10. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* **1995**, *70*(5), 220-230.

ประวัติผู้วิจัย

นายณัฐชนน หริ่มสืบ เกิดเมื่อวันที่ 3 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดนครนายก สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 500/1 สมจิตแมนชั่น แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10400 อีเมล natchanon_top@hotmail.com