



การศึกษาสภาวะสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซิลิเนียมจากสารสกัดกระเทียม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

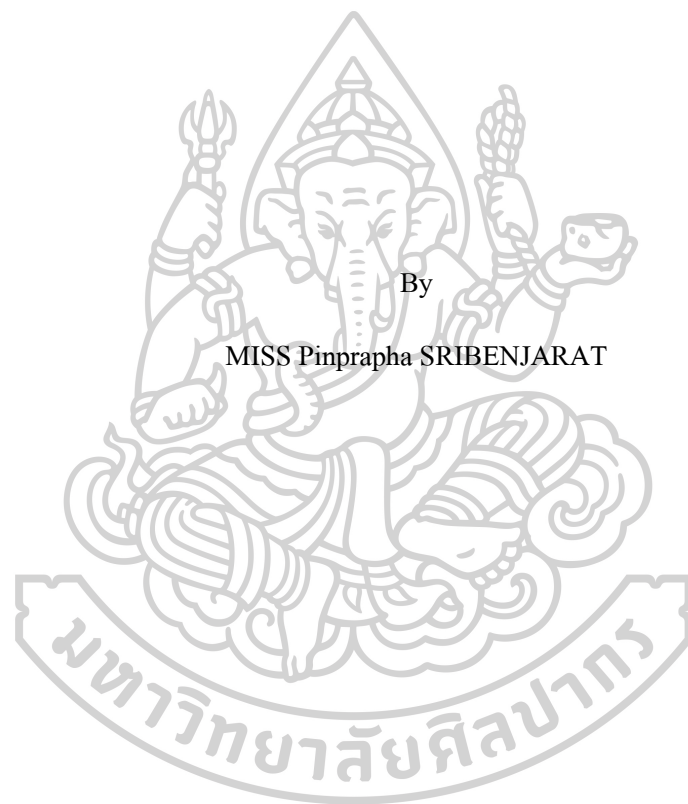
การศึกษาภาวะตั้งคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัด
กระเทียม



โดย
นางสาวปิ่นประภา ศรีเบ็ญจรัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

STUDY OF SYNTHETIC CONDITIONS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF
SELENIUM NANOPARTICLES FROM GARLIC EXTRACT.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2019
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ การศึกษาสภาวะสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโน
ซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม
โดย ปิ่นประภา ศรีเบ็ญจรัตน์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบ โดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุศรินทร์ เหมะปะบุตร)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกตัสกร ดร.กฤษณ์ ธิรพันธุ์เมธี)

60401202 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : อนุภาคนาโนซีลีเนียม, ด้านมะเร็ง, ด้านแบคทีเรีย, สารสกัดกระเทียม

นางสาว ปิ่นประภา ศรีเบญจรัตน์: การศึกษาสภาวะสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์

สารสกัดกระเทียมมีสารองค์ประกอบ Phenolic (3.09 ± 0.02 mg GAE/ g) และ Flavonoids (0.045 ± 0.01 mg CE/ g) ที่สามารถเป็นตัวรีดิวซ์และตัวหุ้มในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมได้ อย่างไรก็ตาม สมบัติรีดิวซ์ของกระเทียมมีค่าต่ำ ทำให้ต้องเสริมด้วย ascorbic acid ในการกระตุ้นปฏิกิริยาเปลี่ยน Se^{4+} ไปเป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียม Se^0 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่มีฤทธิ์จำเพาะยับยั้งเซลล์มะเร็ง ทำโดยการคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเทียบกับเซลล์ปกติของอนุภาคที่ได้จากการสังเคราะห์ สภาวะการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม คือ 1) ความเข้มข้นของ sodium selenite (10, 20 และ 30 mM) 2) ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม (2.5, 3 และ 4 mg/ml) 3) ความเป็นกรด-ด่าง (pH 4, 6, 8, 10 และ ไม่ปรับ pH) และ 4) เวลาที่ใช้ในการบ่มอนุภาคนาโนซีลีเนียม (4, 48 และ 72 ชั่วโมง) พบว่าได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์คือ สภาวะใช้ sodium selenite ความเข้มข้น 10 mM และสารสกัดกระเทียมความเข้มข้น 3 mg/ml และ ไม่ปรับ pH ในระยะเวลาบ่มสังเคราะห์ 72 ชั่วโมง บน shaker ในที่มีดที่อุณหภูมิห้อง อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์นำมาศึกษาลักษณะสมบัติของอนุภาคด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดโดยใช้ UV-visible spectroscopy วิเคราะห์ลักษณะรูปร่าง ขนาด และธาตุที่เป็นองค์ประกอบด้วยเทคนิค SEM และ EDS พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมมีการดูดกลืนแสงที่ 270 nm มีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาด 11-70 nm มีธาตุซีลีเนียมเป็นสารประกอบที่ตำแหน่ง 1.4 KeV และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR พบสารสกัดกระเทียมในอนุภาค โดยมีหมู่ฟังก์ชัน OH, N-O, C-O-H และ S=O ที่คาดว่ามีส่วนทำหน้าที่เป็นตัวหุ้ม (capping agent) อนุภาคนาโนซีลีเนียม จากการวิเคราะห์พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมมีค่าศักย์ซีต้า และค่า PDI เท่ากับ -23.67 ± 0.81 mV และ 0.181 ตามลำดับ ซึ่งจะพิจารณาได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมมีความเสถียรในระดับปานกลาง (moderately stable) และมีการกระจายตัวของอนุภาคแบบ monodisperse อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ดี ขณะที่แสดงพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ (MRC-5) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay โดยความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมพบมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ โดยให้ค่า selective index มากกว่า sodium

selenite สารสกัดกระเทียม และยา Tamoxifen จึงคาดว่าอาจนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมหรือยา ยับยั้งมะเร็งได้ดี อย่างไรก็ตาม ไม่พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมที่ สังเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งอาจเป็นผลจากการหุ้มที่มีปริมาณกระเทียมน้อย ร่วมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลของกระเทียมสกัดที่มีฤทธิ์ต่ำ ฤทธิ์การยับยั้ง *S.aureus* ของอนุภาคนาโน ซิลิเนียมกระเทียมด้วยวิธี agar diffusion และการวัดความชุ่มของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีฤทธิ์ในการ ยับยั้ง *S.aureus* ได้ดี ความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งและยับยั้งแบคทีเรีย เป็นผลจากการเป็น pro- oxidant ของอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียม อย่างไรก็ตาม อนุภาคที่สังเคราะห์มีความไม่เสถียรใน สภาวะเก็บแบบผงแห้งในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง โดยสามารถเก็บได้ไม่เกิน 120 วัน ที่ยังคง ฤทธิ์เลือกทำลายเซลล์มะเร็งได้ดี โดยเป็นช่วงเวลาเก็บที่อนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมมีความ ปลดออกยดี



60401202 : Major (BIOTECHNOLOGY)

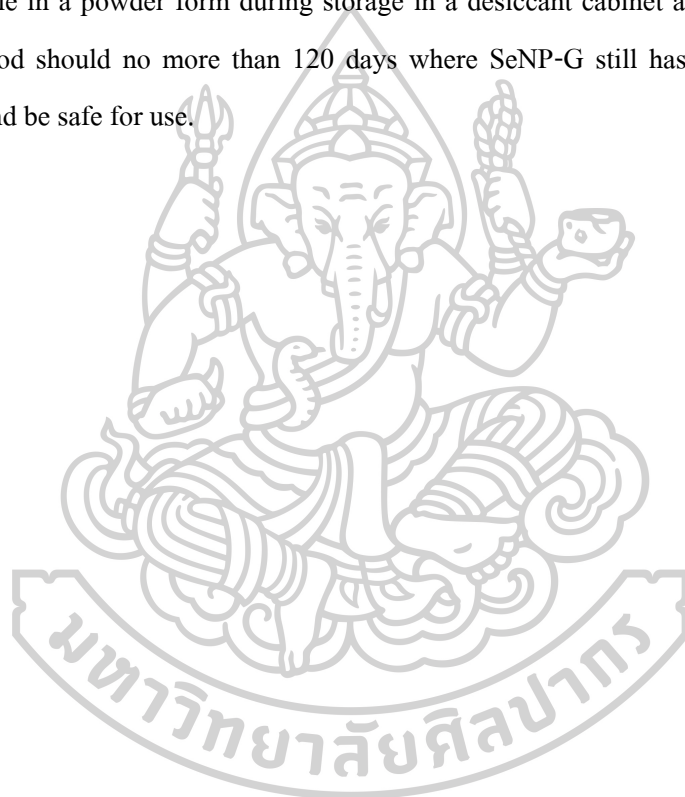
Keyword : Selenium nanoparticles, Anticancer, Antibacterial, Garlic extract

MISS PINPRAPHA SRIBENJARAT : STUDY OF SYNTHETIC CONDITIONS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF SELENIUM NANOPARTICLES FROM GARLIC EXTRACT.

THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR KALYANEE JIRASRIPONGPUN

Garlic extract contained Phenolic (3.09 ± 0.02 mg GAE / g) and Flavonoids (0.045 ± 0.01 mg CE / g) that could be a reducing agent and capping agent in the synthesis of garlic selenium nanoparticles. However, the reducing property of garlic extract was low and it must be supplemented with ascorbic acid to stimulate the reaction in converting Se^{4+} to selenium nanoparticles Se^0 . The optimal condition for synthesis of selenium nanoparticles with selectively cancer cells inhibition was performed by screening cancer cell inhibition of the synthesized particles in comparison with normal cells. The conditions studied for selenium nanoparticles synthesis were: 1) Concentration of sodium selenite (10, 20 and 30 mM) 2) Concentration of garlic extract (2.5, 3 and 4mg / ml) 3) Acidity - alkalinity (pH 4, 6, 8, 10 and no pH adjusting) and 4) Time periods for curing selenium nanoparticles (4, 48 and 72 hours). The optimum conditions for nanoparticles synthesis were found at the condition of using 10 mM sodium selenite, garlic extracts at 3 mg / ml, no pH adjusting of the reactant solution and the synthesis period of 72 hours on the shaker in the dark at room temperature. The obtained synthetic nanoparticles were studied for its characteristic. The maximum absorbance was measured using UV-visible spectroscopy, shape and size, including elemental composition was analyzed using SEM and EDAX techniques. The selenium garlic nanoparticles (SeNP-G) had absorbance at 270 nm, its shape was spherical with size of 11-70 nm. It contains selenium as determined at 1.4 KeV. The FTIR technique reported garlic extract in the particles, and the functional groups OH, N-O, C-O-H and S=O demonstrated role of garlic extract as a capping agent in the synthesis of SeNP-G. The analysis found that the selenium nanoparticles had the zeta potential and the PDI values were -23.67 ± 0.81 mV and 0.181 respectively, which can be considered that the selenium nanoparticles from garlic extracts are moderately stable and have the distribution of monodisperse particles. The selenium nanoparticles from garlic extract exhibited growth inhibition of cancer cells (HepG2) and breast cancer cells (MCF-7) while demonstrated low toxicity to normal cells (MRC-5) as analyzing by MTT assay. The ability to inhibit cancer cells of SeNP-G was more specific to cancer cells rather than normal

cells by providing a selective index greater than sodium selenite, garlic extracts and Tamoxifen. It was expected that SeNP-G may be developed as a dietary supplement or a cancer inhibitor agent. However, the antioxidant activity of SeNP-G was none as determined by DPPH assay; this may be the result of a coat that had a small amount of garlic extract, together with the low antioxidant activity of garlic extract itself. The *S.aureus* inhibition of SeNP-G by agar diffusion and the turbidity assay showed good inhibitory effect on *S.aureus*. The inhibition activity against cancer cells and bacteria was due to pro-oxidant property of SeNP-G. However, the synthetic particles were unstable in a powder form during storage in a desiccant cabinet at room temperature. The storage period should no more than 120 days where SeNP-G still has cancer cells selectively inhibition and be safe for use.



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิระศรีพงษ์พันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร.นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุศรินทร์ เมฆะปะบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จเรียบร้อย

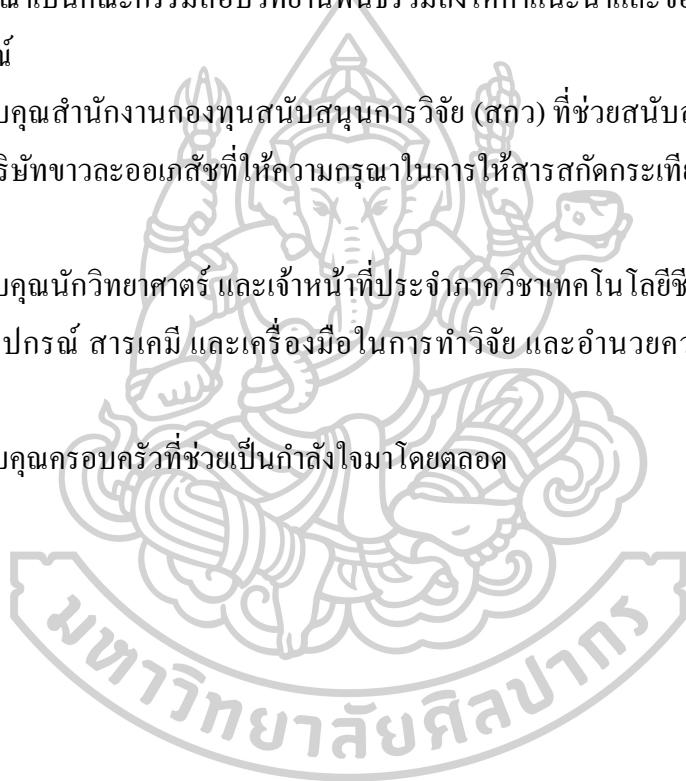
ขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริพร พงศ์ทองผาสุข ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษัชร ดร.กฤษณ์ ธิรพันธุ์เมธี ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์รวมถึงให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ช่วยสนับสนุนงานวิจัยให้งานวิจัยนี้เกิดขึ้น และบริษัทชาวละอองเกสรที่ให้ ความกรุณาในการให้สารสกัดกระเทียมใช้ในการทำงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

ขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องของอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือในการทำวิจัย และอำนวยความสะดวกในการดำเนินเอกสารต่างๆ

ขอบคุณครอบครัวที่ช่วยเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ปิ่นประภา ศรีเบ็ญจรัตน์



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง	๗
สารบัญรูปภาพ	๘
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้จากงานวิจัย.....	3
บทที่ 2	4
เอกสารที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 นาโนเทคโนโลยี.....	4
2.2 ซีลีเนียม (Selenium).....	5
2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม	7
2.3.1 วิธีทางเคมี.....	8
2.3.2 วิธีทางกายภาพ.....	8
2.3.3 วิธีทางชีวภาพ	8
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์.....	10

2.4.1 ผลของความความเป็นกรด-ด่าง.....	10
2.4.2 ความเข้มข้นของสารฟีนอล.....	11
2.4.3 อุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยา.....	11
2.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมและการพิสูจน์เอกลักษณ์ (Characterizations).....	12
2.5.1 ค่าการดูดกลืนแสง.....	12
2.5.2 Scanning Electron Microscope.....	13
2.5.3 Energy Dispersive Spectroscopy (EDS).....	14
2.5.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	14
2.5.5 Zeta potential และค่า PDI.....	15
2.6 ฟีนอลที่ใช้ในการสังเคราะห์ (กระเทียม).....	17
2.7 ฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซิลิเนียม.....	18
2.7.1 ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....	18
2.7.2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย.....	19
2.7.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ.....	19
2.8 ยาต้านมะเร็ง Tamoxifen.....	20
บทที่ 3.....	22
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	22
3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี.....	22
3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	22
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	23
3.1.3 ฟีนอลที่ใช้ในการทดลอง.....	24
3.1.4 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง.....	24
3.2 การศึกษาสารองค์ประกอบหลักของฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	25
3.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method.....	25

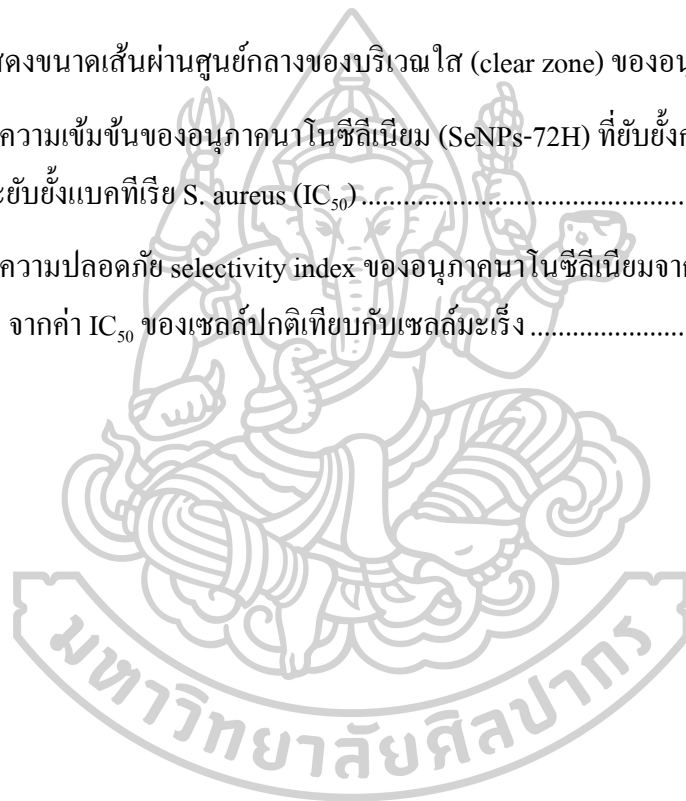
3.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ total flavonoid ด้วยวิธี Aluminium chloride method	26
3.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถรีดิวซ์ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay....	26
3.2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	26
3.2.4.1 วิธี DPPH.....	26
3.2.4.2 วิธี ABTS.....	27
3.3 การศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม	27
3.3.1 ความเข้มข้นของ Sodium selenite ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม	27
3.3.2 ความเข้มข้นของสารพิษที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม	28
3.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซิลิเนียม.....	28
3.4.1 การศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนซิลิเนียม.....	28
3.4.2 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเทียบกับยาด้านมะเร็ง .	28
3.4.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	29
3.4.3.1 วิธี Agar diffusion.....	29
3.4.3.2 วัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Turbidity assay).....	29
3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลิเนียม	30
3.5.1 UV-visible spectrophotometer	30
3.5.2 Scanning Electron Microscope	30
3.5.3 Energy Dispersive Spectroscopy (EDS/EDX).....	30
3.5.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	30
3.5.5 Zeta potential และ PDI	31
3.6 การศึกษาศักยภาพการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง	31
3.7 วิเคราะห์ทางสถิติ.....	31
บทที่ 4	32
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	32

4.1 การศึกษาสารองค์ประกอบหลักและความสามารถรีดิวซ์ของสารสกัดกระเทียม	32
4.1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method	32
4.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ total flavonoid ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric method	32
4.1.3 ความสามารถรีดิวซ์ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay	33
4.2 การศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม	34
4.2.1 ผลความเข้มข้นของ sodium selenite ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม	34
4.2.2 ผลความเข้มข้นของสารพืชที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม	39
4.2.3 ความเป็นกรด – ด่างที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม	41
4.2.4 เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม	45
4.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียม	48
4.3.1 สมบัติทางกายภาพ	48
4.3.2 สมบัติต้านอนุมูลอิสระ	51
4.3.2.1 วิธี ABTS	51
4.3.2.2 วิธี DPPH	52
4.3.3 สมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง	53
4.3.4 สมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	56
4.4 การศึกษาอายุการเก็บรักษาอนุภาคนาโนซิลิเนียมต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ	58
บทที่ 5	60
สรุปผลการทดลอง	60
รายการอ้างอิง	62
ประวัติผู้เขียน	70

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่า PDI, Zeta potential และขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ด้วยสารสกัดพืชชนิดต่างๆ	15
ตารางที่ 2 ค่าความปลอดภัย selectivity index ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม จากค่า IC_{50} ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็ง.....	56
ตารางที่ 3 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม...56	
ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม (SeNPs-72H) ที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติ (MRC-5) และยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> (IC_{50}).....	58
ตารางที่ 5 ค่าความปลอดภัย selectivity index ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่เวลาเก็บต่างๆ จากค่า IC_{50} ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็ง	59



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ประเภทของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์จากโลหะประเภทต่างๆและฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาค (Shah, Fawcett et al. 2015).....	4
รูปที่ 2 แสดงกลไกของการสังเคราะห์อนุภาคโลหะด้วยวิธีทางชีวภาพ	9
รูปที่ 3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะทางวิธีชีวภาพจากพืช	10
รูปที่ 4 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สัมพันธ์กับสีและขนาดของอนุภาค	13
รูปที่ 5 กระจาเทียม	18
รูปที่ 6 ยากลุ่ม SERMS แย่งจับ estrogen receptor กับ estrogen	20
รูปที่ 7 กระบวนการทำให้เกิดการคือยา Tamoxifen	21
รูปที่ 8 เซลล์มะเร็งตับ (HepG2).....	24
รูปที่ 9 เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7).....	25
รูปที่ 10 เซลล์ปอด (MRC-5).....	25
รูปที่ 11 แสดงสภาวะที่ใส่ sodium selenite และสารสกัดกับกระจาเทียม (A) และสภาวะที่ใส่ sodium selenite และ ascorbic acid (B) อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง แสดงการจับกลุ่มอนุภาคตามลูกศร.....	34
รูปที่ 12 สารละลายอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสภาวะการใส่ sodium selenite ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM ที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง.....	35
รูปที่ 13 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ความเข้มข้นของ sodium selenite ที่ 10, 20 และ 30 mM ที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง.....	36
รูปที่ 14 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะการสังเคราะห์ให้ sodium selenite 10 mM (A), สภาวะการสังเคราะห์ให้ sodium selenite 20 mM (B) และสภาวะการสังเคราะห์ให้ sodium selenite 30 mM (C) บ่ม 72 ชั่วโมง.....	37
รูปที่ 15 Energy dispersive Spectrometry (EDS) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะการสังเคราะห์ให้ sodium selenium 10 mM (A), 20 mM (B) และ 30 mM บ่ม 72 ชั่วโมง	38

รูปที่ 16 ค่า IC ₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ใช้ความเข้มข้นของ Sodium selenite แตกต่างกัน บ่ม 72 ชั่วโมงของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งค่า IC ₅₀ ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3) โดยเปรียบเทียบสารชุดเดียวกันกับเซลล์ไลน์ต่างกัน	39
รูปที่ 17 สารละลายอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะการสังเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมต่างๆ ที่บ่ม 48 ชั่วโมง (A) และ 72 ชั่วโมง (B).....	40
รูปที่ 18 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ใช้ความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมที่ 2.5, 3 และ 4 mg/ml ที่เวลาบ่ม 48 และ 72 ชั่วโมง.....	40
รูปที่ 19 ค่า IC ₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมแตกต่างกันและเวลาบ่ม 48 และ 72 ชั่วโมงของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งค่า IC ₅₀ ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3) โดยเปรียบเทียบสารชุดเดียวกันกับเซลล์ไลน์ต่างกัน.....	41
รูปที่ 20 สารละลายอนุภาคที่สภาวะปรับ pH 4, 6, 8, 10 และไม่ปรับ pH บ่ม 72 ชั่วโมง	42
รูปที่ 21 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ปรับ pH 4, 6, 8, 10 และไม่ปรับ pH บ่ม 72 ชั่วโมง	43
รูปที่ 22 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ปรับ pH4 (A), pH8 (B), pH10 (C) และไม่ปรับ pH (D).....	44
รูปที่ 23 ค่า IC ₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่มีการปรับ pH แตกต่างกันและเวลาบ่ม 72 ชั่วโมงของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งค่า IC ₅₀ ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3) โดยเปรียบเทียบสารชุดเดียวกันต่อเซลล์ไลน์ที่ต่างกัน	44
รูปที่ 24 สารละลายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่ม 4 ชั่วโมง (A), 48 ชั่วโมง (B) และ 72 ชั่วโมง (C)	45
รูปที่ 25 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มต่างๆ.....	46
รูปที่ 26 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะการสังเคราะห์ที่เวลา 4 ชั่วโมง (A), เวลา 48 ชั่วโมง (B) และเวลา 72 ชั่วโมง (C)	47

รูปที่ 27 ค่า IC ₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มแตกต่างกันต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งค่า IC ₅₀ ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3).....	48
รูปที่ 28 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมและสารสกัดกระเทียม.....	49
รูปที่ 29 ผลวิเคราะห์ EDS ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม.....	49
รูปที่ 30 ผลวิเคราะห์ FTIR ของสารสกัดกระเทียม (A) และอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม (B).....	51
รูปที่ 31% ABTS scavenging ของสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3).....	52
รูปที่ 32 %DPPH inhibition ของสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ (n=3).....	53
รูปที่ 33 ค่า IC ₅₀ ของ sodium selenite (A) และสารสกัดกระเทียม (B) ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3).....	54
รูปที่ 34 ค่า IC ₅₀ ของยา Tamoxifen และอนุภาคนาโนซีลีเนียมต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ตัวอักษร (a, b และ c) ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3).....	55
รูปที่ 35 %การยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะบ่ม 72 ชั่วโมง (A), สารสกัดกระเทียม (B) และ sodium selenite (C) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3).....	57
รูปที่ 36 ค่า IC ₅₀ ของอายุการเก็บรักษาของอนุภาคนาโนซีลีเนียมต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) (รูปเล็กกรุปขยายของวันที่ 140 ถึง 180 วัน).....	59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ร่างกายของคนเรามีโอกาสพัฒนาเกิดโรคมะเร็งได้จากปัจจัยภายนอก เช่น การได้รับสารเคมีในควันบุหรี่และเขม่ารถยนต์ การรับรังสีต่างๆรวมทั้งรังสีอัลตราไวโอเลตในแสงแดด ที่ต่างส่งผลให้สารพันธุกรรมของเซลล์เกิดความผิดปกติ ร่วมกับปัจจัยจากภายในร่างกายที่กระบวนการกำจัดซ่อมแซมเซลล์ผิดปกติบกพร่อง หรือการหลุดรอดของระบบตรวจสอบหรือภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในการกำจัดเซลล์ผิดปกติออกจากร่างกาย จะส่งผลให้เซลล์ผิดปกติอยู่รอดและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในลักษณะควบคุมไม่ได้ แล้วเกิดการเจริญลุกลามแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย ส่งผลรบกวนเซลล์ปกติของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ให้ทำงานล้มเหลวและนำไปสู่การเสียชีวิต ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งมีหลายวิธี เช่น การใช้ยาเคมีบำบัด และยาที่มีหลายชนิดที่คุณสมบัติแตกต่างกัน แต่ยาเคมีบำบัดมักออกฤทธิ์เฉพาะเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเท่านั้น อย่างไรก็ตาม เซลล์ปกติในร่างกายบางชนิดก็มีการแบ่งตัวต่อเนื่องเช่นกัน ส่งผลให้เกิดผลข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปากอักเสบ เบื่ออาหาร ภูมิคุ้มกันต่ำ ท้องเสียและ ผอมลง นอกจากนี้ ยาที่ใช้รักษามะเร็งยังทำให้เกิดการฟื้นคืนกลับของเซลล์มะเร็งได้ โดยพบร้อยละ 40 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีการพัฒนาของโรคจนเกิดการคือต่อยามีอ็อกซิเฟนที่ใช้รักษา แล้วนำไปสู่การลุกลามและแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ด้วยเหตุนี้ โรคมะเร็งจึงยังคงจัดเป็นอันดับ 1 ของสาเหตุการเสียชีวิตในคนไทย นับตั้งแต่ปี 2542 จนถึงปัจจุบัน และมีแนวโน้มผู้ป่วยและเสียชีวิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมะเร็งตับจัดเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยเพศชายโดยมีอัตราผู้ป่วยเสียชีวิต 110.10 ต่อประชากร 100,000 คน และมะเร็งเต้านมพบมากที่สุดของผู้ป่วยเพศหญิงโดยเสียชีวิต 124.48 ต่อประชากร 100,000 คน (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ 2560)

ปัจจุบันเทคโนโลยีนาโนเริ่มมีบทบาทนำมาใช้ทางการแพทย์มากขึ้น จากอนุภาคขนาดเล็กในช่วง 1-100 นาโนเมตร ซึ่งมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่พิเศษแตกต่างไปจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากอนุภาคขนาดเล็กมีพื้นที่ผิวสัมผัสสูง และสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีบริเวณพื้นผิวได้ดี (Wang, Neogi et al. 2006) อนุภาคนาโนสามารถสังเคราะห์ได้จากหลากหลายโลหะและทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เช่น อนุภาคนาโนเงินมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ไวรัสและต้านมะเร็ง อนุภาคนาโนโลหะแพลทินัมมีฤทธิ์เป็นตัวเร่งชีวภาพและอนุภาคนาโนซิลิเนียมมีฤทธิ์ต้านมะเร็งและต้านจุลชีพ (Mittal, Chisti et al. 2013) เป็นต้น การพัฒนาอนุภาคนาโน เพื่อให้ได้อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและจุลชีพ สำหรับการศึกษาวิจัยนี้เลือกใช้โลหะซิลิเนียมใน

การพัฒนาเป็นอนุภาคนาโน เนื่องจากซีลีเนียมเป็นธาตุที่จำเป็นต่อสุขภาพของร่างกาย โดยเป็นสารองค์ประกอบของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย และ selenoprotein ที่อาจสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดการพัฒนาเป็นมะเร็งจากปัจจัยเสี่ยงต่างๆได้ จึงมีการนำซีลีเนียมมาเป็นอาหารเสริมในรูปแบบต่างๆ ทั้งซีลีเนียมอนินทรีย์ (selenate และ selenite) และซีลีเนียมอินทรีย์ (selenomethionine และ selenocysteine) อย่างไรก็ตาม ซีลีเนียมมีความเป็นพิษ การบริโภคเป็นปริมาณมาก (400 µg/day) ติดต่อกันเป็นเวลานานทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น มีอาการท้องเสียเรื้อรัง เล็บมือเปราะแตกง่าย ลมหายใจมีกลิ่นคล้ายกระเทียม ผม่วง มีผื่นคันตามผิวหนัง คลื่นไส้ อาเจียน และอาจทำให้เสียชีวิตได้ จึงต้องการกำหนดปริมาณการบริโภค และการพัฒนาใช้ซีลีเนียมที่เป็นในรูปแบบปลอดภัย ซึ่งมีรายงานว่านาโนเทคโนโลยีเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดความเป็นพิษของ selenite และปรับปรุงประสิทธิภาพของซีลีเนียมให้เกิดประโยชน์ (Papp, Lu et al. 2007)

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีหลายวิธี ได้แก่ สังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี, กายภาพ และชีวภาพ โดยการสังเคราะห์ทางชีวภาพที่ใช้สารจากพืชเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและราคาไม่แพง กอปรกับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงหาวัตถุดิบที่เป็นพืชในการสังเคราะห์ได้ง่าย ในการพัฒนาอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดพืชมีรายงานการใช้พืชหลายชนิด เช่น สารสกัดลูกช้ด และอนุภาคนาโนซีลีเนียมของสารสกัดลูกช้ดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ใกล้เคียงกับ doxorubicin ที่เป็นยารักษามะเร็ง (Ramamurthy, Sampath et al. 2013) ในการศึกษาวิจัยนี้เลือกใช้กระเทียมเป็นสมุนไพรตัวหนึ่งที่มีสารสำคัญหลายชนิด และ allicin เป็นสารหลักที่พบในกระเทียมที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยเห็นี้ย่นำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis จากการเกิด oxidative modification ของกลุ่ม sulfhydryl (thiol) ในเซลล์ (Weisberger and Pensky 1958) Anu และคณะในปี 2016 พบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์จากสารสกัดกระเทียมมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ต่ำกว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์จากสาร PVA ซึ่งเป็นสารที่ช่วยทำให้อนุภาคเสถียร งานวิจัยนี้จึงสนใจสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม อย่างไรก็ตาม สภาพะในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีปัจจัยหลายอย่างเกี่ยวข้อง ทั้งความเข้มข้นของซีลีเนียม และความเข้มข้นสารพืช pH และเวลาในการสังเคราะห์ ซึ่งส่งผลต่อขนาดอนุภาค ความเสถียร และฤทธิ์ของอนุภาคได้ ดังนั้นเป้าหมายของงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ให้เกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เพื่อให้ได้อนุภาคที่ฤทธิ์เฉพาะต่อเซลล์มะเร็ง และมีความเป็นพิษต่ำกว่าต่อเซลล์ปกติ (MRC5) รวมทั้งตรวจสอบฤทธิ์เทียบกับยา Tamoxifen ซึ่งเป็นยาฮอร์โมนต้านมะเร็งเต้านม ซึ่งคาดหวังว่าจะได้อนุภาคนาโนซีลีเนียมของกระเทียมที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ดี รวมทั้งตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้ง

เซลล์มะเร็งของอนุภาคที่คัดเลือกที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ นอกจากนี้ได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมกับ *Staphylococcus aureus*

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมจากสารสกัดกระเทียม ที่มีฤทธิ์ชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์แบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาหาสภาวะหรือปัจจัยของความเข้มข้นของสารสกัดพืช (กระเทียม, Sodium selenite, เวลาและ pH ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียม

1.3.2 ศึกษาสารองค์ประกอบ Phenolic และ Flavonoid และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในกระเทียมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในอนุภาคนาโนซิลิเนียมด้วยวิธี ABTS และ DPPH assay

1.3.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเซลล์มะเร็ง HepG2, MCF-7 และเซลล์ปกติ MRC-5 ด้วยวิธี MTT assay

1.3.4 พิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมด้วย UV-visible spectrophotometer, Scanning Electron Microscope, Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) และ Zeta potential

1.3.5 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ด้วย agar diffusion และ turbidity assay

1.3.6 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมที่เวลาเก็บต่างๆ

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้จากงานวิจัย

ได้ข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ให้เกิดอนุภาคนาโนซิลิเนียม ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และ *Staphylococcus aureus* และได้ข้อมูลอายุคงฤทธิ์ของอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมที่สังเคราะห์ได้

บทที่ 2

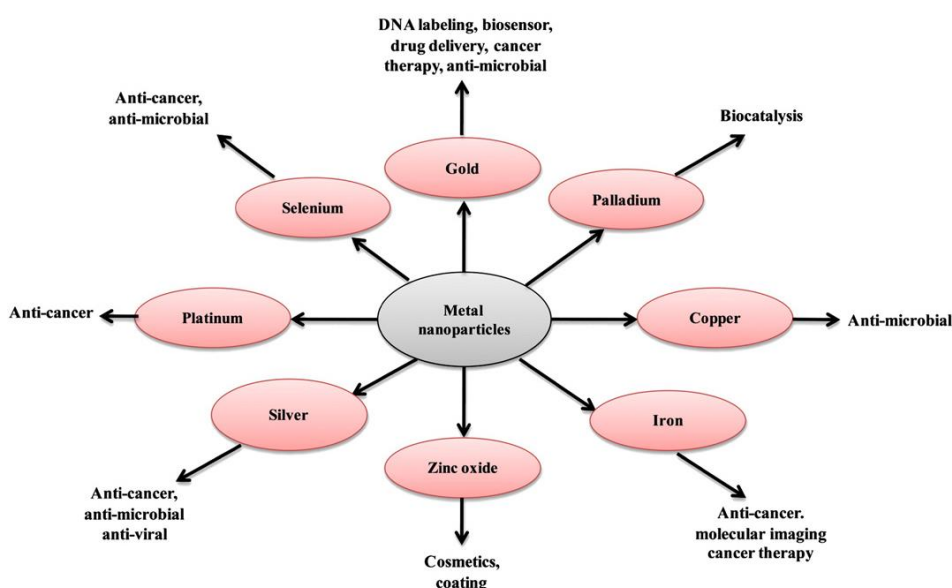
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 นาโนเทคโนโลยี

นาโนเทคโนโลยี เป็นสหวิทยาการที่มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับวิทยาศาสตร์ หลากหลายสาขาซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่เน้นการพัฒนา ให้มีองค์ประกอบสำคัญ 3 ประการดังนี้

1. เล็ก หมายถึงมีขนาด โครงสร้าง หรือองค์ประกอบที่เล็กในระดับนาโนเมตร (1-100 นาโนเมตร)
2. ควบคุมได้ หมายถึง การสังเคราะห์โครงสร้าง การผลิตในระดับนาโนเป็นกระบวนการที่สามารถควบคุมและได้ผลลัพธ์ที่แม่นยำทุกครั้ง
3. มีสมบัติพิเศษ หมายถึง กระบวนการที่จัดการ การสร้าง การสังเคราะห์ ให้ขนาด หรือมีองค์ประกอบที่เล็กระดับนาโนเมตร ซึ่งมักก่อให้เกิดสมบัติพิเศษที่แตกต่างไปจากวัสดุหรือสสารเดิม

นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีที่สร้างอนุภาคนาโน หรืออนุภาคที่มีขนาดเล็กอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร ซึ่งมีสมบัติทางเคมี ทางกายภาพและทางชีวภาพที่พิเศษแตกต่างไปจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากขนาดอนุภาคที่เล็ก ส่งผลให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสที่สูง จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีบริเวณพื้นผิวได้ดี (Wang, Neogi et al. 2006) โดยอนุภาคนาโนสามารถสังเคราะห์ได้จากโลหะหลายชนิด เช่น ทอง, ทองแดง, เงิน และ ซีลีเนียม และให้ฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายแบบ



รูปที่ 1 ประเภทของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์จากโลหะประเภทต่างๆและฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาค (Shah, Fawcett et al. 2015)

2.2 ซีลีเนียม (Selenium)

ซีลีเนียม (Se) เป็นธาตุที่ไม่จัดเป็นโลหะ (nonmetallic element) ซึ่งอยู่กลุ่มเดียวกับซัลเฟอร์ (Gerald, Combs et al. 1998) แต่มีความแตกต่างกันตรงซีลีเนียมไม่เกิดพันธะ π bonds ในทุกรูปแบบ อิเล็กตรอนวงนอกของซีลีเนียมจึงมีลักษณะหลวมกว่าซัลเฟอร์ ส่งผลให้ซีลีเนียมเป็น nucleophile และทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระของออกซิเจนได้รวดเร็วกว่าซัลเฟอร์ ซึ่งการขาดลักษณะ π -bond ในสารประกอบซีลีเนียม ทำให้เป็นสารที่มีความพร้อมในการรีดิวซ์มากกว่าสารประกอบซัลเฟอร์ อย่างไรก็ตาม ธาตุซีลีเนียมมีหลาย oxidation states ((+6), (+4), (0), (-2)) (เช่น selenide (Se^{2-}), elemental selenium (Se^0) และ selenite (Se^{4+}) และมีสมบัติทางเคมีแตกต่างกัน คือ Se^0 ไม่ละลายน้ำและมีขนาด $<0.45 \mu\text{m}$ ขณะที่ selenite และ selenate เป็น oxoanions ที่มีอิเล็กตรอนมากกว่า จึงเป็นอ็อกซิไดซิงที่ละลายน้ำได้ โดย selenite จะเสถียรภายใต้สภาวะมีออกซิเจนน้อยๆ (mildly oxidizing conditions) แต่ selenite ยังมีสัมพันธภาพกับแร่ธาตุหลายชนิดและสารอินทรีย์ที่ $\text{pH} < 7$ ซีลีเนียมพบได้หลายรูปแบบทั้งซีลีเนียมอินทรีย์ และซีลีเนียมอนินทรีย์ โดยซีลีเนียมอนินทรีย์มี 3 รูปแบบที่พบบนเปลือกโลก ได้แก่ Selenite (Se^{4+}), selenate (Se^{6+}) และ selenide (Se^{2-}) อย่างไรก็ตาม ซีลีเนียมอนินทรีย์สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นซีลีเนียมอินทรีย์ได้จากเมตาโบลิซึมของสิ่งมีชีวิต เช่น selenomethionine, selenocystine และ selenocysteine โดยแบคทีเรีย และพืช

ซีลีเนียมเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ แต่ได้รับจากการบริโภคอาหาร เช่น เมล็ดทานตะวัน เนื้อแดง และอาหารทะเล เป็นต้น ทั้งนี้พืชสามารถนำซีลีเนียมที่อยู่ในดินไปใช้ ซึ่งการสะสมซีลีเนียมของพืชเป็นปัจจัยต่อสุขภาพของสัตว์และคน เนื่องจากคนและสัตว์ต้องการสารอาหารที่จำเป็นจากพืช ทำให้ประเภทของสารประกอบ seleno ในพืชสำคัญยิ่งขึ้น ปริมาณซีลีเนียมของพืชขึ้นอยู่กับดินบริเวณในการเจริญเติบโตของพืชผัก (Whanger and Butler 1988) เช่น หัวผักกาด, กะหล่ำปลี, ถั่วลิสง, ถั่ว, แครอท, มะเขือเทศ, มันฝรั่ง และแตงกวา มักพบมีปริมาณซีลีเนียมมากที่สุด ประมาณ 6 mg Se/g เมื่อปลูกบนดิน seleniferous ส่วนหัวหอมและหน่อไม้ฝรั่งอาจสะสมถึง 17 mg Se/g เมื่อปลูกบนดินประเภทนี้ พืชสามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ซีลีเนียมรวมทั้ง Selenomethionine (SeMet) จากซีลีเนียมประเภทอนินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มโปรตีนที่จับกับซีลีเนียม มีความสัมพันธ์ในการดูดซับซีลีเนียมทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถสะสมซีลีเนียมเพิ่มขึ้น (Mounicou, Meija et al. 2004) โดยกระบวนการรวมตัวของกรดอะมิโนซีลีโนกับโปรตีนที่ไม่จำเพาะ เกิดจากกรดอะมิโนซีลีโนรวมตัวกับโปรตีน โดยอาศัยเอนไซม์บางชนิดในกระบวนการดูดซับซีลีเนียม ทำให้ซีลีเนียมสามารถที่จะเข้าไปจับกับโปรตีนในสิ่งมีชีวิต และพบได้ในพืชที่สะสมซีลีเนียม เช่น ต้นหอม (*Allium fistulosu*) (Kápolna and Fodor 2006) และบิล็อกโคลี่ เป็นต้น

ซีลีเนียมที่รับเข้าร่างกายจะถูกดูดซึมได้ดีที่ลำไส้เล็ก และร่างกายจะเก็บซีลีเนียมไว้ในตับและไตได้มากเป็น 4-5 เท่าของซีลีเนียมที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่ออื่นๆ ซีลีเนียมที่เข้าสู่ร่างกายจะถูกปรับเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน selenocysteine และถูกนำไปประกอบเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนที่ถูกเรียกว่า ซีลีโนโปรตีน (selenoproteins) ที่มีบทบาทต่อสุขภาพของร่างกาย เช่น Glutathione Peroxidases, Thyroid Hormone Deiodinases และ Thioredoxin Reductases เป็นต้น โดยเอนไซม์เหล่านี้มีความสำคัญต่อหน้าที่ของระบบต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์, ระบบสืบพันธุ์, การทำงานของกล้ามเนื้อและการป้องกันเนื้องอก ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง การป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด และสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อเอชไอวี (HIV) สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวี (Hatfield, Berry et al. 2011) ด้วยเหตุนี้ ซีลีเนียมจึงมีความสำคัญในการเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค เช่น สารประกอบซีลีเนียมมีประสิทธิภาพใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อราในยาสระผมสำหรับรักษาโรคหนังศีรษะแห้ง, รังแคและต่อมไขมันอักเสบ ซีลีเนียมซัลไฟด์จึงเป็นที่รู้จักกันดี ในการรักษารังแค นอกจากนี้ การให้ sodium selenite (Na_2SeO_3) พบสามารถป้องกันการเกิดก้อนเนื้อในหนูที่ฉีดด้วย dimethylaminoazo-benzene ได้ และการทาผิวด้วยสารละลาย sodium selenide (Na_2Se_2) จะลดการเกิดมะเร็งผิวหนังได้ 30 เท่า เมื่อเทียบกับ DL- α -tocopherol และการบริโภกซีลีเนียม 8 ppm พบไม่ก่อให้เกิดเป็นมะเร็ง โดยผู้ป่วยมะเร็งที่มีระดับซีลีเนียมในพลาสมาต่ำจะเกิดอัตราการตายของผู้ป่วยมะเร็งสูงขึ้น ในหลายประเทศจึงมีแนวการเสริมซีลีเนียม อาจโดยการใส่ซีลีเนียมในดินที่เพาะปลูกพืช (ประเทศฟินแลนด์) หรือการเติม sodium selenite ผสมในเกลือบริโภก ซึ่งพบว่า การเสริมซีลีเนียมสามารถลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งและเพิ่มอัตราการรอดของผู้ป่วยมะเร็งสูงขึ้น จึงมีการใช้ซีลีเนียมในรูปแบบอินทรีย์และอนินทรีย์ของ sodium selenite, selenium chloride, selenomethionine และ selenocysteine มาเป็นอาหารเสริม และกำหนดการบริโภกในปริมาณน้อยกว่า 70 $\mu\text{g/day}$ สำหรับผู้ใหญ่ (แบบทำยประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 182) พ.ศ. 2541) ซึ่งกลไกสำหรับซีลีเนียมในการเป็นสารต่อต้านมะเร็งยังไม่เป็นที่รู้จัก แต่มีสมมติฐานหลายประการ เป็นที่ยอมรับว่าซีลีเนียมมีประสิทธิภาพมากในการป้องกันมะเร็ง ในระดับที่สูงกว่าระดับโภชนาการหรือเภสัชวิทยา โดยซีลีเนียมนำไปสู่การตายของเซลล์มะเร็ง และซีลีเนียมยังเป็นตัวต้านการเกิด angiogenic และยับยั้งการกระจายของเซลล์เนื้องอก (Gerald, Combs et al. 1998) ซึ่ง Wang และคณะในปี 2015 ได้ศึกษาแนวโน้มรูปแบบของซีลีเนียมที่สามารถออกฤทธิ์เป็นพิษแบบเฉาะเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งจากการผลิต ROS ที่เพิ่มขึ้นมากขึ้นจากปฏิกิริยาของซีลีเนียมและไทออล อันเป็นเหตุทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันในเซลล์มะเร็ง และนำไปสู่การเป็นพิษที่มากขึ้นจากปริมาณ ROS ที่มากขึ้น แล้วส่งผลยับยั้งการเจริญและก่อเกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตาม การใช้ซีลีเนียมยังมีปัญหา

เนื่องจากซีลีเนียมเป็นแร่ธาตุที่สำคัญและยังมีความเป็นพิษที่ปริมาณสูง การนำมาใช้เป็นอาหารเสริมตลอดจนเป็นยาต่างๆต้องอยู่ในปริมาณน้อยกว่า 200 $\mu\text{g/day}$ สำหรับผู้ใหญ่ ผู้ที่ได้รับปริมาณซีลีเนียม 400 $\mu\text{g/day}$ ติดต่อกันเป็นเวลานานทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น มีอาการท้องเสียเรื้อรัง เล็บมือเปราะแตกง่าย ลมหายใจมีกลิ่นคล้ายกระเทียม ผม่วรง มีผื่นคันตามผิวหนัง คลื่นไส้ อาเจียน และอาจทำให้เสียชีวิตได้ (Reid, Stratton et al. 2004) อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ได้หาทฤษฎีในการดำเนินการเพื่อลดความเป็นพิษและปรับปรุงประสิทธิภาพของซีลีเนียมให้อยู่ในรูปอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ยังคงประโยชน์จากสมบัติต่างๆ เช่น ยับยั้งจุลินทรีย์, ยับยั้งเชื้อรา และต้านมะเร็ง (Papp, Lu et al. 2007) ซึ่งการศึกษาความเป็นพิษในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียม (SeNPs) ที่มีขนาดเล็กที่ 12.5 nm มีฤทธิ์เทียบเท่ากับ methylseleninic acid ในการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Kong, Yuan et al. 2011) และที่ขนาดเฉลี่ยที่ 36 nm พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG2 โดยให้ผลใกล้เคียงกับ sodium selenite (Zhang, Gao et al. 2001) การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองพบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมส่วนใหญ่มักจะสะสมอยู่ในเซลล์มะเร็ง เมื่อมีการฉีดเข้าไปในช่องท้องของหนูเปรียบเทียบกับการสะสมซีลีเนียมในเนื้อเยื่อปกติหลังจากฉีดอนุภาคนาโนซีลีเนียมเข้าช่องท้อง ซึ่งลักษณะของการกระจายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน ไม่พบความเป็นพิษต่อร่างกายของสัตว์ทดลอง แต่ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ ROS ในเซลล์มะเร็งและมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดี (Wang 2014)

2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

การสร้างอนุภาคนาโนซีลีเนียมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น chemical reduction, biological synthesis, solvothermal, hydrothermal, microwave-assisted synthesis, green synthesis, electrodeposition, และ pulsed laser ablation method (Dhand, Dwivedi et al. 2015) ซึ่งต่างเป็นการรีดิวซ์ sodium selenite ในสถานะที่มีสารให้เกิดการเคลือบหุ้มบนอนุภาค โดยการหุ้มเคลือบอนุภาคควรจัดให้พอเหมาะ การหุ้มที่มากเกินไปจะทำให้ได้อนุภาคใหญ่ขึ้น แต่การเคลือบที่บางไป มีผลให้อนุภาคซีลีเนียมจากการรีดิวซ์ยังคงมีความไวที่สามารถเกิดการจับกันเป็นกลุ่มก้อน ส่งผลต่อขนาดใหญ่และรูปร่างของอนุภาคได้ ซึ่งการรีดิวซ์ selenite (Se^{4+}) ให้เป็น Se^0 จะทำให้ Se^0 ไม่ละลายน้ำและไม่มีความเสถียร โดยมีความไวที่จะเปลี่ยนรูปได้ จึงต้องมีการหุ้มที่ดี ซึ่งอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ซีลีเนียมเป็น Se^0 จะมีความเป็นพิษต่ำ เข้ากับร่างกายได้ดีกว่า selenite (Se^{4+}) และ selenate (Se^{6+}) ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ดี

2.3.1 วิธีทางเคมี

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมทางเคมีเป็นการรีดิวซ์เกลือของซีลีเนียมด้วยสารรีดิวซ์ในสถานะที่มีสารเป็น surfactants แล้วให้อนุภาคคอลลอยด์แขวนลอยในสารละลายได้ ซึ่งสารที่เป็น reducing agent มีหลายชนิด และมีสถานะการทำงานแตกต่างกัน เช่น ascorbic acid จะรีดิวซ์ selenious acid ที่เย็น ซึ่งเป็นสารละลาย sodium selenite ที่ปรับเป็นค่างหรือกรดได้ ส่วน Reducing carbohydrates สามารถรีดิวซ์เฉพาะสารละลายต่างในสถานะที่ให้ความร้อน และ thio compounds รวมทั้ง cysteine และ glutathione สามารถรีดิวซ์สารละลาย sodium selenite ที่อุณหภูมิห้องและที่สถานะต่างได้ นอกจากนี้ สารพวก aldehydes, ketones, polyphenols และ creatinine สามารถรีดิวซ์สารละลาย selenite ที่เป็นกรดได้เมื่อให้ความร้อน โดย ascorbic acid มีความแตกต่างจากสารอินทรีย์ตัวอื่นๆ ที่มีกระบวนการรีดิวซ์เฉพาะที่รีดิวซ์สารละลาย selenite ที่เป็นกรดในที่เย็นได้ แล้วให้ลักษณะเฉพาะของซีลีเนียมที่เป็นสีแดง

งานวิจัยทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมทางเคมีโดยใช้ sodium selenosulphate ด้วยการเตรียมจาก selenium 2 g และ sodium sulfite 20 g ในน้ำที่ 70°C ปริมาตร 100 ml เป็นเวลา 7 ชั่วโมง จะได้สารละลาย sodium selenosulphate จากนั้นเตรียม stock ของ polyvinyl alcohol (PVA) ซึ่ง PVA ทำหน้าที่เป็น stabilizing agent โดยใช้ 0.1 g PVA ในน้ำ 100 ml กวนที่ 80°C เมื่อต้องการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมทางเคมีจะใช้ sodium selenosulphate (ความเข้มข้น $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) ผสมกับ acetic acid (ความเข้มข้น $5.0 \times 1.0^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) และเติมให้ได้ 0.01% ของ PVA จะได้อนุภาคที่สังเคราะห์ขนาด 60-100 nm ซึ่งการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่าย (Anu, Singaravelu et al. 2016)

2.3.2 วิธีทางกายภาพ

วิธีการทางกายภาพเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถควบคุมขนาด รูปร่างและปริมาณของอนุภาคนาโนเงินได้ง่าย (Mafuné, Kohno et al. 2002) แต่ข้อเสียคือเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพงทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง เช่นการยิงด้วยเลเซอร์ (laser ablation) ซึ่งสามารถควบคุมขนาด และรูปร่างได้ง่ายด้วยการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น ความยาวคลื่นของเลเซอร์ ความเข้มของแสงเลเซอร์และเวลาในการยิงเลเซอร์

2.3.3 วิธีทางชีวภาพ

ปัจจุบันการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะทางชีวภาพนิยมมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยสามารถใช้แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์และสารสกัดจากพืช ซึ่งส่วนประกอบของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะมีด้วยกัน 3 ส่วน (1) เกลือของโลหะ

เช่น sodium selenite (2) reducing agent ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ ascorbic acid ไปทำหน้าที่ในการรีดิวซ์ Se^{4+} ในสารละลายให้เป็น Se^0 และอาจใช้สารพฤกษเคมี เช่น polyphenols, flavonoids และ (3) capping agent ซึ่งสารพฤกษเคมีทำหน้าที่เป็น capping agent เนื่องจากสามารถให้อิเล็กตรอนแก่ไอออนโลหะและทำให้เกิดการรวมตัวเป็นอนุภาคนาโนโลหะที่เสถียร (รูปที่ 2)

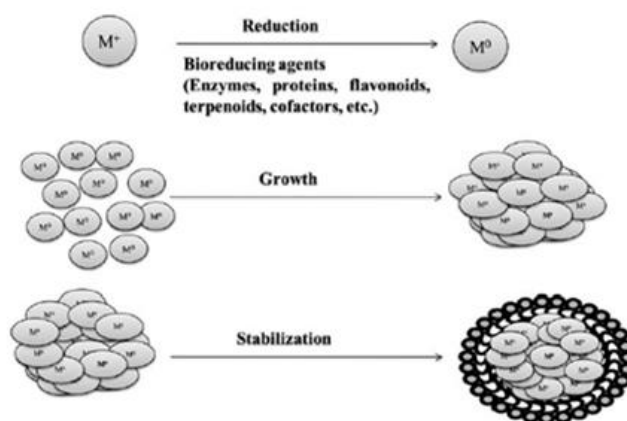


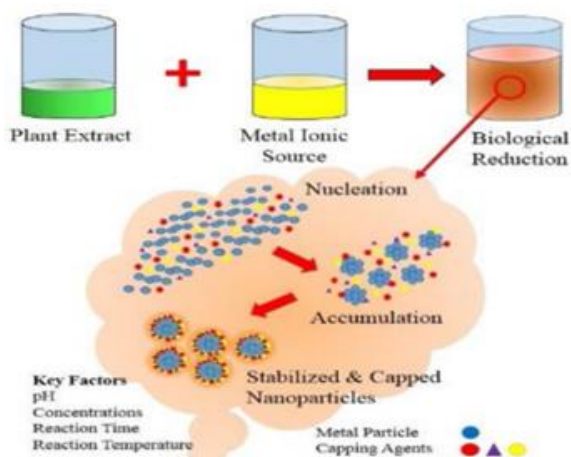
Fig. 2. Mechanisms of nanoparticle synthesis (M^+ -metal ion).

รูปที่ 2 แสดงกลไกของการสังเคราะห์อนุภาคโลหะด้วยวิธีทางชีวภาพ
(Mittal, Chisti et al. 2013)

งานวิจัยของ Kumari และคณะในปี 2017 ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดขมิ้นโดยใช้เกลือโลหะ คือ sodium selenite ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 500 ml ละลายในน้ำกลั่น และใช้ reducing agent คือ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.12 g/ml ปริมาตร 100 ml ละลายในน้ำกลั่นและใช้สารพฤกษศาสตร์เคมีที่เป็นองค์ประกอบของขมิ้นเป็น capping agent ความเข้มข้นของขมิ้นชัน 80 mg/ml ปริมาตร 5 ml ละลายในอะซิโตน การสังเคราะห์ได้ทำโดยใช้ sodium selenite 500 ml ผสมกับขมิ้นชัน 5 ml ค่อยๆหยด ascorbic acid จนครบ 100 ml บ่ม 24 ชั่วโมงบน magnetic stirrer จะได้ขนาดของอนุภาคประมาณ 35.9 ± 5.01 nm (Kumari, Ray et al. 2017) ส่วนงานวิจัยของ Ganesan ในปี 2015 ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากดอกเฟื่องฟ้าโดยใช้เกลือโลหะคือ sodium selenite ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 90 ml และใช้ reducing agent และ capping agent เป็นสารพฤกษศาสตร์เคมีองค์ประกอบในดอกเฟื่องฟ้า ใช้ความเข้มข้นของดอกเฟื่องฟ้า 0.1 g/ml ปริมาตร 10 ml นำมาผสมกันและบ่มบน shaker ที่ 250 rpm อุณหภูมิ 36°C นาน 5 วัน ได้ขนาดของอนุภาคประมาณ 53 nm ซึ่งไม่มีการใช้ ascorbic acid เป็น reducing agent (Ganesan 2015)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์

การสังเคราะห์ให้ได้อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่มีขนาดและลักษณะที่ต้องการ พบมีปัจจัยหลายอย่างเกี่ยวข้องทั้งชนิดสารสกัดพืช ความเข้มข้นสารพืช pH เวลา และอุณหภูมิ ที่อาจส่งผลให้ได้อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่มีลักษณะและฤทธิ์แตกต่างกันได้



รูปที่ 3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะทางวิธีชีวภาพจากพืช
(Shah, Fawcett et al. 2015)

2.4.1 ผลของความความเป็นกรด-ด่าง

มีรายงานผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมด้วยการใช้ dithiotheritol และ gallic acid เป็น reducing agents และใช้ sodium selenite เป็นแหล่งของซิลิเนียม ซึ่งการเปลี่ยนแปลง pH (pH 5-7) ส่งผลต่อขนาดและรูปร่างของ SeNP จากลักษณะทรงกลมขนาด 50-75 nm ไปเป็นทรงกลมขนาด มากกว่า 500 nm ที่ pH 7 และบ่มต่อไปนาน 1 อาทิตย์ อนุภาคจะมีลักษณะเป็นเส้นใยและมีขนาด 5-10 μm เมื่อบ่มนานขึ้น โดย gallic acid ยังเป็นสารเคมีที่ระบอบอก pH ได้ ที่ pH 5 สีของ gallic acid เปลี่ยนเป็นส้มเหลือง ขณะที่ pH 7 สีจะออกน้ำตาลเข้ม ซึ่งเป็นข้อระวังของการสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่อาจมีผลจากความเป็น pH indicator ของสารเคมีที่ใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม (Stacey Barnaby, Nazmul Sarker et al. 2011)

การสังเคราะห์อนุภาคซิลิเนียมโดยใช้ mercaptopropionic acid เป็น reducing และ capping agent พบว่าความหนาแน่นของประจุที่ผิวจะขึ้นกับพื้นผิวประจุภายในและโมเลกุลของ capping agent โดยซิลิเนียมจะไม่อยู่ในรูป anionic form และ pH มีบทบาทในการเกิดปฏิกิริยาให้อนุภาคนาโนซิลิเนียม อย่างไรก็ตาม pH ที่เหมาะสมจะเป็น stabilizer ให้เกิดความเสถียรของอนุภาค

ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ขึ้นอยู่กับความเสถียรตามธรรมชาติของ stabilizer จากงานวิจัยนี้ใช้ pH เริ่มต้น โดยการเติมกรด 3-mercaptopropionic ให้มี pH ประมาณ 4.5 (Hodlur and Rabinal 2014)

2.4.2 ความเข้มข้นของสารพิษ

งานวิจัยของ Ramesh และคณะในปี 2015 ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากมะขามป้อมขนาด 15 nm โดยใช้มะขามป้อมที่ทำหน้าที่เป็น reducing agent และ stabilizing agent ที่ความเข้มข้น 0.25 g/ml ศึกษาปริมาณของสารสกัดมะขามป้อมที่ 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15 ml ใส่ในสารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 100 ml พบปฏิกิริยาเกิดภายใน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีส้ม และผลจากการทดลองพบว่า ปริมาตรสารสกัดมะขามป้อมที่ 5-10 ml มีความเหมาะสมในการสังเคราะห์ โดยให้พิกจากกราฟวัดด้วย UV-Visible spectral ให้แถบ SPR ที่เพิ่มขึ้นเป็นพิกเกิดขึ้น โดยให้ค่าดูดกลืนแสงสูงตามปริมาณ แต่ปริมาตรที่ 10 ml ให้ค่าสูงที่สุด และเป็นสถานะที่ให้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าสถานะที่เกิด SPR พิกที่ระดับต่างๆ ดังนั้นปริมาณของสารสกัดมะขามป้อมที่ 10 ml ที่ให้แถบสูงที่สุดจึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด (Ramesh, Kokila et al. 2015)

นอกจากนี้ยังพบความเข้มข้นของตัว capping agent ยังเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซิลิเนียม จากงานวิจัยของ Huang และคณะ ในปี 2003 ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ขนาดตั้งแต่ S (5-15 nm), M (20-60 nm) และ L (80-200 nm) การเตรียมอนุภาคนาโนซิลิเนียมขนาดต่างๆ 1 ml ความเข้มข้น 25 mM ของ sodium selenite ปริมาตร 1 ml ผสมกับ GSH ความเข้มข้น 25 mM ปริมาตร 4 ml ที่มี BSA 200, 20 และ 2 mg ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าการใช้ BSA 200 mg ให้อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่มีขนาดเล็ก (S) กว่าที่การใช้ BSA 20 mg (M) และ 2 mg (L) ตามลำดับ (Huang, Zhang et al. 2003)

2.4.3 อุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยา

Zhang และคณะในปี 2012 ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่อุณหภูมิปกติได้ขนาดอนุภาคนาโนซิลิเนียม 80 nm และเมื่อมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 °C นาน 1 ชั่วโมงพบว่า มีขนาด 110 nm จึงทราบว่าอุณหภูมิมีผลต่อขนาดของอนุภาค เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิสูงอนุภาคที่สังเคราะห์มีขนาดใหญ่ขึ้น (Zhang, Taylor et al. 2012)

Wang และคณะในปี 2015 พบผลของอุณหภูมิในลักษณะเดียวกัน คือการให้ความร้อน 70°C นาน 10 ชั่วโมง ของอนุภาค 35 nm จะทำให้อนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 91 nm ซึ่งอนุภาคนาโนซิลิเนียมทั้ง 2 ขนาดที่ขนาด 35 nm และ 91 nm ได้นำไปศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในเซลล์ Tca8113 (มะเร็งลิ้นในคน) และเซลล์ CT26 (มะเร็งลำไส้ใหญ่) และ

ในสัปดาห์ทดลอง พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ความเข้มข้น 20 μM อนุภาคขนาดเล็ก (35 nm) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดและในสัปดาห์ทดลองมากกว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมขนาดใหญ่ (91 nm) ที่ความเข้มข้น 20 μM ได้ %การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง CT26 เท่ากับ 50 และ 100 ตามลำดับและ %การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Tca8113 เท่ากับ 20 และ 80 ตามลำดับ (Wang, Chen et al. 2015)

2.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมและการพิสูจน์เอกลักษณ์ (Characterizations)

เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเบื้องต้นสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลายเมื่อทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์อนุภาค โดยจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐ ซึ่งเป็นลักษณะปกติของธาตุซีลีเนียมที่เป็นธาตุสีแดงอิฐ (Wang, Chen et al. 2015) แสดงถึงเกลือซีลีเนียม (ไม่มีสีเมื่อละลายน้ำ) เช่น Sodium selenite (Se^{4+}) ถูกรีดิวซ์ด้วย reducing agent เปลี่ยนเป็นธาตุ Se (Se^0) ซึ่งอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ อาจมีสมบัติและขนาดรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกัน จึงต้องมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ ดังนี้

2.5.1 ค่าการดูดกลืนแสง

อนุภาคนาโนของโลหะมีสมบัติทั้งเคมีและกายภาพแตกต่างจากโลหะขนาดใหญ่ โดยความแตกต่างกันของอนุภาคนาโนจะขึ้นกับสารองค์ประกอบ ขนาดและรูปร่างอนุภาค ซึ่งสมบัติทางแสงเป็นลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโน เช่น อนุภาคนาโนของทองขนาด 20 nm จะเป็นสีแดงของไวน์ อนุภาคนาโนเงินสีเทาเหลือง และอนุภาคนาโนแพทินัมสีดำ นอกจากนี้ อนุภาคนาโนที่มีขนาดแตกต่างกันจะมีสมบัติทางแสงเปลี่ยนแปลงไป เช่นอนุภาคทองที่มีขนาดใหญ่จะมี surface plasmon resonance เปลี่ยนจาก 530 nm ไปเป็นความยาวคลื่นที่มากขึ้น เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) เป็นเทคนิคหนึ่งทางสเปกโตรสโคปี ที่ศึกษาการดูดกลืนแสงของสารละลายและเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัด ปริมาณแสงและค่าความเข้มของแสง (Intensity) ซึ่งความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณ และชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ดังนั้นอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์จากพืชต่างชนิดให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่แตกต่างกัน เช่นอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากใบเลม่อนให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 293 nm (Prasad, Patel et al. 2013) อนุภาคนาโนซีลีเนียมสังเคราะห์จากวานหางจรเข้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 350 nm (Vyas and Rana 2017) และอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์จากกระเทียมมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 260 nm (Anu, Singaravelu et al. 2016) เป็นต้น นอกจากนี้ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างยังใช้ประมาณขนาดอนุภาคได้ ซึ่ง Lin และ Wang ในปี 2005 ได้ศึกษาการควบคุมขนาดของอนุภาคด้วยการใช้ selenite precursor (SeO_3^{2-}), reducing agent (sodium thiosulfate, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), และ colloidal particle stabilizer

(sodium dodecyl sulfate) ด้วยการปรับความเข้มข้น thiosulfate และเวลาบ่มปฏิกิริยาไม่ให้นานเกิน 6 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นหรือปริมาณ reducing agent ที่มากขึ้นมีผลให้ขนาดอนุภาคลดลง โดยหากสารละลายสีเหลืองส้มจะให้อนุภาคขนาด 20 nm และเมื่อเกิดการเจริญของอนุภาคตามเวลา จะมีสีเข้มขึ้นตามรูปที่ 4 ซึ่งสัมพันธ์กับค่าดูดกลืนแสงที่อนุภาคขนาดใหญ่จะให้ค่าดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นมากขึ้น จากรูป 4A แสดง 6 ขนาดของสารแขวนลอยของซีลีเนียมที่แตกต่างกันจากซ้ายไปขวาจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กไปขนาดใหญ่ (20.0-240.4 nm)

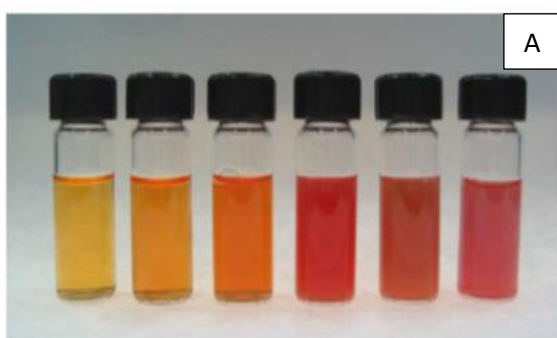


Fig. 2. Photographic images of six size-distinguishable selenium colloids. From left to right, the images represent mean particle diameters of 20.0 ± 6.1 , 70.9 ± 9.1 , 101.6 ± 9.8 , 146.1 ± 23 , 182.8 ± 33.2 , and 240.4 ± 32.2 nm.

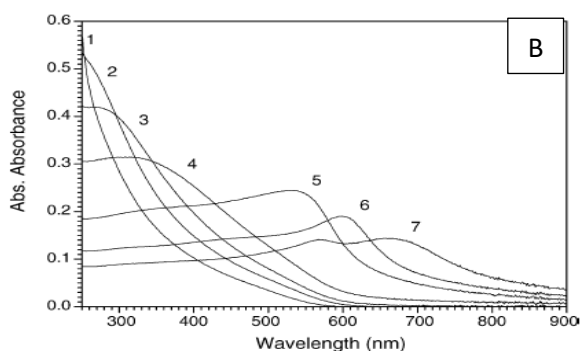


Fig. 3. Absorption spectra of the selenium colloids presented in Fig. 1. The spectra labeled from 1 to 7 represent those of the particles having mean diameters of 18.1 ± 6.7 , 48.2 ± 5.9 , 70.9 ± 9.1 , 101.6 ± 9.8 , 146.1 ± 23 , 182.8 ± 33.2 , and 240.4 ± 32.2 nm, respectively.

รูปที่ 4 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สัมพันธ์กับสีและขนาดของอนุภาค
(Lin and Wang 2005)

2.5.2 Scanning Electron Microscope

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ electron เป็นแหล่งกำเนิดแสง เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาลักษณะพื้นฐานของวัสดุในระดับจุลภาค ซึ่งเป็นรายละเอียดที่เล็กมาก และมีความสามารถในการแยกชัดดี เนื่องจากมีความยาวคลื่นสั้นเพื่อช่วยในการวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานของวัสดุ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีกำลังขยายมากกว่า 3,000 เท่า จนถึงระดับมากกว่า 100,000 เท่า และสามารถแจกแจงรายละเอียดของภาพซึ่งขึ้นกับลักษณะตัวอย่างได้ตั้งแต่ 3 ถึง 100 นาโนเมตร จึงสามารถที่จะเห็นลักษณะรูปร่างและประเมินอนุภาคนาโนได้ อีกทั้งยังสามารถใช้งานร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์อื่น เช่น Energy Dispersive Spectrometry (EDS) และ Wavelength Dispersive Spectrometry (WDS) ที่เป็นข้อมูลทางเคมี ทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน

ที่มา http://www.mic.eng.ku.ac.th/facilities-detail.php?id_sub=42&id=38

2.5.3 Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)

Energy dispersive Spectrometry (EDS) เป็นดีเทคเตอร์ตัวหนึ่งที่อยู่ในระบบของ SEM สำหรับใช้วิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง ซึ่งทำหน้าที่รับสัญญาณ X-Ray โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีพลังงานกระจาย (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS) การทำงานอาศัยหลักการ Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy ใช้การเร่งอิเล็กตรอนให้มีพลังงานสูงพอเหมาะพุ่งเข้าชนตัวอย่างซึ่งประกอบไปด้วยอะตอมของธาตุที่อยู่ในสถานะพื้นจนทำให้อิเล็กตรอนในระดับชั้นพลังงานวงในได้รับพลังงานจากการชนจนหลุดออกไปจากอะตอม แล้วอิเล็กตรอนจากวงนอกจึงคายพลังงานออกมาบางส่วนพร้อมกับเปลี่ยนชั้นพลังงานเข้ามาแทนที่อิเล็กตรอนที่หลุดออกไป พลังงานที่อิเล็กตรอนคายออกมานี้อยู่ในรูปรังสีเอ็กซ์และมีค่าเฉพาะตามธาตุนั้น เมื่อวัดค่าพลังงานรังสีเอ็กซ์นี้ด้วย EDS จะสามารถวิเคราะห์ได้ว่าตัวอย่างประกอบด้วยธาตุชนิดใด สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ สามารถวิเคราะห์ธาตุได้ตั้งแต่โบรอน (B) ถึงยูเรเนียม (U) สามารถวิเคราะห์แบบ Mapping และ Linescan ช่วยในการศึกษาชนิด ปริมาณ และการกระจายขององค์ประกอบธาตุของอนุภาคนาโนซิลิเนียม Energy dispersive Spectrometry (EDS) เป็นดีเทคเตอร์ตัวหนึ่งที่อยู่ในระบบของ SEM สำหรับใช้วิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง ซึ่งทำหน้าที่รับสัญญาณ X-Ray

2.5.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์วัสดุที่เป็นสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้งของแข็ง ของเหลว และก๊าซ เพื่อตรวจวิเคราะห์หาโครงสร้างและองค์ประกอบของโมเลกุลได้ ซึ่งในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมอาจใช้พีชในการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน เทคนิคนี้จึงถือเป็นการบอกเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนได้เนื่องจากสามารถหาโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆได้ เทคนิคนี้อาศัยหลักการของการดูดกลืนคลื่นรังสีช่วงกลางอินฟราเรด (Middle infrared region) ประมาณ $400-4000\text{ cm}^{-1}$ เมื่อโมเลกุลได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรดที่มีความถี่ตรงกับความถี่ของการสั่น (Stretching) หรือการหมุน (Bending) ของพันธะโควาเลนต์ในโมเลกุล จะทำให้โมเลกุลดังกล่าวเกิดการดูดกลืนแสงและมีการเปลี่ยนแปลงค่าโมเมนต์ขั้วคู่ (Dipole moment) ของโมเลกุล จากนั้นเครื่องมือจะวัดค่าความเข้มแสงต่อความถี่หรือความยาวคลื่น (Wave number) ได้ผลเป็นสเปกตรัม ซึ่งในแต่ละพันธะของหมู่ฟังก์ชันจะแสดงค่าความยาวคลื่นเฉพาะต่างกัน ที่ใช้บ่งบอกการมีสารพีชในอนุภาคที่ใช้สังเคราะห์

2.5.5 Zeta potential และค่า PDI

Zeta potential (ค่าศักย์ซีต้า) คือ ความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบเป็นค่าที่ใช้เพื่อบอกแนวโน้มว่าอนุภาคจะมีการเกาะตัวกันเป็นก้อนหรือไม่ เพื่อศึกษาคุณสมบัติการกระจายตัวและความเสถียรของอนุภาคในระดับคอลลอยด์ ซึ่งค่าศักย์ซีต้าที่ $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV, $\pm 20-30$ mV และมากกว่า ± 30 mV จะบอกได้ว่าอนุภาคนาโนในระดับคอลลอยด์มีความเสถียรในระดับ highly unstable, relatively stable, moderately stable และ highly stable ตามลำดับ นอกจากนี้ค่า PDI (polydispersity index) เป็นค่าที่บอกการกระจายตัวของอนุภาค เมื่อค่า PDI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 จะพิจารณาว่ามีความเป็น monodisperse สูง และค่าที่อยู่ระหว่าง 0.1-0.4 มีความเป็น monodisperse ปานกลาง แต่ถ้าค่า PDI มากกว่า 0.4 จะมีความเป็น polydisperse สูง (Bhattacharjee 2016) จากตารางที่ 1 จะแสดงค่า PDI, Zeta Potential และขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดพืชต่างๆ จะพบว่าค่า zeta potential เป็นประจุลบเนื่องจากสารพฤกษศาสตร์ของพืช เช่น Phenolic, flavonoids และ tannins เป็นต้น (Kokila, Elavarasan et al. 2017, Gunti, Dass et al. 2019)

ตารางที่ 1 ค่า PDI, Zeta potential และขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ด้วยสารสกัดพืชชนิดต่างๆ

พืช	คุณสมบัติ			อ้างอิง
	PDI (polydispersity index)	Zeta potential (mV)	ขนาด (nm)	
<i>Pelargonium Zonale</i>	0.321	-24.6	136	(Fardsadegh, Vaghari et al. 2019)
<i>Aloe vera</i>	0.344	-18.0	50	(Nomura and Terwilliger 2019)
<i>Vitis vinifera</i> (Raisin)	0.212	-	3-18	(Sharma, Sharma et al. 2014)
<i>Diospyros montana</i>	-	-22.3	4-16	(Kokila, Elavarasan et al. 2017)
<i>Lycium barbarum</i>	0.241	-24.1	125	(Zhang, Zhang et al. 2018)
Ginger	-	-36.0	100-150	(Menon, K.S et al. 2019)
Parsley	-	-14.2	50-100	(Luminita Fritea, Vasile Laslo et al. 2017)
hawthorn fruit	-	-24.5	113	(Cui, Liang et al. 2018)

Potato	-	-29.3	115	(Chandramohan, Sundar et al. 2018)
<i>Theobroma cacao L.</i>	-	-28.6±5.3	41.5±1.7	(Mellinas, Jimenez et al. 2019)
<i>Asteriscus graveolens</i>	1.00	-24.1	20.6	(Zeebaree, Zeebaree et al. 2020)
<i>Emblica officinalis</i>	<0.20	-24.4	15-40	(Gunti, Dass et al. 2019)
Curcumin	-	-36.9	53	(Guo, Li et al. 2017)

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างงานวิจัยที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารพืชต่างๆและใช้เทคนิคต่างๆในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโน งานวิจัยสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยใช้สารสกัดกระเทียม 2 ml โดยค่อยๆหยดสารละลาย sodium selenite ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 20 ml ในระบบกวนผสม (magnetic stirring) บน thermo-orbital shaker ที่ความเร็วรอบ 120 rpm นาน 5-7 วันในสภาวะมีดที่ 36°C แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยการวิเคราะห์ UV-vis spectrophotometer ในช่วง 200-800 nm ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 260 nm Transmission Electron Microscopy (TEM) ทำให้เห็นรูปร่างของอนุภาคเป็นทรงกลมและขนาดของอนุภาคที่สังเคราะห์ทางเคมีมีขนาด 60-100 nm และทางชีวภาพที่ใช้สารสกัดจากกระเทียมในการสังเคราะห์อนุภาคมีขนาด 100-400 nm Scanning Electron Microscope เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ร่วมกับ EDS ในการวิเคราะห์ธาตุต่างๆที่อยู่ในอนุภาคนาโนซีลีเนียม พบมีธาตุ Selenium ที่ตำแหน่งประมาณ 1.4 KeV, Oxygen , Sodium และ Carbon เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) วิเคราะห์โครงสร้างและหาลำดับประกอบของอนุภาคนาโนซีลีเนียม นำสารสกัดกระเทียมและอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์จากกระเทียมมาวิเคราะห์พบกลุ่ม NO nitro และกลุ่ม CO carboxyl ของสารสกัดจากกระเทียม ที่ช่วยรีดิวซ์อนุภาคนาโนของซีลีเนียมและการวิเคราะห์ FTIR พบกลุ่ม OH, C-H, C-O-H เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียม และเทคนิค X-Ray Diffractometer (XRD) เทคนิควิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์อาศัยหลักการของการยิงรังสีเอ็กซ์ไปกระทบที่ชิ้นงานทำให้เกิดการเลี้ยวเบน และสะท้อนออกมาที่มุมต่างๆกัน โดยมีหัววัดสัญญาณ (Detector) เป็นตัวรับข้อมูล องค์ประกอบและโครงสร้างของสารจะมองเห็นในการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ ในมุมที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับองค์ประกอบ รูปร่าง และลักษณะผลึก ซึ่งลักษณะผลึกของอนุภาคนาโนและมีขนาด 100-410 nm ตามข้อมูลที่ใช้ TEM และ SEM ในการวิเคราะห์ (Anu, Singaravelu et al. 2016)

Satgurunathan และคณะในปี 2017 สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากกระเทียมเพื่อพัฒนาอาหารใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม โดยการสังเคราะห์ใช้ sodium selenite ละลายใช้น้ำ Ultrapure water (18 MΩ) ใช้สารสกัดกระเทียม 5 ml ผสมกับ sodium selenite 20 mM ปริมาตร 50 ml บน magnetic stirrer 150 rpm ที่ 60°C จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองใส

เป็นสีส้มอิฐ ใต้ออนุภาคขนาด 48-87 nm พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์ UV-vis spectrophotometer ในช่วง 200-800 nm มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 267 และ 367 nm เทคนิค Scanning Electron Microscope แสดงถึงอนุภาคมีรูปร่างกลมและมีขนาด 48-87 nm เทคนิค EDS เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ร่วมกับ SEM ในการวิเคราะห์ธาตุต่างๆในอนุภาคโดยพบธาตุ Selenium ที่ตำแหน่งประมาณ 1.4 และ 11.2 KeV, และมี Oxygen, Sodium, Carbon และ Phosphorus เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) วิเคราะห์โครงสร้างของอนุภาคนาโน ซิลิเนียมจากกระเทียมพบว่า มี C=C alkene group, CH₂ groups, N-O group และ carboxyl group (C=O) และเทคนิค X-Ray Diffractometer (XRD) วิเคราะห์องค์ประกอบและโครงสร้างของสารจะมองเห็นการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ ในมุมที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับองค์ประกอบ รูปร่าง และลักษณะผลึก พบว่าลักษณะผลึกของอนุภาคนาโนเป็น crystalline คล้ายกับผลึกของธาตุ Selenium ในธรรมชาติ (Satgurunathan, Bhavan et al. 2017)

2.6 พืชที่ใช้ในการสังเคราะห์ (กระเทียม)

กระเทียมเป็นหนึ่งในพืชที่มีฤทธิ์ทางเภสัชกรรมมากมาย เช่น การต้านจุลชีพ, ต้านการอักเสบ, ต้านอนุมูลอิสระ และป้องกันมะเร็ง สารสำคัญในการออกฤทธิ์ของกระเทียมอยู่ในกลุ่มของ organosulfur compounds เช่น allicin (Yoo, Lee et al. 2010) ซึ่ง allicin เป็นสารหลักที่พบในกระเทียมและมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เนื่องจาก allicin สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis โดยการเกิด oxidative modification ของกลุ่ม sulfhydryl (thiol) ในเซลล์ (Whanger and Butler 1988) นอกจากนี้ ในกระเทียมยังมีสาร phenolic และ flavonoids ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดย Johnson และคณะในปี 2016 วิเคราะห์ปริมาณ Phenolic, flavonoid และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ในกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำ พบว่ามีปริมาณ Phenolic เทียบกับ gallic acid 0.285±0.02 gallic acid equivalent mg/ml sample ปริมาณ flavonoid เทียบกับ rutin 28.74±8.23 mg rutin/ml และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในช่วง 4.47-92.44% ที่ความเข้มข้นกระเทียมตั้งแต่ 3-40 mg/ml โดยให้ค่า IC₅₀ 25.3 mg/ml แสดงถึงกระเทียมมีสารกลุ่ม polyphenolic compounds ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น reducing agent และ stabilizing agent ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนได้



รูปที่ 5 กระเทียม

ที่มา <https://www.indiamart.com/proddetail/fresh-garlic-15357922188.html>

2.7ฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซิลิเนียม

อนุภาคนาโนซิลิเนียมมีการศึกษาสังเคราะห์ และตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาค ซึ่งมีทั้งการยับยั้งเซลล์มะเร็ง การยับยั้งเซลล์แบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระ

2.7.1 ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งในระยะต่างๆ ในวงจรเซลล์ซึ่งเกิดจากการที่อนุภาคนาโนซิลิเนียมเข้าสู่ภายในเซลล์ด้วยการ conjugate กับ ligands และเข้าไปยังนิวเคลียสทำให้ DNA เสียสภาพจากความเครียดออกซิเดชันที่มีการสร้าง ROS ซึ่งเป็นกลไกสำคัญของซิลิเนียมที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษ โดยที่ ROS จะทำให้เซลล์ตายโดยการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ (Menon, Ks et al. 2018) จากรายงานการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมจากสารสกัดขมิ้น (Se@Cur) ได้อนุภาคขนาด 53 nm แล้วนำไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (LO2) วัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT วัดระดับ ROS และ caspase-3 พบว่าเมื่อใส่ Se@Cur นาน 48 ชั่วโมง ความมีชีวิตของเซลล์ปกติ (74.95%) มีค่ามากกว่าเซลล์มะเร็งตับ (52.29%) Se@Cur ก่อนข้างไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติและสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ เมื่อวัดระดับ ROS ภายในเซลล์มะเร็งตับเมื่อใส่ Se@Cur เทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่มีการใส่ Se@Cur พบว่าเซลล์มะเร็งตับเมื่อใส่ Se@Cur ทำให้ระดับของ ROS เพิ่มขึ้นสูง วัดปริมาณเอนไซม์ caspase-3 เมื่อมีการใส่ Se@Cur พบว่ามีปริมาณเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มขึ้นสูงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการใส่สารทดสอบ จึงสรุปได้ว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมมีฤทธิ์เป็น pro-oxidant เมื่อเซลล์ได้อนุภาคนาโนซิลิเนียมจะสร้าง ROS เพิ่มขึ้นมากกว่าสถานะที่เซลล์ไม่ได้รับสาร ทำให้เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบ apoptosis อย่างจำเพาะ โดยมีผลต่อเซลล์ปกติ (Guo, Li et al. 2017)

2.7.2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

กลไกในการยับยั้งการเจริญของอนุภาคนาโนอาจเกิดจากการเป็น Pro-oxidant เมื่ออนุภาคนาโนสัมผัสกับแบคทีเรียและค่อยๆแทรกเข้าไปภายในเซลล์อาจจะทำให้เซลล์เกิดการสร้าง ROS ในปริมาณที่สูงจึงทำให้เกิดการตายของแบคทีเรียจากรายงานของอนุภาคนาโนเงิน (Qing, Cheng et al. 2018) นอกจากนี้ยังมีกลไกที่น่าจะเป็นไปได้เกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของอนุภาคนาโนโลหะ โดยอนุภาคนาโนเงินจะกระจายอยู่บริเวณผนังเซลล์ แล้วปล่อย ions sliver ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น soft base โดย ions sliver จะไปจับกับ soft acid เช่น กำมะถัน (S) ซึ่งเป็นหมู่ thiol (-SH) ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดี จึงทำให้โปรตีนเสียสภาพและสามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ไปขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์โดยการทำให้ DNA ที่มีฟอสฟอรัสเกิดการรวมตัวกันเป็นผลให้แบคทีเรียตาย (Sintubin, De Windt et al. 2009) นอกจากนี้มีการศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ของอนุภาคนาโนซิลิเนียม โดยการทดลองกับแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) และแกรมบวก (*S. aureus*) หลังจากแบคทีเรียได้รับอนุภาคนาโนซิลิเนียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าเกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งจะยับยั้งในแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าในแกรมลบ เนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างของผนังเซลล์แกรมบวกและแกรมลบ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกนั้นมีเมมเบรน peptidoglycan ที่หนา แต่ด้านนอกไม่มีเมมเบรน lipopolysaccharide ดังนั้นอนุภาคนาโนซิลิเนียมจึงสามารถแทรกเข้าไปภายในแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่าย โดยการดูดซับทางเคมี (chemisorption) (Guisbiers, Wang et al. 2016)

2.7.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

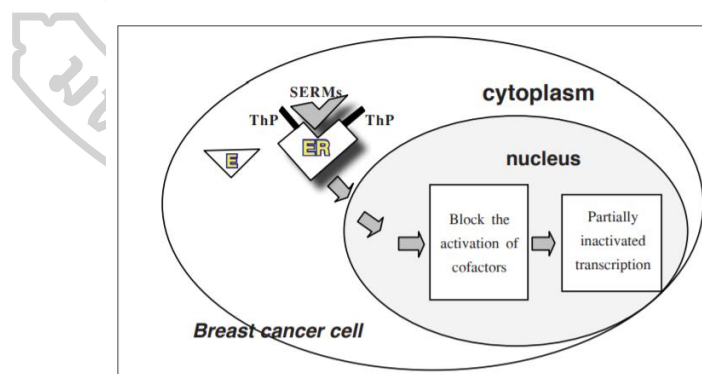
ความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนซิลิเนียม จากรายงานของ Vyas ปี 2017 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่สังเคราะห์จากกระเทียมที่มีขนาด 7-45 nm จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS, DPPH และ FRAP assay ระหว่างอนุภาคนาโนซิลิเนียมและสารละลายกระเทียมพบว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่สังเคราะห์จากกระเทียมให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลที่ดีกว่าสารสกัดกระเทียมที่นำมาสังเคราะห์ โดยให้ค่า %inhibition จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS ของอนุภาคนาโนซิลิเนียมและสารสกัดกระเทียมเท่ากับ 75 และ 60% ตามลำดับ ค่า %inhibition จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ของอนุภาคนาโนซิลิเนียมและสารสกัดกระเทียมเท่ากับ 73 และ 65% ตามลำดับและความสามารถในการรีดิวซ์ ferric จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ของอนุภาคนาโนซิลิเนียมพบว่ามีความสามารถในการรีดิวซ์มากกว่าสารสกัดกระเทียม (Vyas and Rana 2017)

Huang และคณะปี 2003 สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีขนาดแตกต่างกัน S (5-15 nm), M (20-60 nm) และ L (80-200 nm) เมื่อศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ อนุภาคนาโนเล็ก (S), กลาง (M) และใหญ่ (L) มีฤทธิ์ลดแปรผันตามขนาดที่ใหญ่ขึ้น จากผลค่า IC_{50} มีค่าเท่ากับ 0.007, 0.80 และ 0.95 mM ตามลำดับ (Huang, Zhang et al. 2003)

Forootanfar และคณะปี 2014 ศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธี DPPH assay จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ ใช้อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ได้ % scavenging 23.1 ± 3.4 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 800 $\mu\text{g/ml}$ ได้ค่า % scavenging ไม่แตกต่างกัน จึงไม่สามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้ (Forootanfar, Adeli-Sardou et al. 2014)

2.8 ยาต้านมะเร็ง Tamoxifen

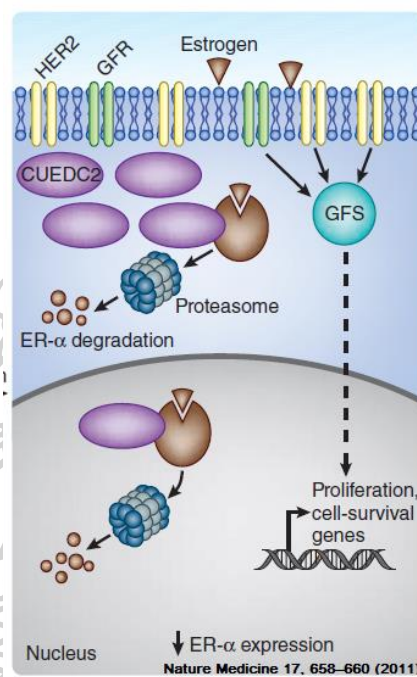
Tamoxifen เป็นยาในกลุ่ม selective estrogen receptor modulators (SERMS) ซึ่งการทำงานของยากลุ่มนี้ไปแย่งจับที่ Estrogen receptor ของเซลล์มะเร็งที่มี Estrogen receptor (ER^+) เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยอาศัย tamoxifen helper protein มาช่วยในการทำงาน ทำให้ estrogen ไม่สามารถจับกับ estrogen receptor และออกฤทธิ์ได้ ทำให้การแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลดลง ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ยากลุ่ม SERMS แย่งจับ estrogen receptor กับ estrogen

(Arunee, Manunya et al. 2011)

การดื้อยา Tamoxifen เป็นผลจากเซลล์มะเร็งสร้าง Ubiquitin ligase (CUEDC2) เพิ่มมากขึ้น แล้วไปจับกับยาที่จับกับ receptor ที่จับอยู่ก่อนและนำส่งให้ proteasome ทำลาย ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้ไม่ปกติ ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการดื้อยา ดังรูปที่ 7 และเกิดอาการข้างเคียงมี เช่น คลื่นไส้, ปวดกระดูกบวมแดงและอาการหน้าแดง (เอกสารแนะนำผู้ป่วย โรงพยาบาลราชวิถี)



รูปที่ 7 กระบวนการทำให้เกิดการดื้อยา Tamoxifen
(Thomas and Gustafsson 2011)

การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของ Tamoxifen พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ไม่มี estrogen receptor เช่น เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้ มีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG2 ที่ได้รับยา Tamoxifen ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 20 μM เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วดูการแสดงออกของ survivin ซึ่งเป็น โปรตีนต้านการตายแบบ apoptosis พบว่า Tamoxifen ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μM ที่เวลา 72 ชั่วโมง ทำให้มีการแสดงออกของ survivin ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แล้วส่งผลให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ดังนั้น ยา Tamoxifen จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ไม่มี estrogen receptor ผ่านวิถีไม่โทคอนเดรียให้เกิด apoptosis ได้ (Guo, Huang et al. 2009) เซลล์ปกติ เช่น MRC-5 ก็มีรายงานว่ามีความ IC_{50} เท่ากับ 11.4 $\mu\text{g/ml}$ (Amin, Tuentner et al. 2016) และอีกรายงานมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.5 $\mu\text{g/ml}$ (Ehata, Phuati et al. 2012) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

บทที่ 3

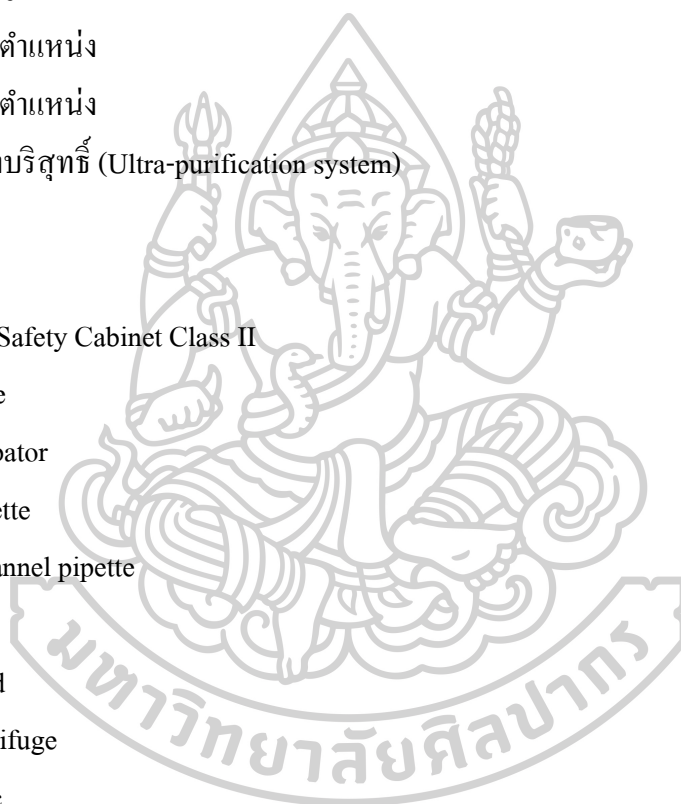
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง No.1
2. กล้องจุลทรรศน์ Light-microscope
3. เครื่อง Shaker
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
6. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (Ultra-purification system)
7. ตู้อบ
8. Autoclave
9. Biological Safety Cabinet Class II
10. Centrifuge
11. CO₂ Incubator
12. Micropipette
13. Muti - channel pipette
14. pH meter
15. Pipette aid
16. Ultracentrifuge
17. Ultrasonic
18. UV-Vis Spectrophotometer
19. Microplate reader
20. Scanning Electron Microscope *
21. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)*
22. Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)*
23. Zeta potential *

*ส่งวิเคราะห์



เครื่องแก้วและพลาสติก

1. ตัวกรองสารละลาย, syringe
2. หลอดทดลอง
3. 96 well cell culture plate
4. Beaker, Plate, Erlenmeyer flask
5. Cuvette
6. Tissue culture flask ขนาด 25,27 cm²
7. Pipette 5, 10 ml

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. Absolute ethanol | RCI lab scan |
| 2. ABTS | SIGMA-ALDRICH |
| 3. Agar | Lab M Limited |
| 4. Aluminium chloride (AlCl ₃ 6H ₂ O) | SIGMA - ALDRICH |
| 5. Antibiotic (Penicillin - Streptomycin) | SIGMA-ALDRICH |
| 6. Ascorbic acid | RCI lab scan |
| 7. Beef extract | Lab M Limited |
| 8. Catechin | SIGMA-ALDRICH |
| 9. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) | SIGMA-ALDRICH |
| 10. DMSO (Dimethyl sulfoxide) | Amresco |
| 11. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) | Fluka |
| 12. Fetal bovine serum | Hyclone |
| 13. Folin-ciocalteu reagent | Merck KGaA |
| 14. Gallic acid | Fluka |
| 15. Hydrochloric acid (HCl) | RCI labs can |
| 16. Minimum Essential Medium (MEM) | SIGMA-ALDRICH |
| 17. MTT (3-(4,5-Dimethylthazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) | SIGMA-ALDRICH |
| 18. Non- essential amino acid | Glico |
| 19. Peptone | Lab M Limited |
| 20. Phosphate buffer saline (PBS ; Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Free) | SIGMA-ALDRICH |
| 21. Potassium persulfate (K ₂ S ₂ O ₈) | Fluka |

ยี่ห้อ/บริษัท

22. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Riedel-deHaen
23. Sodium hydroxide (NaOH)	RCI lab scan
24. Sodium Selenite	SIGMA-ALDRICH
25. Trolox	SIGMA-ALDRICH
26. Trypsin	Amresco
27. Trypan blue	Glico

3.1.3 พืชที่ใช้ในการทดลอง

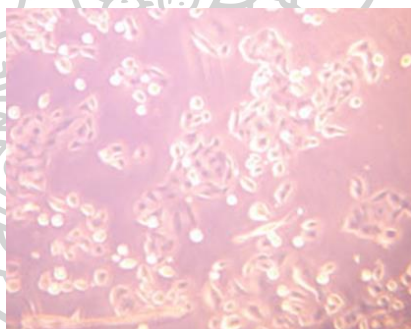
1. สารสกัดกระเทียม

บริษัท ขาวละออ เกสซ์ จำกัด

3.1.4 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.4.1 เซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

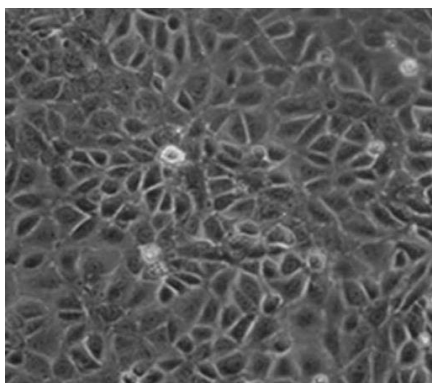
เซลล์มะเร็งตับในมนุษย์ มีลักษณะคล้ายกระเบื้อง (epithelial-like) ในการเลี้ยงจะใช้อาหาร Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี 10 % Fetal Bovine Serum ในตู้บ่ม CO_2 ที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 8 เซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

3.1.4.2 เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

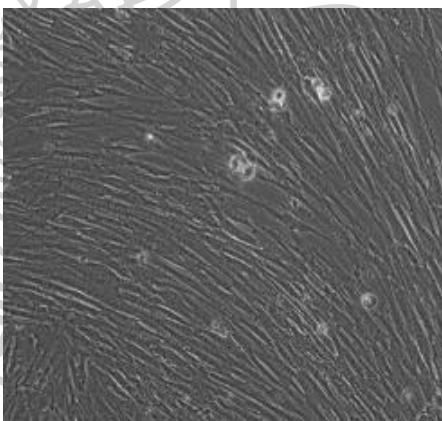
เซลล์มะเร็งเต้านมในมนุษย์ มีลักษณะคล้ายกระเบื้อง (epithelial-like) ในการเลี้ยงจะใช้อาหาร Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี 10 % fetal bovine serum และเพิ่ม 1% non-essential amino acid ในตู้บ่ม CO_2 ที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 9 เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

3.1.4.3 เซลล์ปอด (MRC-5)

เซลล์ปอดในมนุษย์เป็นเซลล์ปกติ มีลักษณะคล้ายกระสวย (Fibroblasts-like) ในการเลี้ยงจะใช้อาหาร Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี 10 % fetal bovine serum ในตู้บ่ม CO₂ ที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 10 เซลล์ปอด (MRC-5)

3.2 การศึกษาสารองค์ประกอบหลักของพืชและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

นำสารสกัดกระเทียมละลายน้ำปริมาตร 30 μ l ผสมกับสารละลาย 1N Folin - ciocalteu reagent 300 μ l และ 15% Na₂CO₃ 150 μ l น้ำกลั่น 200 μ l ตามลำดับ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm แล้วคำนวณหาปริมาณ total phenolic compound จากกราฟมาตรฐาน Gallic acid และคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ mg GAE/g sample

3.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ total flavonoid ด้วยวิธี Aluminium chloride method

นำสารสกัดกระเทียมละลายน้ำปริมาตร 250 μl ผสมกับ 5% NaNO_2 75 μl และ 10% Aluminium chloride 150 μl แล้วทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH 500 μl ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณ total flavonoid ($\mu\text{g/ml}$) จากกราฟมาตรฐาน catechin และคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ mg Catechin /g sample

3.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถรีดิวซ์ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก (ferric ion (Fe^{3+})) ของสารต้านอนุมูลอิสระ จะต้องเตรียม reagent ในการทำปฏิกิริยา เริ่มจาก 1. เตรียม Sodium acetate buffer 300 mM pH 3.6 2. เตรียมสารละลาย TPTZ (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง) ละลายด้วยกรด HCl 40 mM และ 3.เตรียมสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mM (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง) จากนั้นนำ 3 ส่วนนี้ผสมกันในสัดส่วน 10:1:1 นำ reagent ที่เตรียมไว้ทำปฏิกิริยากับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีหลุม blank (เติมน้ำปริมาตร 20 μl ผสมกับ reagent ปริมาตร 180 μl) หลุม sample blank (เติมสารสกัดพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ 20 μl ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 180 μl) และหลุม sample ที่เติมสารสกัดพืช ปริมาตร 20 μl ผสมกับ reagent ปริมาตร 180 μl จากนั้นนำตัวอย่างบ่มในที่มืดที่ อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ใช้ Trolox เป็นสารเทียบมาตรฐาน คำนวณให้อยู่ในหน่วยของ mg Trolox / g sample

3.2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.2.4.1 วิธี DPPH

การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระของอนุมูล DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร ทำโดยนำสารสกัดกระเทียมละลายน้ำใส่ลงใน 96 well plate จากนั้นใส่สารละลาย DPPH ที่ละลายด้วย ethanol ซึ่งมีค่า absorbance เท่ากับ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 517 nm ไปทำปฏิกิริยากับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีหลุม blank (เติมน้ำปริมาตร 20 μl ผสมกับ 90 μM ของ DPPH ปริมาตร 180 μl) หลุม sample blank (เติมสารสกัดพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ 20 μl ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 180 μl) และหลุม sample ที่เติมสารสกัดพืชปริมาตร 20 μl ผสมกับ 90 μM ของ DPPH ปริมาตร 180 μl จากนั้นนำตัวอย่างบ่มในที่มืดที่ อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้น คำนวณ %inhibition ตามสมการ ใช้ Ascorbic acid เป็นสารเทียบมาตรฐาน

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs control} - (\text{Abs sample} - \text{Abs sample blank})}{\text{Abs control}} \times 100$$

3.2.4.2 วิธี ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS cation radical solution โดยผสม 7 mM ABTS กับ 140 mM $K_2S_2O_8$ ให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายสีฟ้าเขียวเข้ม จากนั้นเจือจาง $ABTS^{+}$ reagent ที่ได้มาด้วยน้ำกลั่นให้มีค่า absorbance เท่ากับ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm ซึ่งจะใช้เป็นสารทดสอบความสามารถกำจัด $ABTS^{+}$ โดยนำสารสกัดกระเทียม และ Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ($\mu\text{g/ml}$) ปริมาตร 10 μl มาใส่สารละลาย $ABTS^{+}$ reagent ปริมาตร 490 μl ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เทียบกับหลอดควบคุมที่ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 10 μl กับสารละลาย $ABTS^{+}$ reagent ปริมาตร 490 μl แล้วคำนวณหาความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ เทียบเท่ากับ Trolox จากค่า % inhibition ของสารละลายมาตรฐาน Trolox กับความเข้มข้นสารพืช คำนวณ % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs control} - (\text{Abs sample} - \text{Abs sample blank})}{\text{Abs control}} \times 100$$

3.3 การศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

นำสารสกัดกระเทียมมาสังเคราะห์อนุภาคนาโน ใช้สารละลาย sodium selenite กับสารสกัดกระเทียม ภายใต้สภาวะการกระตุ้นด้วย ascorbic acid ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ได้แก่

3.3.1 ความเข้มข้นของ Sodium selenite ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นของ sodium selenite 10, 20 และ 30 mM ปริมาตร 20 ml ละลายสารสกัดกระเทียม 0.06 g (ความเข้มข้น 3mg/ml) บ่มบน shaker 10 นาที ค่อยๆหยด ascorbic acid 80 mM จนเปลี่ยนสีเป็นสีส้มอ่อน ซึ่งสภาวะ sodium selenite 10, 20 และ 30 mM หยด ascorbic acid 80 mM ปริมาตร 2.9 ml จากนั้นบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง เก็บตะกอนอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,363 rpm นาน 40 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย PBS นำไป sonicate ที่ความถี่ 20% นาน 2 นาที 2-3 ครั้ง ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (3.2.4) และสังเกตลักษณะอนุภาคในระหว่างเก็บที่ 4°C

3.3.2 ความเข้มข้นของสารพิษที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่สภาวะ sodium selenite 10 mM ปริมาตร 20 ml ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 2.5, 3 และ 4 mg/ml บ่ม 10 นาที ค่อยๆหยด ascorbic acid 80 mM จนครบ 2.9 ml บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 48 และ 72 ชั่วโมง บน shaker เก็บตะกอนอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,363 rpm นาน 40 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย PBS นำไป sonicate ที่ความถี่ 20% นาน 2 นาที 2-3 ครั้ง ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (3.2.4) และสังเกตลักษณะอนุภาคในระหว่างเก็บที่ 4°C

3.3.3 เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมใช้สภาวะ sodium selenite 10 mM ปริมาตร 20 ml ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 3 mg/ml บ่มบน shaker 10 นาที ค่อยๆหยด ascorbic acid 80 mM จนเปลี่ยนสีเป็นสีส้มอ่อน ใช้ปริมาตร 2.9 ml บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 4, 12, 48 และ 72 ชั่วโมง บน Shaker เก็บตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,363 rpm นาน 40 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย PBS นำไป sonicate ที่ความถี่ 20% นาน 2 นาที 2-3 ครั้ง ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (3.2.4) และสังเกตลักษณะอนุภาคในระหว่างเก็บที่ 4°C

3.3.4 เวลาและความเป็นกรด - ด่างที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมใช้สภาวะ sodium selenite 10 mM ปริมาตร 20 ml ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 3 mg/ml บ่มบน shaker 10 นาที ค่อยๆหยด ascorbic acid 80 mM จนครบ 2.9 ml ปรับ pH เป็น 4, 6, 8, 10 และไม่ปรับ pH บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง บน shaker ซึ่งสภาวะที่ไม่ปรับ pH มี pH อยู่ในช่วง 5.3 – 5.5 การเก็บตะกอนอนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,363 rpm นาน 40 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย PBS นำไป sonicate ที่ความถี่ 20% นาน 2 นาที 2-3 ครั้ง ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (3.2.4) และสังเกตลักษณะอนุภาคในระหว่างเก็บที่ 4°C

3.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

3.4.1 การศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

3.4.1.1 วิธี DPPH assay ตามวิธีการทดลองที่ 3.2.4.1

3.4.2 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเทียบกับยาด้านมะเร็ง

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยมีเซลล์ปกติคือ เซลล์ปอด (MRC-5) ที่เป็นตัวควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงลงใน 96 well plates บ่มเลี้ยงในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 24-48 ชั่วโมงให้เซลล์ได้ประมาณ 80% confluence ใ้

สารตัวอย่างที่จะศึกษา บ่มตามเวลาที่ต้องการ แล้ววิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และนำค่า % ความมีชีวิตมาสร้างกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่มีผลให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง 50% (IC_{50}) โดยจะทำการศึกษาความสามารถในยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ดังนี้

3.4.2.1 ศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคนาโนซิลิเนียมจากกระเทียมและกระเทียมที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

3.4.2.2 ศึกษาฤทธิ์ของยาด้านมะเร็ง Tamoxifen ดูการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ใช้ความเข้มข้นของ Tamoxifen ตั้งแต่ 11, 9, 7 และ 6 $\mu\text{g/ml}$ บ่ม 24 ชั่วโมง

3.4.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกใช้ loop เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจาก stock แข็งแรงโดย streak ไปบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop เขี่ยโคลนเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient Broth (Sharma, Sharma et al.) บ่มอุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งแบคทีเรียเจริญเติบโตประมาณ 10^8 CFU/ml จึงนำมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนี้

3.4.3.1 วิธี Agar diffusion

เตรียมอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) ลงใน plate ปริมาตร 25 ml เมื่ออาหารแข็งตัว นำเชื้อที่เตรียมในอาหารเหลวที่มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml เจือจางให้ได้เชื้อประมาณ $2-3 \times 10^6$ cells/ml จากนั้นนำเชื้อเกลี่ยให้ทั่ว plate ปล่อยให้เชื้อแห้ง นำ corkborer เจาะรูบน plate ตามจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบจะใส่ตัวอย่างหลุมละ 30 μl โดยอนุภาคนาโนซิลิเนียมใช้ที่ความเข้มข้น 10 และ 5 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ถ้าตัวอย่างมีความสามารถต้านแบคทีเรียจะเกิดบริเวณใส (clear zone) และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสโดยใช้ vernier caliper

3.4.3.2 วัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Turbidity assay)

นำเชื้อแบคทีเรียเตรียมในอาหารเหลวที่มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml เจือจางให้มีความเข้มข้นประมาณ $1-2 \times 10^5$ cells/ml ลงใน 96 well plates หลุมละ 100 μl ในการศึกษาใช้อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250-0.12 $\mu\text{g/ml}$ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (TECAN Sunrise, Australia) คำนวณเป็นค่า %การยับยั้งการเจริญด้วยสมการดังต่อไปนี้

$\% \text{ growth inhibition} = (\text{OD control} - (\text{OD sample} - \text{OD sample blank}) / \text{OD control}) * 100$

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

นำอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometer, Scanning Electron Microscope, Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

3.5.1 UV-visible spectrophotometer

เทคนิค UV-visible spectrophotometer ใช้หลักการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเบื้องต้น โดยนำสารละลายอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละภาวะ 1 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 20 ml นำมาปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนที่ความเร็วรอบ 13,363 rpm นาน 40 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml และเจือจางสารละลาย 1:5 จึงมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 200-700 nm

3.5.2 Scanning Electron Microscope

เทคนิค Scanning Electron Microscope ใช้ศึกษาลักษณะพื้นฐานของอนุภาคนาโนซีลีเนียม การเตรียมตัวอย่างแบบผง ใช้การเตรียมแบบผงทั่วไปตัวอย่างชนิดผงที่มีขนาด 10 ไมครอนขึ้นไป สามารถติดบนแท่นชิ้นงานได้เลย โดยพยายามคิดให้อนุภาคเรียงตัวในลักษณะเดี่ยวๆ ไม่เกาะกลุ่มกัน การยัดติดโดยใช้เทปกาวยาคาร์บอนสองหน้า ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

3.5.3 Energy Dispersive Spectroscopy (EDS/EDX)

เป็นการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากกระเทียมซึ่งจะวิเคราะห์ควบคู่กับเครื่อง Scanning Electron Microscope ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

3.5.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

เทคนิค FTIR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุล การเตรียมตัวอย่างตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR จะอยู่ในสถานะของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซก็ได้ โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของแข็ง วิธีการเตรียมตัวอย่างบดตัวอย่างให้มีความละเอียดจากนั้นทำการผสมตัวอย่างเข้ากับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ในโถรงบดสาร โดยให้ตัวอย่างมีความเข้มข้น ประมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ และบดสารให้ละเอียดโดยให้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอจากนั้นใส่ตัวอย่างที่บดแล้วลงในแม่พิมพ์และนำไปอัดด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิกให้มีความดันประมาณ 15,000 ทิ้งไว้ 1-2 นาทีและถอดตัวประกอบแม่พิมพ์ออกตัวอย่างจะติดอยู่ที่แม่พิมพ์ มีลักษณะเป็นวงกลมใส ตัวอย่างจะกระจายอยู่บนโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วนำตัวอย่างเข้าเครื่อง FTIR ส่งวิเคราะห์

คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม ภาควิชาปิโตรเคมีและวัสดุพอลิเมอร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

3.5.5 Zeta potential และ PDI

เป็นการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้าสามารถใช้อธิบายความเสถียร การเตรียมตัวอย่างโดยใช้นุภาคนาโนซีลีเนียมที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ละลายด้วยน้ำ DI ส่งวิเคราะห์ที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สภาวะของเครื่องที่ใช้ คือ อุณหภูมิ 25 °C กำหนดขนาดอนุภาคให้น้อยกว่า 1000 nm ส่งวิเคราะห์ที่หน่วยภูมิปัญญาทางเภสัชศาสตร์ "ประโชติ เป็ล่งวิทยา" คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

3.6 การศึกษาศักยภาพการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

นำอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะเหมาะสมมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยทำการทดลองตามวิธีการทดลองที่ 3.4.2.1 ในทุกๆ 1 เดือนเป็นเวลาประมาณ 6 เดือน เพื่อเป็นการหาอายุการเก็บรักษาของอนุภาคนาโนซีลีเนียม (Shelf life)

3.7 วิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดมีการทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญถูกคำนวณโดยการวิเคราะห์แบบ one-way ANOVA และ two sample T- test โดยใช้โปรแกรม โปรแกรม SPSS Statistics เวอร์ชัน 22.0

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้สารพฤกษศาสตร์เคมีไปทำหน้าที่เป็น reducing agent และ capping agent ที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่ไอออนโลหะและทำให้เกิดการรวมตัวเป็นอนุภาคนาโนโลหะที่เสถียร ผลการศึกษาสารองค์ประกอบหลักและความสามารถรีดิวซ์ของสารสกัดกระเทียมและปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

4.1 การศึกษาสารองค์ประกอบหลักและความสามารถรีดิวซ์ของสารสกัดกระเทียม

การวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบ Phenolic และ Flavonoid ของสารสกัดกระเทียมได้ใช้วิธีทางเคมี คือ Folin-ciocalteu assay และ Aluminium chloride colorimetric assay ตามลำดับ และทำเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) ในการหาสารองค์ประกอบ Phenolic และเทียบกับสารมาตรฐาน Catechin ($\mu\text{g/ml}$) ในการหาสารองค์ประกอบ Flavonoid รวมทั้งได้วิเคราะห์ความสามารถรีดิวซ์ของกระเทียมจากการหาค่า IC_{50} (Inhibition concentration 50%) หรือความเข้มข้นสารที่มีผลยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ต่อไป

4.1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

สารองค์ประกอบ Phenolic ของกระเทียมมีโครงสร้างเป็น phenolate ions ในสารละลายต่าง ซึ่งจะสามารถรีดิวซ์ Folin-Ciocalteu reagent ที่เป็นสีเหลือง ให้เป็นสีฟ้าในวิธี Folin-ciocalteu assay ซึ่งเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) และคำนวณหาปริมาณ total phenolic compound จาก กราฟมาตรฐาน จะได้ปริมาณ total phenolic ในหน่วยของ mg GAE/g sample การวิเคราะห์สารสกัดกระเทียม พบว่ากระเทียมสกัดมีปริมาณ total phenolic compound 3.09±0.018 mg GAE/g ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์จากการสกัดกลีบกระเทียมสดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ซึ่งปริมาณ total phenolic compound ของกระเทียมสดที่สกัดด้วยน้ำ มีค่าเท่ากับ 2.97±0.58 mg GAE/g sample (Kallel, Driss et al. 2014) แสดงถึงกระเทียมสดขาวละออเกอส์มีปริมาณ total phenolic ไม่แตกต่างจากกระเทียมสด

4.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ total flavonoid ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric method

flavonoids ในกระเทียมจะเกิด chelate อีออนของ Al^{3+} แล้วได้เป็นสารเชิงซ้อนที่ละลายน้ำสีส้มแดงที่วัดค่าดูดกลืนแสงในวิธี aluminium chloride colorimetric assay ได้ ซึ่งเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน catechin ($\mu\text{g/ml}$) และคำนวณปริมาณ flavonoids จากกราฟมาตรฐาน จะหาปริมาณ

flavonoids ในหน่วย mg Catechin/g sample พบว่าสารสกัดกระเทียมมีปริมาณ flavonoids 0.0149 ± 0.006 mg Catechin /g sample ขณะที่วิธีการสกัดก๊ิบกระเทียมสดด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบปริมาณ flavonoids จากสารสกัดกระเทียมโดยใช้น้ำ เทียบกับสารมาตรฐาน Quercetin จะมีปริมาณ flavonoids เท่ากับ $.045 \pm 0.01$ mg QE /g sample (Kallel, Driss et al. 2014) เห็นได้ว่าปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดกระเทียมจะมีมากกว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ ในลักษณะเดียวกันกับพืชทั่วไปที่พบมีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าฟลาโวนอยด์ อย่างไรก็ตาม ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ยังแตกต่างกันได้ ขึ้นกับสายพันธุ์พืช วิธีการเพาะปลูก การสกัด และการวิเคราะห์ ซึ่งในที่นี้พบปริมาณ flavonoids แตกต่างกันอย่างเนื่องจากการใช้สารมาตรฐานในการเปรียบเทียบต่างชนิดกัน

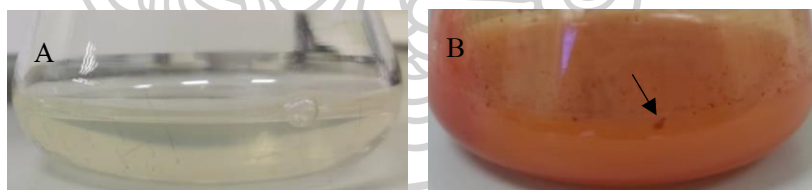
4.1.3 ความสามารถรีดิวซ์ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay

การวัดความสามารถให้อิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method โดย ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์ในสภาวะ pH ต่ำๆ ด้วยสารที่มีฤทธิ์ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ (reductant) แล้วเกิดเป็น ferrous-tripyridyltriazine complex (Fe^{2+} -TPTZ complex) ที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งความสามารถรีดิวซ์ Ferric ของกระเทียมจะทำเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ($\mu\text{g/ml}$) และแสดงผลในหน่วย mg Trolox /g sample จากผลที่ได้ พบว่ากระเทียมขาวล่อมีความสามารถรีดิวซ์ Ferric ได้ 4.78 ± 0.034 mg Trolox /g sample ขณะที่กระเทียมสดที่หั่นละเอียดและต้มกับน้ำมีความสามารถในการรีดิวซ์ Ferric เทียบเท่ากับสารมาตรฐานเท่ากับ 1.13 ± 0.31 mg Trolox /g sample (Wiwat and Wallaya 2009) ซึ่งค่าที่แตกต่างกันอาจจะเกิดจากวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน โดยกระเทียมขาวล่อจะทำโดยการสกัดสดและระเหยน้ำในน้ำคั้นกระเทียมให้เป็นผงแห้งด้วย spray dry

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์สารสำคัญและความสามารถรีดิวซ์ของกระเทียมขาวล่อ พบว่ากระเทียมขาวล่อมีปริมาณสารฟีนอลิกมากกว่าฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารทั้งสองมีสมบัติในการรีดิวซ์ได้ ตามวิธีวิเคราะห์ folin-ciocalteu assay และ ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) ที่อาศัยหลักการรีดิวซ์ของสาร และกระเทียมขาวล่อยังมีฤทธิ์จับโลหะจากวิธีวิเคราะห์ aluminium chloride colorimetric assay ที่การเกิดสีเกิดจากสารกลุ่ม flavonoids จับกับ aluminium ดังนั้นกระเทียมขาวล่อจึงอาจนำไปใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมจากบทบาทการเป็น reducing agent และ capping agent ได้

4.2 การศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

sodium selenite เป็นแหล่งของธาตุซีลีเนียมที่นำไปสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม ซึ่งสภาวะแรกในการสังเคราะห์ได้ใช้สารสกัดกระเทียมกับสารละลาย sodium selenite โดยไม่ใส่ ascorbic acid พบว่าสารละลายในสภาวะบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้องไม่เปลี่ยนเป็นสีส้มแดงที่ระบุการเกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียม แม้บ่มนานเป็นสัปดาห์ (รูปที่ 11A) แสดงถึงสารสกัดกระเทียมมีความแรงการเป็นสารรีดิวซ์ไม่เพียงพอให้ Se^{4+} เปลี่ยนไปเป็น Se^0 และเมื่อทำการสังเคราะห์โดยใช้ sodium selenite และ ascorbic acid และไม่มีการใส่สารสกัดกระเทียม พบว่าเกิดการเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง แต่มีลักษณะเป็นเม็ดๆ ในสารละลาย (รูปที่ 11B) แสดงถึง ascorbic acid สามารถรีดิวซ์ Se^{4+} ไปเป็น Se^0 ได้ดี ซึ่ง Se^0 เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ และไม่เสถียร จึงเกิดการจับกลุ่มให้เห็นเป็นเม็ดเล็กจากการขาดสารหุ้มให้ Se^0 เกิดความเสถียร ดังนั้นการสังเคราะห์ต่อไป จึงมีการใส่ ascorbic acid ช่วยกระตุ้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม และมีใส่สารสกัดกระเทียมไปทำหน้าที่ reducing agent และเป็นตัวหุ้ม (capping agent) ให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีความเสถียร อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมให้มีขนาดเล็ก มีความสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆ ในที่นี้ จึงทำการศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมดังในสภาวะต่อไปนี้ เพื่อคัดกรองเลือกสภาวะของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เหมาะสมจากฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านมะเร็ง และต้านอนุมูล DPPH ต่อไป



รูปที่ 11 แสดงสภาวะที่ใส่ sodium selenite และสารสกัดกับกระเทียม (A) และสภาวะที่ใส่ sodium selenite และ ascorbic acid (B) อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง แสดงการจับกลุ่มอนุภาคตามลูกศร

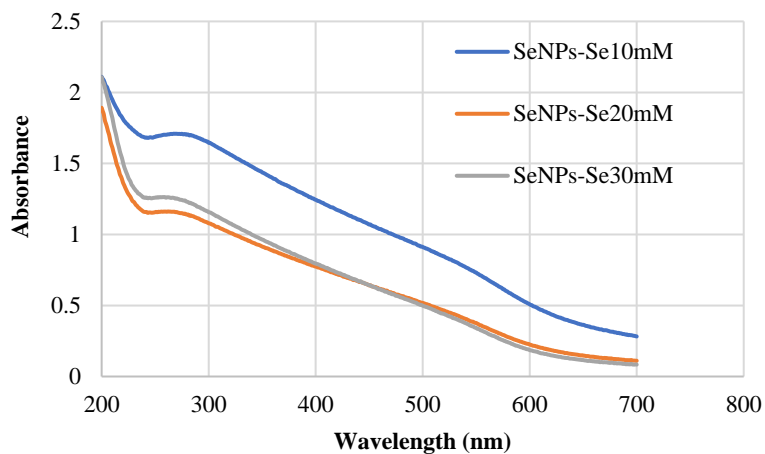
4.2.1 ผลความเข้มข้นของ sodium selenite ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่สภาวะใช้ sodium selenite 10, 20 และ 30 mM ปริมาตร 25 ml และมีความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 3 mg/ml บ่ม 10 นาที ค่อยๆหยด ascorbic acid 80 mM จนครบ 2.9 ml บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง บน shaker 130 rpm (รูปที่ 12) เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer เกิดพีคประมาณ 270, 250, 250 nm ตามลำดับ (รูปที่ 13) เมื่อวิเคราะห์ขนาดและลักษณะรูปร่างของ

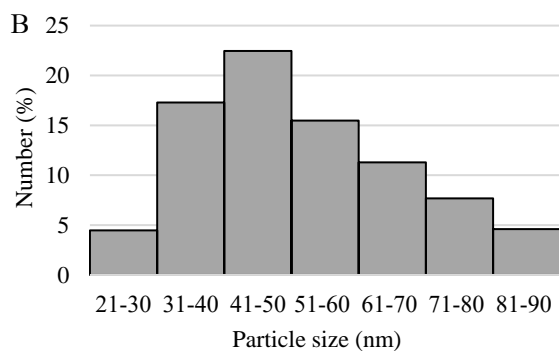
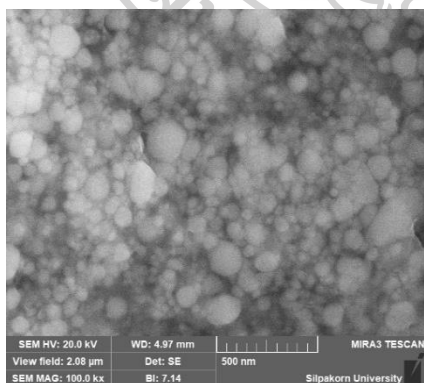
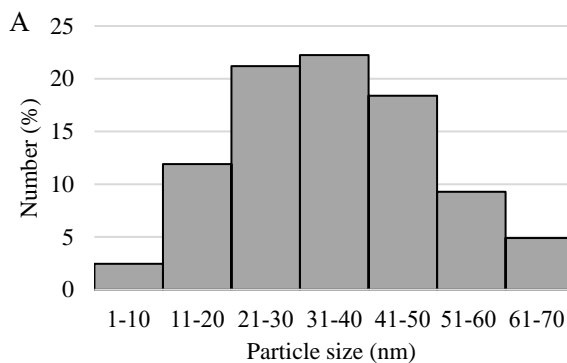
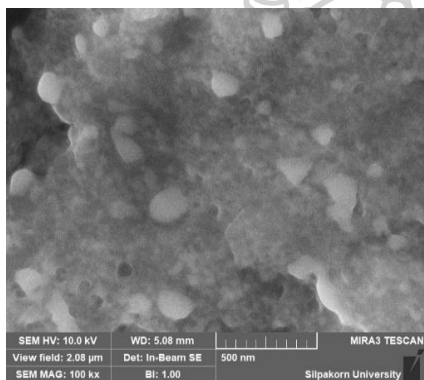
อนุภาคนาโนซีลีเนียมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะใส่ sodium selenite ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM มีรูปร่างทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 11-70, 31-70 และ 31-100 nm ตามลำดับ (รูปที่ 14) เมื่อวิเคราะห์ธาตุบนผิวของอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วย EDS พบ % selenium ในอนุภาคมีปริมาณมากตามสภาวะการใส่ sodium selenite ในการสังเคราะห์ และยังพบธาตุคาร์บอน ใน โตรเจน ออกซิเจน และซัลเฟอร์ที่เป็นธาตุองค์ประกอบของสารชีวโมกุลในกระเทียม เนื่องจากกระเทียมมีสารองค์ประกอบซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบหลักจาก allicin ที่เป็น organosulfur (รูปที่ 15) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์เอกลักษณ์ขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมทั้ง 3 สภาวะพบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ใช้ Sodium selenite 10 mM ให้อนุภาคนาโนขนาดเล็กกว่าสภาวะใช้ Sodium selenite ที่ 20 และ 30 mM ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Anu และคณะ (2016) ที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมความเข้มข้น 0.1 g/ml ปริมาตร 2 ml และใช้ Sodium selenite 10 mM บ่ม 5-7 วัน เกิดพีคที่ 260 nm มีขนาดอยู่ในช่วง 40-100 nm (Anu, Singaravelu et al. 2016) และงานวิจัยที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่ใช้ selenious acid 30 mM บ่ม 2 วัน เกิดพีคในช่วง 200-300 nm มีขนาดประมาณ 205 nm (Ezhuthupurakkal, Polaki et al. 2017)

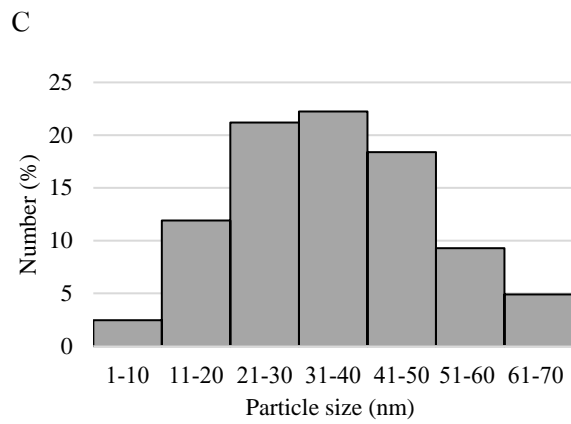
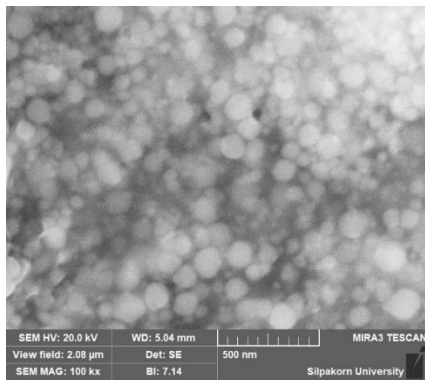


รูปที่ 12 สารละลายอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสภาวะการใส่ sodium selenite ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM ที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง



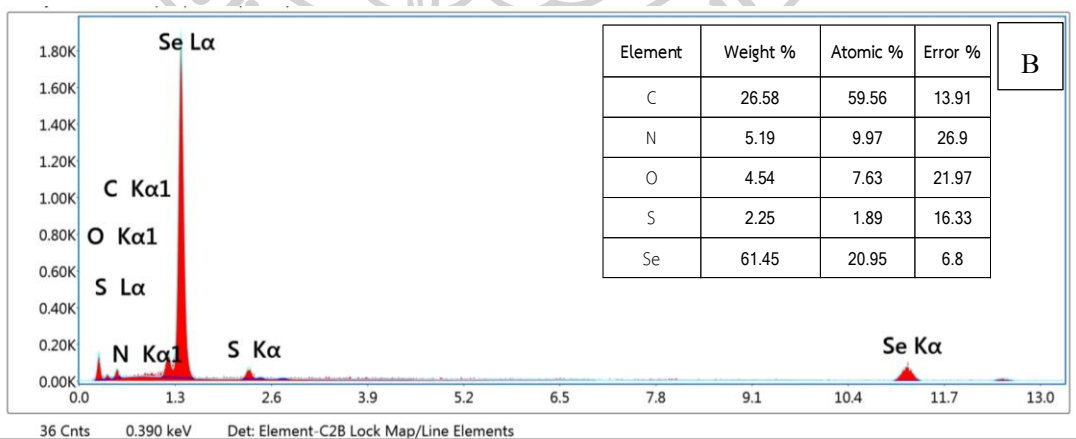
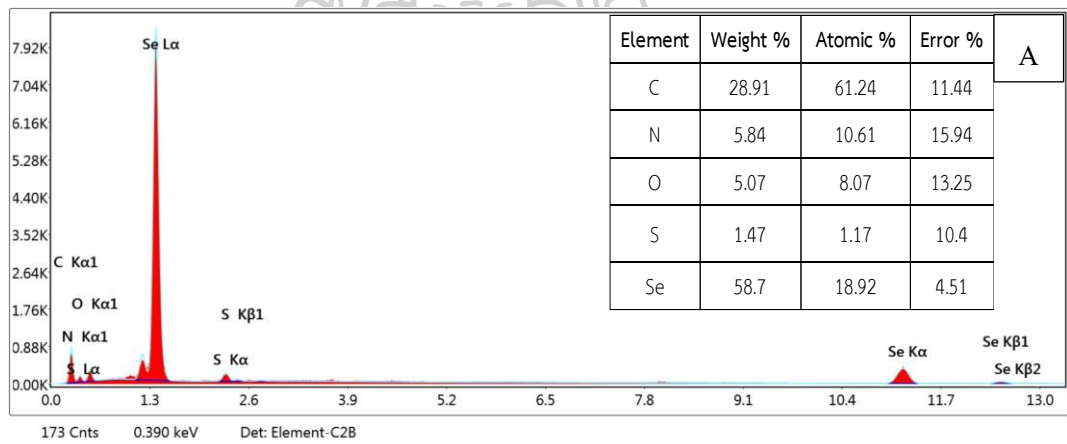
รูปที่ 13 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ความเข้มข้นของ sodium selenite ที่ 10, 20 และ 30 mM ที่เวลาป่ม 72 ชั่วโมง





รูปที่ 14 รูปจากกล้องจุลทรรศน์

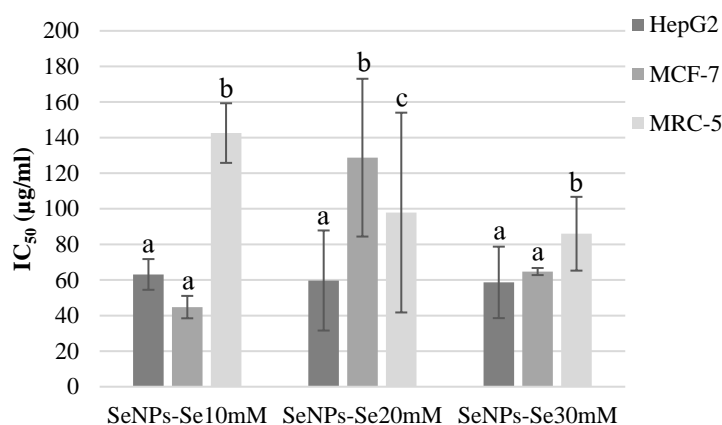
อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะการสังเคราะห์ใช้ sodium selenite 10 mM (A), สภาวะการสังเคราะห์ใช้ sodium selenite 20 mM (B) และสภาวะการสังเคราะห์ใช้ sodium selenite 30 mM (C) บ่ม 72 ชั่วโมง





รูปที่ 15 Energy dispersive Spectrometry (EDS) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะการสังเคราะห์ใช้ sodium selenium 10 mM (A), 20 mM (B) และ 30 mM บ่ม 72 ชั่วโมง

การคัดกรองอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์จาก sodium selenite ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 mM โดยวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าทั้ง 3 ชนิดอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ได้ทำโดยบ่มเซลล์กับอนุภาคทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay และนำค่า IC_{50} มาเปรียบเทียบ ผลจากรูปที่ 16 พบว่า อนุภาคจากสภาวะที่ใช้ sodium selenite ความเข้มข้น 10 mM ให้อนุภาค ที่ให้ค่า IC_{50} ต่อเซลล์ปกติ (MRC-5) สูงกว่าเซลล์มะเร็งตับ และเซลล์มะเร็งเต้านมมากกว่าอนุภาคจากสภาวะความเข้มข้น sodium selenite อื่นๆ แสดงถึงอนุภาคจากสภาวะใช้ sodium selenite 10 mM สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติพบว่าที่สภาวะใช้ sodium selenite 10 mM มีความเป็นพิษน้อยที่สุดและขนาดของอนุภาคที่สภาวะการสังเคราะห์นี้ยังมีขนาดเล็กที่สุด อย่างไรก็ตาม อนุภาคยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ ซึ่งคาดว่าอาจเป็นผลจากสารพิษที่ใช้หุ้มมีปริมาณน้อยไป ดังนั้น จึงทดลองโดยการใส่สภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ใช้ความเข้มข้นของ sodium selenite 10 mM ที่ให้การยับยั้งเซลล์มะเร็งดี มาสังเคราะห์อนุภาคในสภาวะที่มีความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมแตกต่างกัน

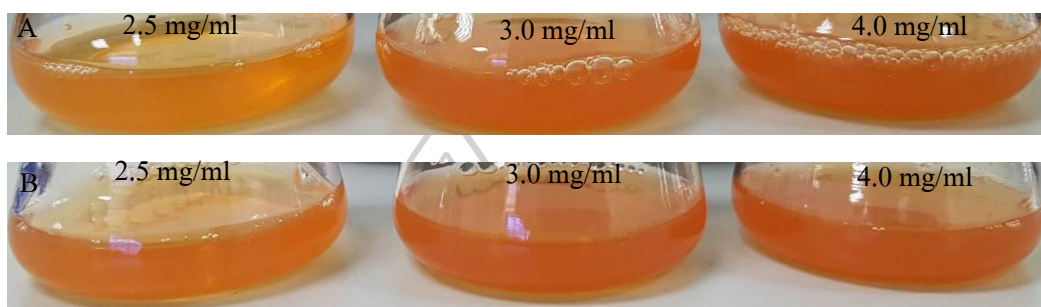


รูปที่ 16 ค่า IC₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ใช้ความเข้มข้นของ Sodium selenite ต่างกัน บ่ม 72 ชั่วโมงของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งค่า IC₅₀ ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสถานะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3) โดยเปรียบเทียบ สารชุดเดียวกันกับเซลล์ไลน์ต่างกัน

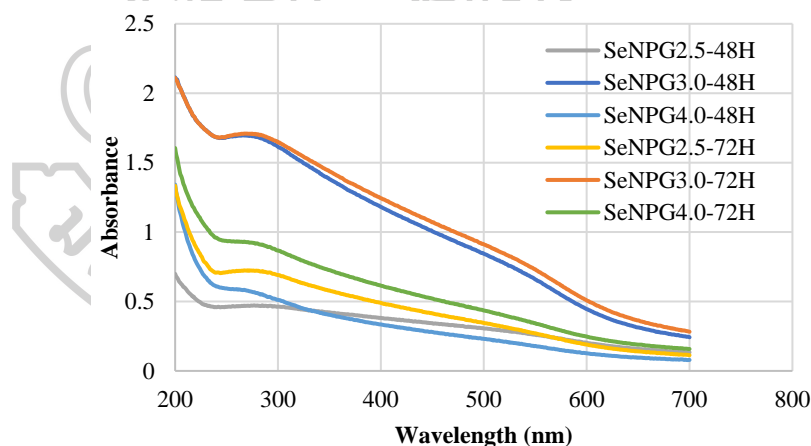
4.2.2 ผลความเข้มข้นของสารพีซีที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมในสถานะใช้ sodium selenite 10 mM ปริมาตร 20 ml และใช้สารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 2.5, 3 และ 4 mg/ml บ่มเขย่า 10 นาที แล้วค่อยๆหยด ascorbic acid 80 mM จนครบ 2.9 ml บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 48 และ 72 ชั่วโมงบน shaker 130 rpm (รูปที่ 17A และB) พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง โดยสีจะเข้มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นกระเทียมสกัดมากขึ้น เมื่อนำอนุภาคในสารละลายแขวนลอยสีส้มแดงที่ได้มาปั่นเหวี่ยง ล้าง และศึกษาสมบัติกายภาพของอนุภาค โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer พบมีพีคในช่วงประมาณ 260-280 nm ที่ทุกสถานะของความเข้มข้นสารสกัดกระเทียม (รูปที่ 18) อย่างไรก็ตาม สังเกตพบว่าสารละลายแขวนลอยสีส้มแดงในสถานะใช้ กระเทียมสกัด 3 mg/ml มีการตกตะกอนช้าที่สุด เมื่อทำการเก็บในรูปของสารละลายที่อุณหภูมิ 4°C โดยสามารถเก็บได้ถึง 14 วันจึงเริ่มพบมีการตกตะกอนที่ปลายหลอดเล็กน้อย ขณะที่สถานะที่ใช้ สารสกัดกระเทียม 2.5 และ 4 mg/ml ระยะเวลาสังเคราะห์ 48 และ 72 ชั่วโมง ให้อนุภาคแขวนลอยที่ เริ่มตกตะกอนในช่วงการเก็บที่ 3-7 วันและที่สถานะใช้สารสกัดกระเทียม 4 mg/ml ไม่สามารถกรอง ผ่านตัวกรอง 0.45 µm ได้ดี ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากการใส่สารสกัดกระเทียมที่มีหน้าที่เป็นตัวหุ้ม เกิดการหุ้มน้อยเกินไปเมื่อใช้ความเข้มข้นกระเทียมสกัดน้อย ทำให้อนุภาคไม่เสถียรและเกาะจับกัน หรืออาจมีการหุ้มมากเกินไปในกรณีใช้ความเข้มข้นกระเทียมมาก แล้วทำให้เกิดการรวมกลุ่มของ

อนุภาคผ่านสารประกอบพีซีให้มีขนาดใหญ่ และไม่สามารถกรองผ่านตัวกรองได้ ซึ่งอนุภาคแขวนลอยเหล่านั้นจะเกิดการตกตะกอนอย่างรวดเร็ว จากผลการวิเคราะห์การตกตะกอน และการกรองผ่านตัวกรอง 0.45 μm พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ใช้สารสกัดจากกระเทียม 3 mg/ml ที่ระยะเวลาบ่มสังเคราะห์ 48 และ 72 ชั่วโมง นำให้อนุภาคที่มีความเสถียรกว่าสภาวะความเข้มข้นอื่นๆของกระเทียม



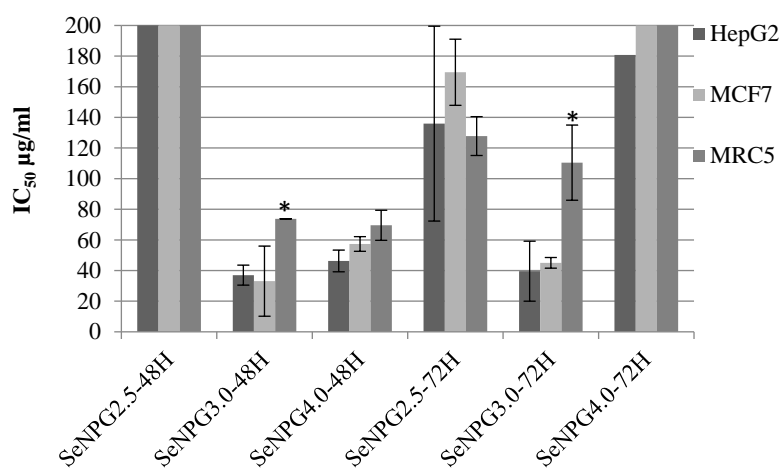
รูปที่ 17 สารละลายอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะการสังเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมต่างๆ ที่บ่ม 48 ชั่วโมง (A) และ 72 ชั่วโมง (B)



รูปที่ 18 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมใช้ความเข้มข้นสารสกัดกระเทียมที่ 2.5, 3 และ 4 mg/ml ที่เวลาบ่ม 48 และ 72 ชั่วโมง

อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้จากใช้สารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 2.5, 3 และ 4 mg/ml ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อนำมาคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมและระยะเวลาบ่มมีผลต่อฤทธิ์ของอนุภาค โดยสภาวะที่ใช้สารสกัดกระเทียม 3 mg/ml บ่ม 72 ชั่วโมง มีแนวโน้มดีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดี ขณะที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติไม่มาก ส่วนอนุภาคจากสภาวะใช้สารสกัดกระเทียม 2.5 mg/ml

บ่ม 48 และ 72 ชั่วโมงและ 4 mg/ml บ่ม 72 ชั่วโมงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
 สันนิษฐานว่าอนุภาคที่สภาวะดังกล่าวไม่เสถียร จึงอาจเกิดการจับตกตะกอน ดังในสภาวะเก็บ
 สารละลาย ซึ่งอาจทำให้อนุภาคเหล่านั้นเข้าเซลล์ให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งไม่ได้ ส่วนอนุภาคนาโนซีลีเนียม
 สภาวะที่ใช้สารสกัดกระเทียม 3 mg/ml บ่ม 48 ชั่วโมง และ 4 mg/ml บ่ม 48 ชั่วโมง อาจมีการหุ้มดี
 จึงเสถียรเป็นอนุภาคเล็กๆ ที่เข้าเซลล์ให้เกิดฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเซลล์มะเร็งได้ และพบยับยั้ง
 เซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเซลล์ปกติเล็กน้อย (รูปที่ 19) ส่วนการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี
 DPPH assay ของอนุภาคที่ได้ ยังคงพบในลักษณะเดิมที่อนุภาคทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
 DPPH ดังนั้นจึงใช้สภาวะใช้ sodium selenite 10 mM สารสกัดกระเทียม 3 mg/ml บ่ม 72 ชั่วโมงใน
 การศึกษาเกี่ยวกับสภาวะ pH ต่อไป เนื่องจาก pH มีผลต่อรูปร่างและขนาดของอนุภาคซีลีเนียมได้



รูปที่ 19 ค่า IC_{50} ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมแตกต่างกันและ
 เวลาบ่ม 48 และ 72 ชั่วโมงของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ
 (MRC-5) ซึ่งค่า IC_{50} ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (* $P < 0.05$) (n=3)
 โดยเปรียบเทียบสารชุดเดียวกันกับเซลล์ไลน์ต่างกัน

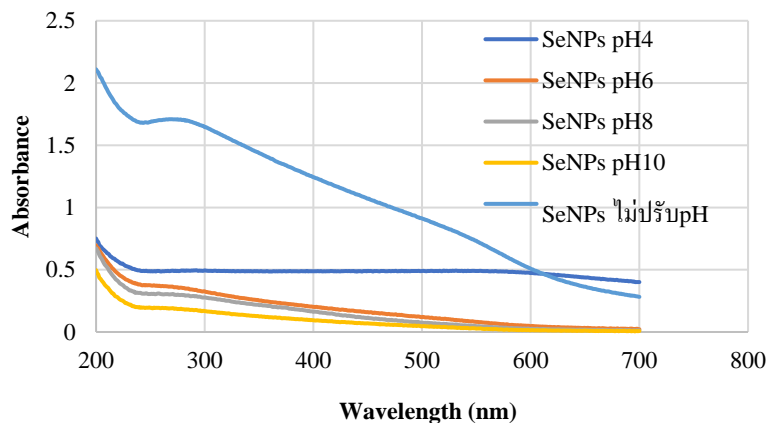
4.2.3 ความเป็นกรด – ด่างที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม โดยใช้สภาวะที่มี sodium
 selenite 10 mM ปริมาตร 20 ml ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 3 mg/ml บ่มบน shaker 10 นาที
 ค่อยๆหยด ascorbic acid 80 mM จนครบ 2.9 ml จากนั้นปรับ pH เป็น 4, 6, 8, 10 และไม่ปรับ pH
 และบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง บน shaker ซึ่งสภาวะที่ไม่ปรับ pH (มี pH อยู่ในช่วง 5.3 -
 5.5) (รูปที่ 20) พบว่าทุกสภาวะให้สารละลายแขวนลอยสีเหลืองอ่อน เว้นแต่สภาวะ pH 4 ที่

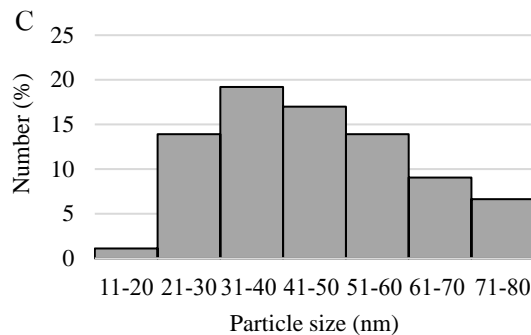
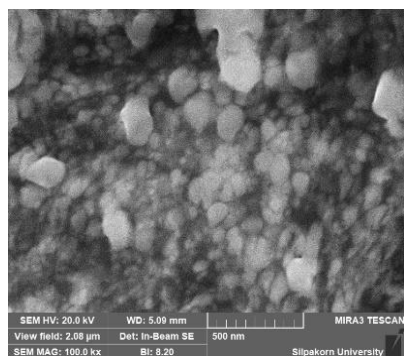
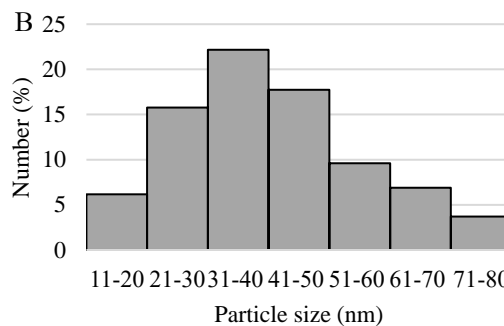
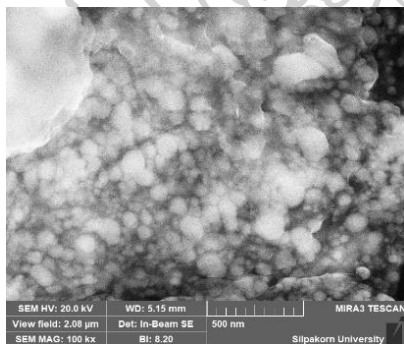
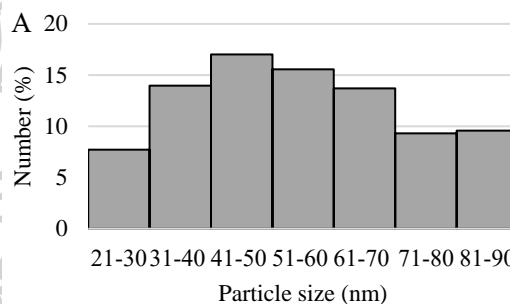
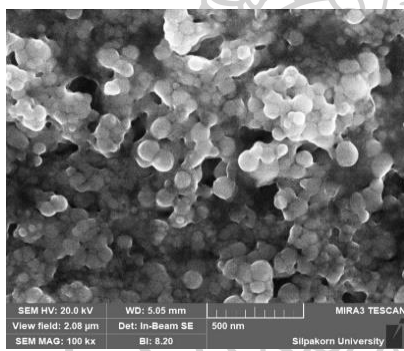
สารละลายเกิดเป็นสีส้มแดงทันที ขณะที่สภาวะอื่นสารละลายค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงมากขึ้นตามระยะเวลาบ่ม อย่างไรก็ตาม พบว่าสภาวะ pH ที่เป็นค่ามากขึ้น เกิดความเข้มข้นของสารละลายสีส้มลดลงตาม pH ที่มากขึ้น และพบมีเม็ดเล็กๆสีแดงในสภาวะบ่มที่ pH 4 ขณะที่ pH อื่นๆให้สารละลายแขวนลอยดี ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลว่า selenite มีสัมพันธภาพกับแร่ธาตุหลายชนิดและสารอินทรีย์ได้ดีที่ $\text{pH} < 7$ (Li, McGrath et al. 2008) เมื่อนำอนุภาคที่ได้มาปั่นเหวี่ยง ล้าง และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer พบพีคประมาณ 270 nm ในสภาวะที่ไม่ปรับ pH ขณะที่ในสภาวะ pH 4, 6, 8 และ 10 ไม่เกิดพีค (รูปที่ 21) ซึ่งอาจเป็นผลจากสภาวะเหล่านี้ก่อให้เกิดอนุภาคที่ไม่เสถียร จากการที่สารชีวภาพในสภาวะดังกล่าวเกิดการเสื่อม มีรายงานว่า allixin เป็นสารในกระเทียมที่มีความเสถียรได้ดีที่ pH 5-6 และ pH ที่สูงหรือต่ำกว่านี้ส่งผลให้ allixin เสื่อมสลายอย่างรวดเร็ว ส่วนการวิเคราะห์ขนาดและลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่สภาวะ pH 4 ให้อนุภาคขนาดช่วง 31-70 nm (รูปที่ 22) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าสภาวะที่เป็นค่าอื่น อาจเกิดจากสารสกัดกระเทียมที่เป็นตัวหุ้มของอนุภาคนาโนซีลีเนียมมีความเสถียรใน pH ที่ค่อนข้างเป็นค่าอื่น (Mansor, Herng et al. 2016) เมื่อมีการปรับ pH ให้เป็นกรดอาจจะให้ตัวหุ้ม หุ้มได้ไม่ดีจึงทำให้เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคทำให้อนุภาคมีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่กว่า ใน pH ที่เป็นค่าอื่นมีการหุ้มอนุภาคให้เกิดความเสถียรกว่า ส่วนสภาวะที่ไม่ปรับ pH ก็พบอนุภาคส่วนใหญ่ขนาดเล็ก 21-50 nm อย่างไรก็ตาม ควรศึกษาสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ต่อไป

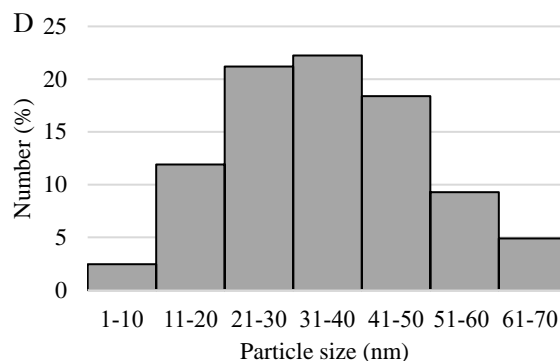
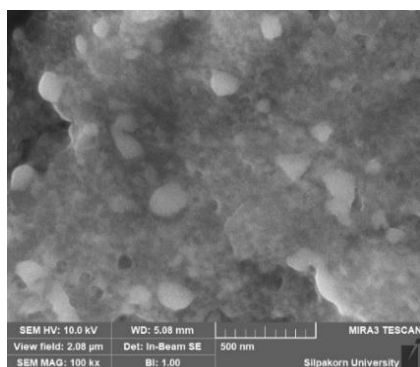


รูปที่ 20 สารละลายอนุภาคที่สภาวะปรับ pH 4, 6, 8, 10 และ ไม่ปรับ pH บ่ม 72 ชั่วโมง



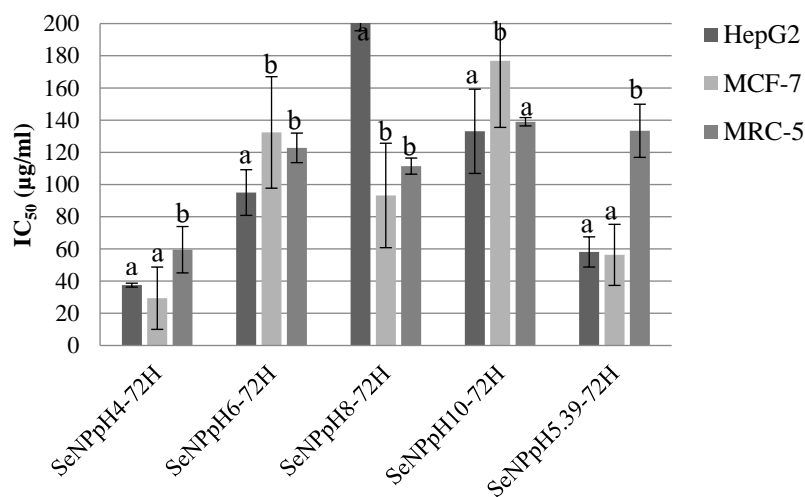
รูปที่ 21 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ปรับ pH 4, 6, 8, 10 และ ไม่ปรับ pH บ่ม 72 ชั่วโมง





รูปที่ 22 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ปรับ pH4 (A), pH8 (B), pH10 (C) และไม่ปรับ pH (D)

อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ได้จากการสังเคราะห์ภายใต้สภาวะบ่มที่ pH ต่างๆ เมื่อนำมาคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งพบว่าที่สภาวะไม่ปรับ pH มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (MRC-5) น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคที่ได้ในสภาวะ pH4 พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง แต่พบว่ามีพิษต่อเซลล์ปกติ (MRC-5) และอนุภาคจากสภาวะ pH 6, 8 และ 10 พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (MRC-5) และเซลล์มะเร็ง (รูปที่ 23) ดังนั้น จึงใช้สภาวะบ่มสังเคราะห์ที่ไม่ปรับ pH ในการศึกษาต่อไป



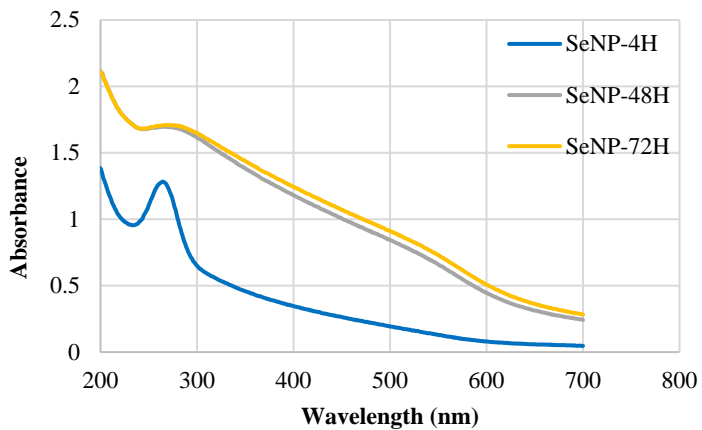
รูปที่ 23 ค่า IC₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่มีการปรับ pH แตกต่างกันและเวลาบ่ม 72 ชั่วโมงของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งค่า IC₅₀ ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3) โดยเปรียบเทียบสารชุดเดียวกันต่อเซลล์ไลน์ที่ต่างกัน

4.2.4 เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

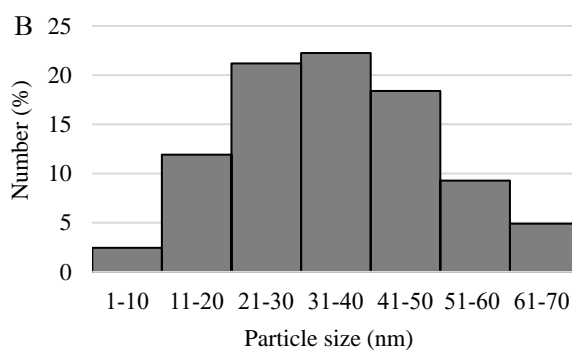
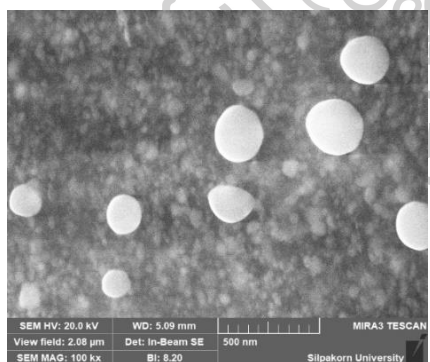
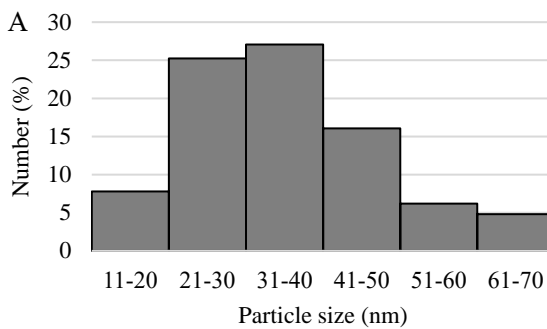
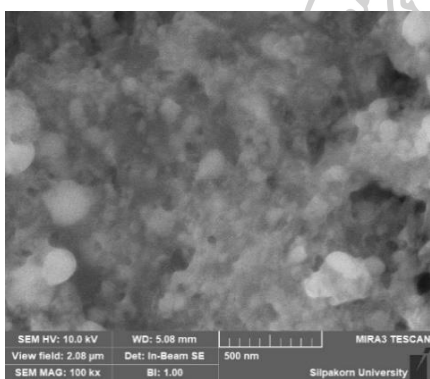
สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมใช้สภาวะ sodium selenite 10 mM ปริมาตร 20 ml ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 3 mg/ml บ่มบน Shaker 10 นาที ค่อยๆหยด ascorbic acid 80 mM จนเปลี่ยนสีเป็นสีส้มอ่อน ใช้ปริมาตร 2.9 ml ไม่ปรับ pH บ่มในที่มืดที่ อุณหภูมิห้อง 4, 48 และ 72 ชั่วโมง บน shaker ลักษณะของสารละลายในเวลาบ่มต่างๆจะพบว่าที่ 4 ชั่วโมง สีของสารละลายจะมีสีส้มอ่อนกว่าที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง แต่ทุกสภาวะบ่มมีลักษณะ แขนวลอยดี (รูปที่ 24) ซึ่งอนุภาคที่ได้เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยง ล้างและวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วง 200-700 nm พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาต่างๆ เกิดพีคประมาณ 260, 270 และ 270 nm ตามลำดับ โดยพีคที่เวลา 4 ชั่วโมงมีความชัดเจนที่สุด อาจเนื่องจากการเป็นระยะเริ่มๆที่ Se^{4+} เปลี่ยนเป็น Se^0 อนุภาคจึงมีขนาดเล็ก และจากปรากฏการณ์เซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนท์ (SPR) ของอนุภาค โลหะที่ทำให้เห็นพีคเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม พีคที่เกิดไม่ชัดเจนและให้ค่าดูดกลืนแสงไปทางความ ยาวคลื่นมากเมื่อเวลาบ่มนานขึ้น (รูปที่ 25) อาจเนื่องจากอนุภาค Se^0 ถูกหุ้มด้วยพีซีให้มีขนาดใหญ่ ขึ้น ตามที่ Lin และ Wang ปี 2005 รายงานไว้ ซึ่งเมื่อนำอนุภาคที่ได้ไปวิเคราะห์รูปร่างและขนาด ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์จากเวลา 4, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่ามีรูปร่างเป็นทรงกลมมี ขนาดอยู่ในช่วง 11-70 nm โดยมีแนวโน้มว่าอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเวลาบ่มนานขึ้น แต่ไม่เห็น ความแตกต่างให้เห็นชัดเจน (รูปที่ 26) ดังนั้น ทั้ง 3 สภาวะที่ใช้ในการบ่ม พบเวลาในช่วงศึกษาไม่มี ผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

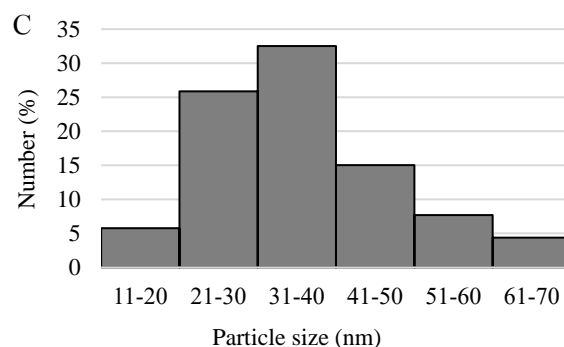
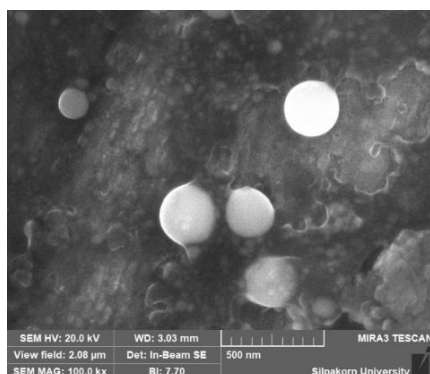


รูปที่ 24 สารละลายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่ม 4 ชั่วโมง (A), 48 ชั่วโมง (B) และ 72 ชั่วโมง (C)



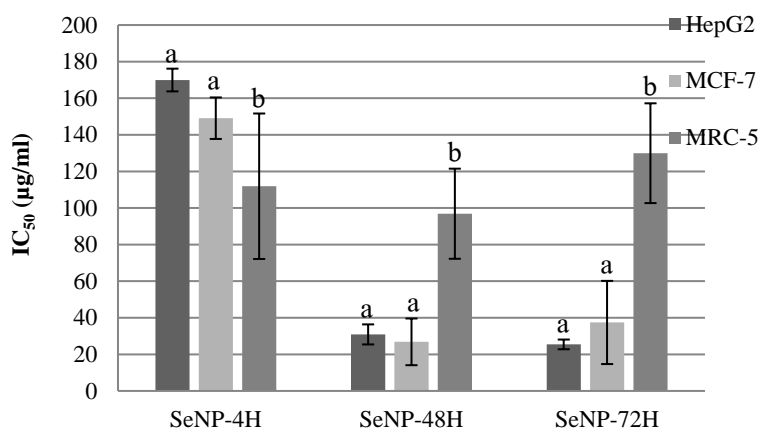
รูปที่ 25 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มต่างๆ





รูปที่ 26 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและขนาดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สถานะการสังเคราะห์ที่เวลา 4 ชั่วโมง (A), เวลา 48 ชั่วโมง (B) และเวลา 72 ชั่วโมง (C)

อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มต่างๆ เมื่อนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เทียบกับ ascorbic acid พบว่าไม่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเช่นเดิม อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาต่างๆ เมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ พบว่าอนุภาคที่สถานะบ่ม 48 และ 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดี ทั้งเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งเต้านมใกล้เคียงกัน ขณะที่เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ ส่วนอนุภาคจากสถานะบ่ม 4 ชั่วโมงพบว่ามีการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสถานะบ่ม 48 และ 72 ชั่วโมง โดยให้ค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งตับและมะเร็งเต้านมของสถานะบ่ม 4 ชั่วโมง เท่ากับ 169.64 และ 149.08 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 27) และเมื่อคำนวณค่าความปลอดภัยด้วยค่า selectivity index ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สถานะบ่ม 4, 48 และ 72 ชั่วโมง จากค่า IC_{50} ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็งตับได้ค่า 0.66, 3.13 และ 5.11 ตามลำดับ ค่าความปลอดภัยด้วยค่า selectivity index จากค่า IC_{50} ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมได้ค่า 0.75, 3.61 และ 3.47 ตามลำดับ พบว่าสถานะบ่มที่ 72 ชั่วโมง มีความปลอดภัยต่อเซลล์ตับมากที่สุด ดังนั้นสถานะการสังเคราะห์ที่บ่ม 72 ชั่วโมงจึงเหมาะต่อการนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริม ซึ่งผู้วิจัยได้นำสถานะนี้ไปสังเคราะห์อนุภาค และศึกษาสมบัติทางชีวภาพของอนุภาค และอายุการเก็บรักษาอนุภาคนาโนซีลีเนียมต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่อไป

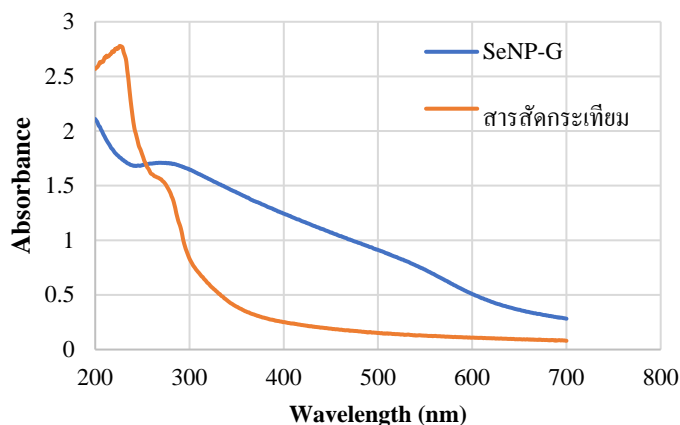


รูปที่ 27 ค่า IC_{50} ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มแตกต่างกันต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งค่า IC_{50} ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (* $P < 0.05$) ($n=3$)

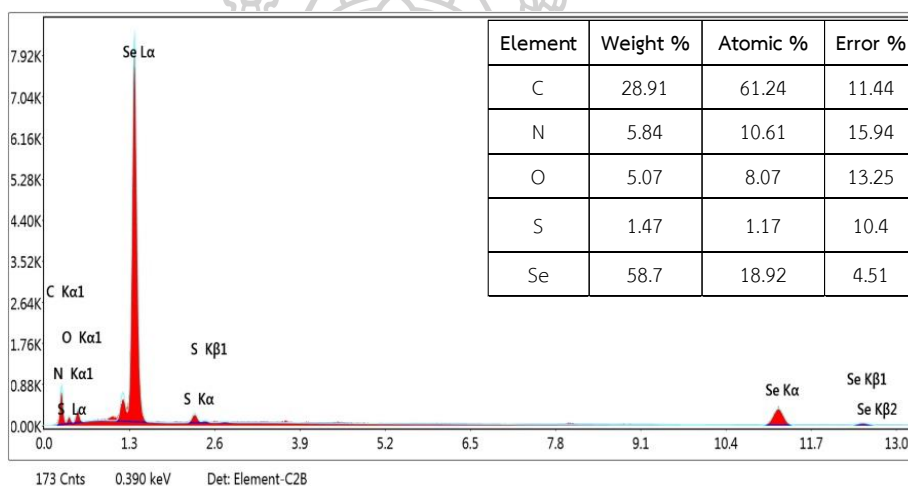
4.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม

4.3.1 สมบัติทางกายภาพ

อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจากสภาวะการสังเคราะห์ที่เลือกไว้ คือสารสกัดกระเทียม 3 mg/ml sodium selenite 10 mM ไม่ปรับ pH และระยะเวลาบ่มสังเคราะห์ 72 ชั่วโมง ให้ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่พีคประมาณ 270 nm (รูปที่ 28) อนุภาคที่ได้มีลักษณะทรงกลมขนาดเล็กระดับนาโนในช่วง 11-60 nm ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด วิเคราะห์ขนาดด้วยโปรแกรม image J การวิเคราะห์ธาตุในอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วย EDS พบ Selenium ที่ตำแหน่งประมาณ 1.4 KeV และธาตุ Sulfur, Carbon, Nitrogen และ Oxygen (รูปที่ 29) ซึ่งธาตุ Sulfur เป็นธาตุที่พบในพืชตระกูลหอมและกระเทียมแสดงถึงอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ขึ้นมีธาตุซีลีเนียมและสารสกัดพืชเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสอดคล้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์ธาตุด้วยเทคนิค EDS พบว่ามีธาตุ Selenium ที่ตำแหน่งประมาณ 1.4 KeV เช่นกัน (Vyas and Rana 2017)



รูปที่ 28 UV-vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมและสารสกัดกระเทียม

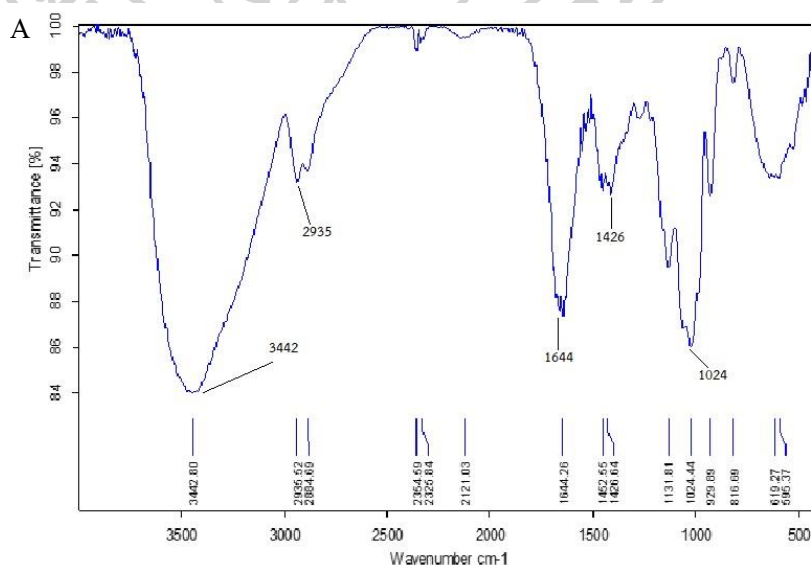


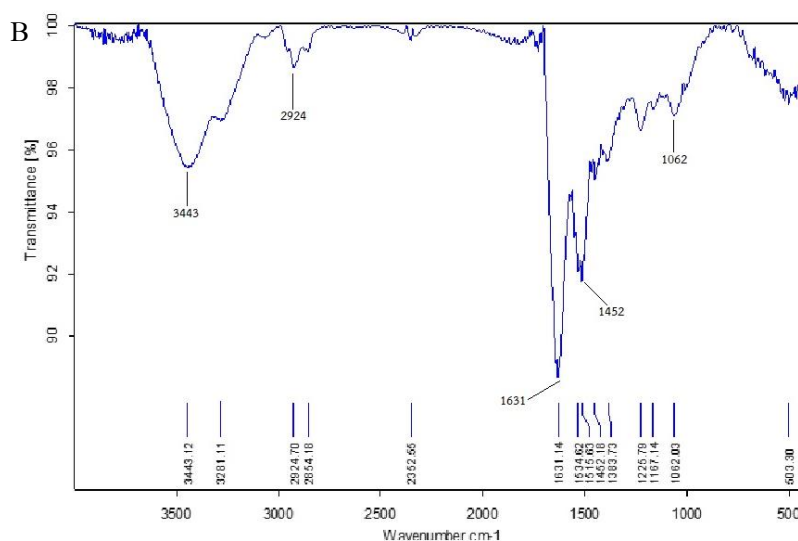
รูปที่ 29 ผลวิเคราะห์ EDS ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

อย่างไรก็ตาม ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วยเทคนิค FTIR เทียบกับกระเทียมสกัด (รูปที่ 30) พบว่ากระเทียมสกัดมีปฏิสัมพันธ์กับไอออนของซีลีเนียม โดยหุ้มอยู่กับอนุภาคซีลีเนียม เนื่องจากการตรวจพบพีคของสารสกัดกระเทียมซึ่งแสดงพันธะหรือหมู่ของสารองค์ประกอบพีคจากการเกิดพีคที่ตำแหน่งสเปคตรัมที่ 3442 cm^{-1} (OH stretching ของ alcohols ซึ่งพบที่ phenolic และ flavonoid), 2935 cm^{-1} (C-H stretching), 1644 cm^{-1} (C=O stretching ของ amide), 1426 cm^{-1} (N-O stretching ของ aromatic amine) 1024 cm^{-1} (C-O ของ alcohols) และ $1010\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$ ที่ระบุ S=O stretching ดังรูปที่ 30A มีการเปลี่ยนไปยังตำแหน่งสเปคตรัมที่พบในอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม ที่ตำแหน่งดังนี้ $3443, 2924, 1631, 1452$ และ 1062 cm^{-1} (รูปที่ 4.16B) เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งสเปคตรัมของสารสกัดกระเทียมและอนุภาคนาโนซีลีเนียม

จากสารสกัดกระเทียมพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่ง OH stretching ทำให้เกิดการ shift จาก $3.442.80 \text{ cm}^{-1}$ ไป 3443.12 cm^{-1} , 2935.52 cm^{-1} ไป 2924.70 cm^{-1} , 1644.26 cm^{-1} ไป 1631.14 cm^{-1} , 1426.64 cm^{-1} ไป 1452.18 cm^{-1} และ 1024.44 cm^{-1} ไป 1062.03 cm^{-1} และพบพีคที่ ตำแหน่ง $1010-1070 \text{ cm}^{-1}$ เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งตำแหน่งสเปกตรัมของ FTIR ที่เปลี่ยนไป แสดงให้เห็นว่าหมู่ฟังก์ชัน OH, N-O, C-O-H และ S=O มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์พบว่าหมู่ฟังก์ชันของ OH, C-H และ C-O-H ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมจากกระเทียม (Anu, Singaravelu et al. 2016)

ส่วนการวิเคราะห์ความเสถียรด้วยเทคนิค Zeta potential การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมจากสารสกัดกระเทียมใช้สารในสารสกัดกระเทียมในการหุ้มเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาคให้อนุภาคนาโนมีความเสถียร จากการวิเคราะห์พบว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมมีค่าศักย์ซีต้าและค่า PDI เท่ากับ $-23.67 \pm 0.81 \text{ mV}$ และ 0.181 ตามลำดับ ซึ่งจะพิจารณาได้ว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมจากสารสกัดกระเทียมมีความเสถียรในระดับปานกลาง (moderately stable) เนื่องจากมีค่าศักย์ซีต้าที่ $\pm 20-30 \text{ mV}$ และจากค่า PDI อยู่ในช่วง 0.1-0.4 แสดงให้เห็นว่าอนุภาคมีค่าการกระจายตัวแบบ moderately monodisperse (Bhattacharjee 2016) อนุภาคนาโนซิลิเนียมจากสารสกัดพืชชนิดต่างๆ มีค่าศักย์ซีต้าเป็นประจุลบเช่น อนุภาคนาโนซิลิเนียมจากว่านหางจระเข้, ผักชีฝรั่ง และมะขามป้อม มีค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -18.0, -14.2 และ -24.4 mV ตามลำดับ (Luminita Fritea, Vasile Laslo et al. 2017, Gunti, Dass et al. 2019, Nomura and Terwilliger 2019) อาจเนื่องมาจากสารพฤกษศาสตร์ของพืช เช่น Phenolic, flavonoids และ tannins





รูปที่ 30 ผลวิเคราะห์ FTIR ของสารสกัดกระเทียม (A) และอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม (B)

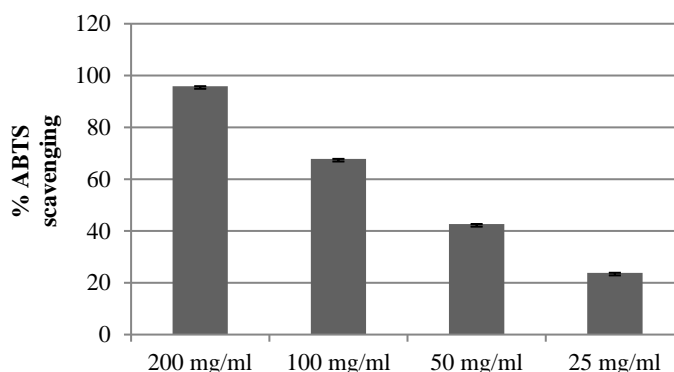
4.3.2 สมบัติต้านอนุมูลอิสระ

การประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเทียมและอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมได้ใช้วิธีวิเคราะห์ทางเคมี 2 วิธี คือ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และ Ascorbic acid ตามลำดับ

4.3.2.1 วิธี ABTS

การวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของกระเทียมด้วยวิธี ABTS เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ($\mu\text{g/ml}$) อาศัยความสามารถส่งถ่ายไฮโดรเจนอะตอมของสารทดสอบ แล้วทำให้สารละลายสีฟ้าเขียวของ ABTS จางลง ซึ่งการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของสารสกัดกระเทียม (200, 100, 50 และ 25 mg/ml) จะได้ค่า %ABTS scavenging ดังรูปที่ 31 ซึ่งหาค่า IC_{50} ได้ 56.91 mg/ml และได้ค่าต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox เป็น $5.21 \pm 0.012 \text{ mg Trolox eq./ g sample}$ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Wiwat และ Wallaya ในปี 2009 โดยนำกระเทียมสดที่หั่นละเอียดนำไปต้มกับน้ำทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ $5.17 \pm 0.54 \text{ mg Trolox eq./g of sample}$ (Wiwat and Wallaya 2009) ขณะที่การวิเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมมีค่า % ABTS scavenging ที่ความเข้มข้น 23 mg/ml เท่ากับ 6.97 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำแสดงถึงกระเทียมที่หุ้มอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมอาจมีปริมาณ

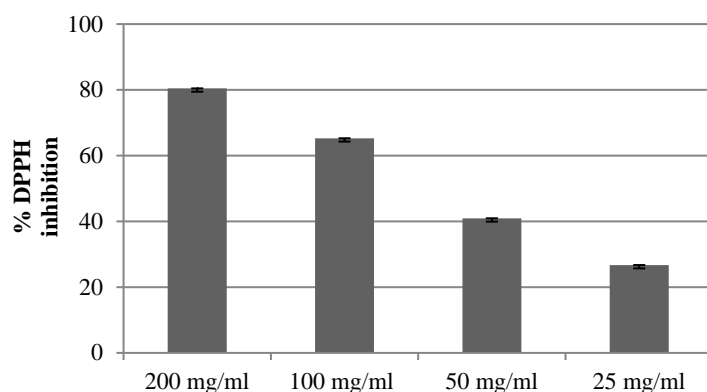
น้อย หรืออาจเกิดโครงสร้างเปลี่ยนไปที่ไม่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูล ABTS ให้เปลี่ยนสีได้



รูปที่ 31% ABTS scavenging ของสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)

4.3.2.2 วิธี DPPH

วิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของกระเทียมด้วยวิธี DPPH เทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid ($\mu\text{g/ml}$) จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 200, 100, 50 และ 25 mg/ml ได้ค่า% DPPH inhibition ดังรูปที่ 32 ค่า IC_{50} 62.45 mg/ml มีค่าต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid เป็น 1.41 ± 0.016 mg Ascorbic acid eq/g of sample จากผลการทดลองโดยนำกระเทียมสดที่หั่นละเอียดนำไปต้มกับน้ำทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีความเทียบเท่ากับสารมาตรฐานเท่ากับ 0.48 ± 0.07 mg Ascorbic acid eq/g of sample (Wiwat and Wallaya 2009) ซึ่งพบว่ามีค่าที่แตกต่างกันอาจจะเกิดจากวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ส่วนการวิเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมค่า% DPPH inhibition ที่ความเข้มข้น 16 mg/ml พบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงถึงกระเทียมที่หุ้มอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมอาจมีปริมาณน้อย หรืออาจเกิดโครงสร้างเปลี่ยนไปที่ไม่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูล DPPH ได้ นอกจากนี้ อาจเป็นผลจากความไม่เสถียรของสารสกัดกระเทียมในสภาวะบ่ม 72 ชั่วโมง ที่สังเคราะห์อนุภาค เนื่องจากค่าความสามารถจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดกระเทียมที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง มีค่าลดลง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจทำให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่สังเคราะห์ขึ้น ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม ซีลีเนียมในอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมอาจถูกนำไปเมตาโบไลต์และสังเคราะห์เป็น selenoprotein ที่เป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งอาจเป็นหัวข้อให้ศึกษาต่อไปได้อีก

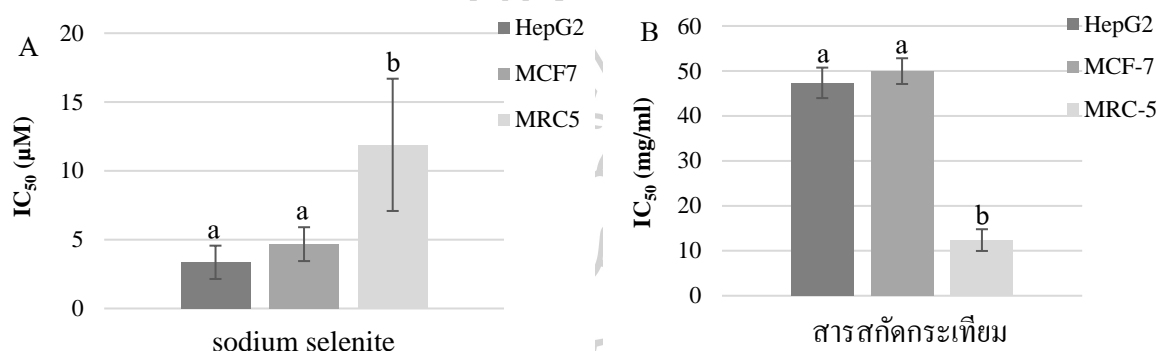


รูปที่ 32 %DPPH inhibition ของสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ (n=3)

4.3.3 สมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียม ได้ศึกษาเทียบกับ sodium selenite กระเทียมและยา Tamoxifen โดยศึกษากับเซลล์มะเร็งตับ (HepG2), เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เทียบกับเซลล์ปกติ (MRC-5) ด้วยวิธี MTT assay แล้วคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ 50%) พบว่า sodium selenite ให้ค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2), เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) มีค่า 3.35, 4.67 และ 11.89 μM ตามลำดับ (รูปที่ 33A) โดย Sodium selenite ก่อนข้างเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ขณะที่ เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง สอดคล้องกับข้อมูลยับยั้งเซลล์มะเร็งของ Sodium selenite ที่เป็น pro-oxidant กระตุ้นให้เกิด ROS ในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิด ROS มากขึ้นและเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายมากกว่าเซลล์ปกติ (Wang, Chen et al. 2015) ส่วนสารสกัดกระเทียมมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดต่ำแต่ก่อนข้างมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ จากค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ 50%) ของ HepG2 MCF7 และ MRC5 ที่ 47.35, 49.96 และ 12.38 mg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 33B) ซึ่งค้านกับข้อมูลรายงานที่ว่าสารสกัดกระเทียมมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Sk-mel3, AGS, MCF7) ได้ดี โดยมีความเข้มข้นยับยั้งให้ค่า IC_{50} ที่น้อยกว่า 4 mg/ml ขณะที่ IC_{50} ของเซลล์ปกติ (L929) มากกว่า 5 mg/ml (Ghazanfari, Yaraee et al. 2011) ผลความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ต่ำในงานวิจัยนี้ที่มีค่า IC_{50} สูงมากกว่า คาดว่าเป็นผลจากการเป็นสารสกัดหยาบของกระเทียมที่ผ่านการแปรรูปร่วมกับความไม่เสถียรของสารสำคัญในกระเทียมเมื่ออยู่ในรูปสารละลายกระเทียมที่เปลี่ยนรูปเป็น diallyl sulfide (Gunti, Dass et al.), diallyl disulfide (DADS), diallyl trisulfide (DATS), ally methyl trisulfide (AMTS) และ ajoene ทำให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งของ

S-allyl mercaptocysteine และ allicin ในระดับต่ำ ซึ่งแม้มีรายงานการยับยั้งมะเร็งของสารเมตาโบไลต์จาก allicin (Chen, Li et al. 2011) แต่อาจมีในปริมาณที่ต่ำที่ส่งผลให้ได้ค่าการยับยั้ง 50% ที่ระดับความเข้มข้นสูงในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์อนุภาคนาซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมจะช่วยลดฤทธิ์พิษของ sodium selenite และเพิ่มศักยภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งให้สูงขึ้นได้ นอกจากนี้ มีรายงานว่าสารสกัดกระเทียมมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Normal human skin fibroblasts BJ (ATCC CRL-2522)) เช่นกัน โดยคาดว่าสารสกัดกระเทียมมีสมบัติ pro-oxidant เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย neutral red assay ดังนั้น สารสกัดกระเทียมมีบทบาททั้งการเป็น antioxidant และ pro-oxidant (Szychowski, Rybczyńska-Tkaczyk et al. 2018)

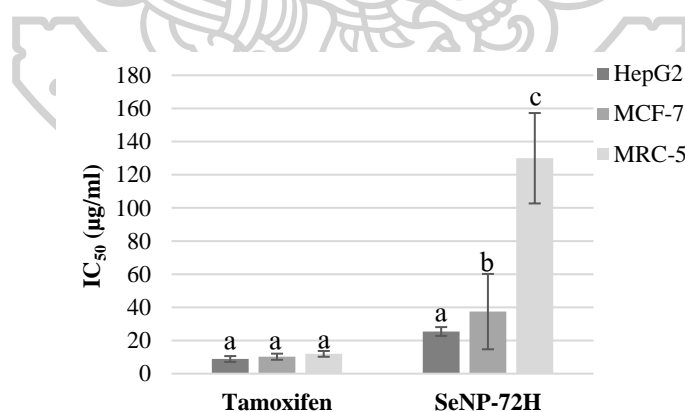


รูปที่ 33 ค่า IC₅₀ ของ sodium selenite (A) และสารสกัดกระเทียม (B) ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) (n=3)

การศึกษากลไกของยา Tamoxifen จากรูป 34 พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ไม่แตกต่างกัน Tamoxifen จึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ซึ่งมีค่า IC₅₀ 8.86, 10.23 และ 11.95 μg/ml ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Amin และคณะปี 2016 รายงานว่าเซลล์ปกติ (MRC-5) มีค่า IC₅₀ 11.14 μg/ml มีค่าใกล้เคียงกัน (Amin, Tuenter et al. 2016) การออกฤทธิ์ของยา Tamoxifen เป็นการแย่งจับที่ Estrogen receptor ของเซลล์มะเร็งที่มี Estrogen receptor (ER⁺) เช่น เซลล์ MCF-7 ทำให้ Estrogen ไม่สามารถจับ Estrogen receptor ทำให้การแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลดลง (Arune, Manunya et al. 2011) นอกจากนี้ยา Tamoxifen มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ไม่มี Estrogen receptor (ER⁻) เช่น เซลล์ HepG2 และ MRC-5 จากงานวิจัยของ Guo และคณะปี 2009 ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) พบว่ายา Tamoxifen สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่

ไม่มี Estrogen receptor (ER) ผ่านวิถีไมโทคอนเดรียให้เกิดการตายแบบ apoptosis (Guo, Huang et al. 2009)

ส่วนการตรวจสอบฤทธิ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดีและฤทธิ์ไม่ค่อยเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ซึ่งฤทธิ์ยับยั้งในลักษณะเฉพาะต่อเซลล์มะเร็ง คาดว่าเป็นผลเนื่องจากขนาดของอนุภาคนาโนนั้นอยู่ในช่วง 10-100 nm ซึ่งมีขนาดเล็กจึงสามารถแทรกเข้าไปในเซลล์มะเร็งโดยผ่านการเข้าแบบเอนโดไซโทซิส อาศัยกลไกฟิโนไซโทซิส (Kettiger, Schipanski et al. 2013) เมื่ออนุภาคนาโนซีลีเนียมเข้าภายในเซลล์จะทำให้เกิดการผลิต ROS ภายในเซลล์ที่มากเกินไปจากความสามารถในการเป็น pro-oxidant ทำให้ไมโทคอนเดรียผิดปกติเกิดความเสียหายทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis (Liao, Yu et al. 2015) ซึ่งตามปกติภายในเซลล์มะเร็งมีการผลิต ROS ในปริมาณที่สูงอยู่แล้ว เมื่ออนุภาคนาโนทำให้ผลิต ROS มากขึ้น จึงทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการสะสม ROS มากขึ้น แล้วก่อนให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้เซลล์ตายมากกว่าในเซลล์ปกติที่มีการสร้างปริมาณ ROS ที่สมดุล (Khurana, Tekula et al. 2019) ตารางที่ 2 แสดงค่าความปลอดภัย selectivity index ของ Tamoxifen, sodium selenite, สารสกัดกระเทียม และอนุภาคนาโนซีลีเนียม จากค่า IC_{50} ของเซลล์ปกติต่อเซลล์มะเร็งตับหรือต่อเซลล์มะเร็งเต้านม จะพบว่า sodium selenite และสารสกัดกระเทียมมีความจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็งต่ำ ขณะที่อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมมีความจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็งได้มากกว่า โดยทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีกว่ามะเร็งตับ และยังมีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ



รูปที่ 34 ค่า IC_{50} ของยา Tamoxifen และอนุภาคนาโนซีลีเนียมต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) ตัวอักษร (a, b และ c) ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (* $P < 0.05$) ($n = 3$)

ตารางที่ 2 ค่าความปลอดภัย selectivity index ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม จากค่า IC₅₀ ของเซลล์ปกติ เทียบกับเซลล์มะเร็ง

SI	Tamoxifen	Selenite	Garlic	SeNPs-72H
IC ₅₀ MRC-5/IC ₅₀ HepG2	1.043	0.939	0.261	5.106
IC ₅₀ MRC-5/IC ₅₀ MCF-7	1.045	1.460	0.248	3.471

SI = selectivity index

SeNP-H72 = อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง (n=3)

4.3.4 สมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

การวิเคราะห์ความสามารถยับยั้งแบคทีเรีย (*S. aureus*) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วยวิธี agar diffusion จากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ตารางที่ 3 พบว่าที่อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้โดยยับยั้งให้เกิดวงใสมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมมากขึ้น โดยทำให้เกิดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่ความเข้มข้น 5 และ 10 mg/ml มีค่าเท่ากับ 10.11±0.748 และ 11.25±1.580 mm ตามลำดับ ขณะที่กระเทียมไม่มีฤทธิ์ยับยั้งให้เกิดวงใสเกิดขึ้น และขณะเดียวกัน Sodium selenite 10 mM สามารถยับยั้ง *S. aureus* ให้เกิดวงใส 11.58±0.340 mm เห็นได้ว่าความสามารถยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมอาจเป็นผลจาก sodium selenite มากกว่ากระเทียมสกัด

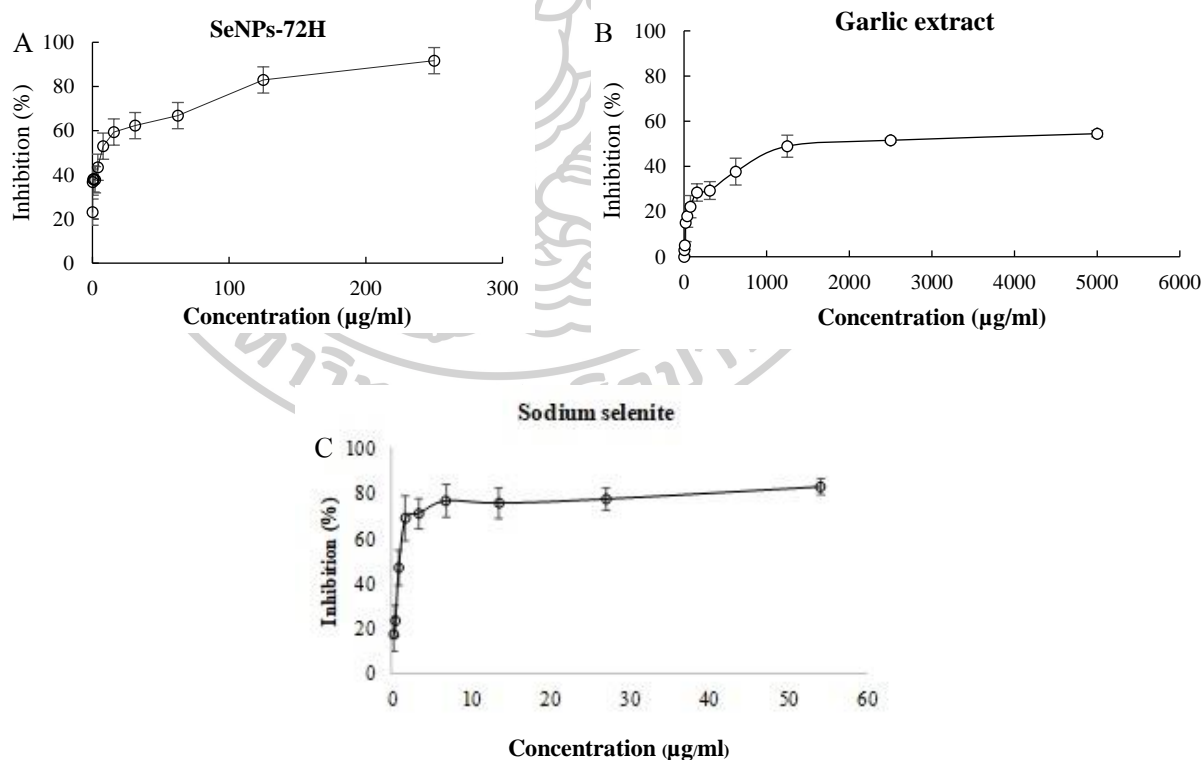
ตารางที่ 3 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

Samples	clear zone average size ± SD
Sodium selenite 10 mM	11.58±0.340 ^a
SeNP-H72 (5 mg/ml)	10.11±0.748 ^a
SeNP-H72 (10 mg/ml)	11.25±1.580 ^a
Garlic (10 mg/ml)	-
Penicillin and Streptomycin (100 U)	20.16±0.635 ^b

SeNP-H72 = อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง

ตัวอักษร (a และ b) ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) n=3

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Turbidity assay) จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม ดังรูปที่ 34A มีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.50 \mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับสารสกัดกระเทียมและ sodium selenite มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2599.22 และ $1.90 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ จากค่า IC_{50} พบว่าสารสกัดกระเทียมมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีน้อยที่สุด จึงสอดคล้องกับการทดลองวิธี agar diffusion ว่าความสามารถการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากกระเทียมนั้น มีฤทธิ์จาก sodium selenite มากกว่าสารสกัดกระเทียม ซึ่งกลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากอนุภาคนาโนซีลีเนียมอาจเกิดจากความสามารถเป็น Pro-oxidant ของอนุภาค ที่เมื่อเข้าภายในเซลล์ จะกระตุ้นสร้าง ROS มากขึ้น จนเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ *S. aureus* ให้เซลล์ตาย (Qing, Cheng et al. 2018) จากตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมต่อการยับยั้ง *S. aureus* และเซลล์ปกติ (MRC-5) จากผลการทดลองพบว่ามีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ



รูปที่ 35 %การยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะบ่ม 72 ชั่วโมง (A), สารสกัดกระเทียม (B) และ sodium selenite (C) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (* $P < 0.05$) ($n=3$)

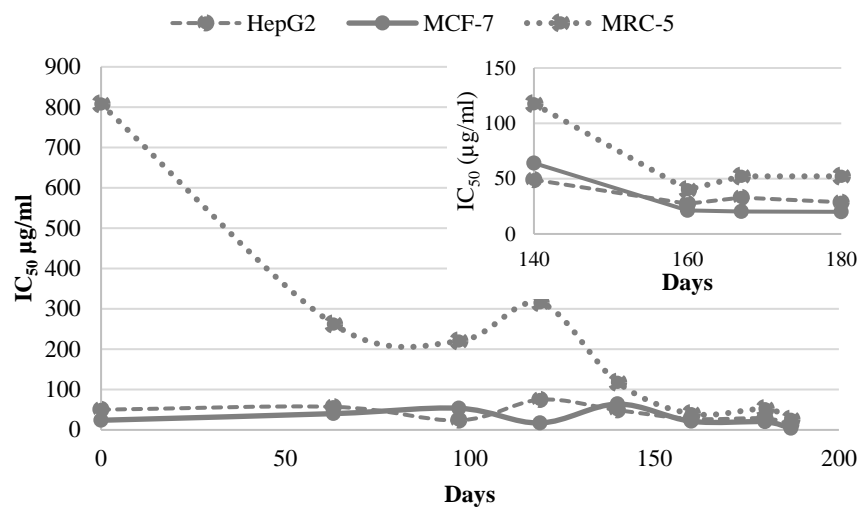
ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซีลีเนียม (SeNPs-72H) ที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติ (MRC-5) และยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* (IC₅₀)

IC ₅₀	sodium selenite (μM)	SeNPs-G72 (μg/ml)
<i>S. aureus</i>	1.90±0.25 ^a	3.5±0.35 ^b
MRC-5	2.04±0.85 ^a	219.78±20.03 ^b

ตัวอักษร (a และ b) ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05) ในคอลัมน์เดียวกัน (n=3)

4.4 การศึกษาอายุการเก็บรักษาอนุภาคนาโนซีลีเนียมต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสภาวะใช้ sodium selenite 10 mM สารสกัดกระเทียม 3 mg/ml และ ไม่ปรับ pH ในระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง ซึ่งอนุภาคที่ได้นำมาบ่มเหวี่ยง ล้าง และเก็บแบบแห้งในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องในที่มืด และนำอนุภาคที่เวลาต่างๆ จากสภาวะเก็บไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง จากรูป 35 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปค่า IC₅₀ ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมต่อเซลล์ปกติ (MRC-5) มีค่าลดลงซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (MRC-5) เพิ่มขึ้นแต่การยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติน้อยกว่าในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด จากรูปเล็กของรูปที่ 35 ในส่วนของฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและมะเร็งเต้านมมีฤทธิ์การยับยั้งที่ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 180 ซึ่งการที่อนุภาคนาโนซีลีเนียมเป็นพิษต่อเซลล์ปกติมากขึ้น จากตารางที่ 5 ค่าความปลอดภัย selectivity index ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่เวลาเก็บต่างๆ จากค่า IC₅₀ ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งการเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเพิ่มมากขึ้นอาจจะเกิดจากสารพิษเคมีที่เป็นองค์ประกอบของพืช เช่น สารประกอบ polyphenols ที่มีหน้าที่ในการเป็นตัวหุ้ม (capping agent) เสื่อมสภาพไป ทำให้เกิดความเสียหายให้ฤทธิ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเพิ่มขึ้น จึงเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเพิ่มขึ้น หรือธาตุซีลีเนียมอาจทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็น SeO₂ ที่เมื่อละลายน้ำจะเกิดเป็น selenous acid ที่เป็นพิษต่อเซลล์สูงขึ้น ดังนั้นการเก็บไม่ควรเกิน 120 วันหรือประมาณ 4 เดือน เนื่องจากการใช้สารพิษจากสารเคมีของสารพืชมีการเสื่อมลงไป ซึ่งอาจต้องมีการปรับการหุ้มให้ช่วยคงฤทธิ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมไว้ อาจโดยการเติมสารให้ความคงตัวหรือใช้ตัวหุ้ม (capping agent) เป็นสารประเภทสารพอลิเมอร์ เช่น polyvinyl alcohol ที่อาจทำให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีอายุการเก็บรักษาต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและมีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติยาวนานมากขึ้น (Dwivedi, Shah et al. 2011)



รูปที่ 36 ค่า IC_{50} ของอายุการเก็บรักษาของอนุภาคนาโนซีลีเนียมต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (MRC-5) (รูปเล็กขยายของวันที่ 140 ถึง 180 วัน)

ตารางที่ 5 ค่าความปลอดภัย selectivity index ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่ เวลาเก็บต่างๆ จากค่า IC_{50} ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็ง

วันที่	$IC_{50}MRC-5/IC_{50}HepG2$	$IC_{50}MRC-5/IC_{50}MCF-7$
0	16.12	33.84
63	8.60	6.50
97	9.33	8.11
119	4.20	18.35
140	2.40	1.84
160	1.46	1.87
180	1.82	2.61
187	1.98	6.64

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมทางชีวภาพจากสารสกัดกระเทียมในที่นี้ ได้ตรวจสอบคุณสมบัติพืชในการเป็นตัวรีดิวซ์และตัวหุ้ม โดยวิเคราะห์สารองค์ประกอบ phenolic และ flavonoids ในสารสกัดกระเทียมพบมีปริมาณ phenolic เทียบเท่า gallic acid เป็น 3.09 ± 0.02 mg GAE/ g sample และมีปริมาณ flavonoids เทียบเท่า catechin เป็น 0.045 ± 0.01 mg CE/ g sample ตามลำดับ สารทั้งสองในสารสกัดกระเทียมสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และตัวหุ้ม (capping agent) Se^0 ที่เกิดขึ้นในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมได้ สารสกัดกระเทียมมีความเป็นสารรีดิวซ์ที่มีฤทธิ์ต่ำ จึงต้องใช้ ascorbic acid เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยารีดิวซ์เริ่มต้นจาก Se^{4+} เป็น Se^0 ให้เป็นสารละลายแขวนลอยสีส้มแดง โดยสารสกัดกระเทียมทำหน้าที่เป็นทั้งตัวรีดิวซ์และตัวหุ้มในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสภาวะปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของ sodium selenite, ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม, pH และเวลาในการสังเคราะห์ ที่ส่งผลต่อขนาดและฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ขึ้น ผลพบว่าได้สภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของ HepG2 และ MCF7 ได้ดีกว่าเซลล์ปกติ MRC5 และมีฤทธิ์ยับยั้ง *S.aureus* ได้ดี คือสภาวะใช้ sodium selenite ความเข้มข้น 10 mM สารสกัดกระเทียมความเข้มข้น 3 mg/ml และ ไม่ปรับ pH ในระยะเวลาบ่มสังเคราะห์ 72 ชั่วโมงบน shaker ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้อนุภาคทรงกลมขนาดเล็กประมาณ 11-70 nm เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM โดยอนุภาคสามารถดูกลืนแสงสูงสุดที่ 270 nm เมื่อใช้ UV-visible spectroscopy และการวิเคราะห์ด้วย EDS พบมีโลหะซีลีเนียมประกอบอยู่ และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR พบว่าหมู่ฟังก์ชัน OH, N-O, C-O-H และ S=O จากสารสกัดกระเทียม มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม โดยทำหน้าที่เป็นตัวหุ้ม (capping agent) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม วิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วยเทคนิค Zeta potential และค่า PDI มีค่าเท่ากับ -23.67 ± 0.81 mV และ 0.181 ตามลำดับ ซึ่งบอกสามารถบอกได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมมีความเสถียรและมีการกระจายตัวแบบ monodisperse อย่างไรก็ตาม แอนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในวิธี DPPH assay ขณะที่สารสกัดกระเทียมมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH เทียบเท่า ascorbic acid เป็น 1.41 ± 0.016 mg ascorbic acid eq/g of sample และต้านอนุมูลอิสระ ABTS เทียบเท่า Trolox เป็น 5.21 ± 0.012 mg

การเก็บรักษาอนุภาคนาโนซีลีเนียมแบบผงแห้งในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องให้ฤทธิ์
เลือกยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีตลอดระยะเวลาเก็บไม่เกิน 120 วัน เนื่องจากมีผลให้อนุภาคมีความเป็น
พิษทำลายเซลล์มากขึ้น



รายการอ้างอิง

- Amin, A., E. Tuentler, V. Exarchou, A. Upadhyay, P. Cos, L. Maes, S. Apers and L. Pieters (2016). "Phytochemical and Pharmacological Investigations on *Nymphaea indica* Leaf Extracts." Phytotherapy Research **30**(10): 1624-1633.
- Anu, K., G. Singaravelu, K. Murugan and G. Benelli (2016). "Green-Synthesis of Selenium Nanoparticles Using Garlic Cloves (*Allium sativum*): Biophysical Characterization and Cytotoxicity on Vero Cells." Journal of Cluster Science **28**(1): 551-563.
- Aruneer, D., C. Manunya, C. Salin and S. Patrapim (2011). "Antihormonal Therapy in Breast Cancer." Songklanagarind Medical Journal **29**(3): 127-142.
- Bhattacharjee, S. (2016). "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?" Journal of Controlled Release **235**: 337-351.
- Chandramohan, S., K. Sundar and A. Muthukumaran (2018). "Hollow selenium nanoparticles from potato extract and investigation of its biological properties and developmental toxicity in zebrafish embryos." IET nanobiotechnology **13**(3): 275-281.
- Chen, M., B. Li, X. Zhao, H. Zuo, X. He, Z. Li, X. Liu and L. Chen (2011). "Effect of diallyl trisulfide derivatives on the induction of apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells." Molecular and Cellular Biochemistry **363**(1-2): 75-84.
- Cui, D., T. Liang, L. Sun, L. Meng, C. Yang, L. Wang, T. Liang and Q. Li (2018). "Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis." Pharmaceutical Biology **56**(1): 528-534.
- Dhand, C., N. Dwivedi, X. J. Loh, A. N. Jie Ying, N. K. Verma, R. W. Beuerman, R. Lakshminarayanan and S. Ramakrishna (2015). "Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview." RSC Advances **5**(127): 105003-105037.
- Dwivedi, C., C. P. Shah, K. Singh, M. Kumar and P. N. Bajaj (2011). "An Organic Acid-induced Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles." Journal of Nanotechnology **2011**: 1-6.
- Ehata, M. T., A. M. Phuati, S. N. Lumpu, C. K. Munduki, D. B. Phongi, G. T. Lutete, O. K. Kabangu, R. C. Kanyanga, A. Matheussen, P. Cos, S. Apers, L. Pieters, L. Maes and A. J. Vlietinck (2012). "In Vitro Antiprotozoal and Cytotoxic Activity of the Aqueous Extract, the 80% Methanol Extract

and Its Fractions from the Seeds of *Brucea sumatrana* Roxb. (Simaroubaceae) Growing in Democratic Republic of Congo." Chinese Medicine **03**(01): 65-71.

Ezhuthupurakkal, P. B., L. R. Polaki, A. Suyavaran, A. Subastri, V. Sujatha and C. Thirunavukkarasu (2017). "Selenium nanoparticles synthesized in aqueous extract of *Allium sativum* perturbs the structural integrity of Calf thymus DNA through intercalation and groove binding." Materials Science and Engineering C **74**: 597-608.

Fardsadegh, B., H. Vaghari, R. Mohammad-Jafari, Y. Najian and H. Jafarizadeh-Malmiri (2019). "Biosynthesis, characterization and antimicrobial activities assessment of fabricated selenium nanoparticles using *Pelargonium zonale* leaf extract." Green Processing and Synthesis **8**(1): 191-198.

Forootanfar, H., M. Adeli-Sardou, M. Nikkhoo, M. Mehrabani, B. Amir-Heidari, A. R. Shahverdi and M. Shakibaie (2014). "Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide." Trace Elements in Medicine and Biology **28**(1): 75-79.

Ganesan, V. (2015). Biogenic Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles Using the Flower of *Bougainvillea spectabilis* Willd. International Journal of Science and Research. **4**: 690-695.

Gerald, F., J. Combs and W. P. Gray (1998). "Chemopreventive Agents: Selenium." Pharmacology & Therapeutics **79**(3): 179-192.

Ghazanfari, T., R. Yaraee, B. Rahmati, H. Hakimzadeh, J. Shams and M.-R. Jalali-Nadoushan (2011). "In vitro cytotoxic effect of garlic extract on malignant and nonmalignant cell lines." Immunopharmacology and Immunotoxicology **33**(4): 603-608.

Guisbiers, G., Q. Wang, E. Khachatryan, L. C. Mimun, R. Mendoza-Cruz, P. Larese-Casanova, T. J. Webster and K. L. Nash (2016). "Inhibition of *E. coli* and *S. aureus* with selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in deionized water." International Journal of Nanomedicine **11**: 3731-3736.

Gunti, L., R. S. Dass and N. K. Kalagatur (2019). "Phytofabrication of Selenium Nanoparticles From *Emblica officinalis* Fruit Extract and Exploring Its Biopotential Applications: Antioxidant, Antimicrobial, and Biocompatibility." Frontiers in Microbiology **10**: 931.

Guo, M., Y. Li, Z. Lin, M. Zhao, M. Xiao, C. Wang, T. Xu, Y. Xia and B. Zhu (2017). "Surface decoration of selenium nanoparticles with curcumin induced HepG2 cell apoptosis through ROS mediated p53 and AKT signaling pathways." RSC Advances **7**(83): 52456-52464.

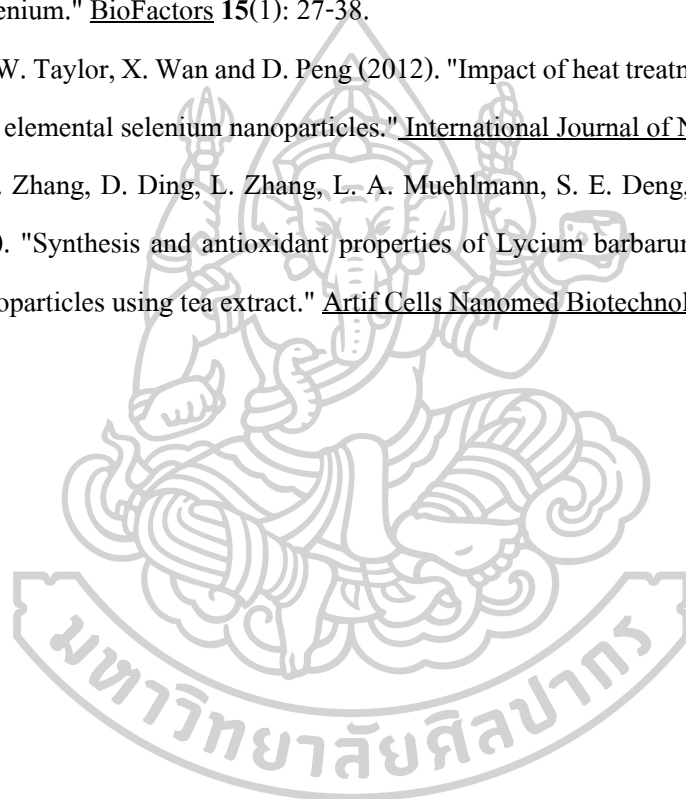
- Guo, R., Z. Huang, Y. Shu, S. Jin and H. Ge (2009). "Tamoxifen inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 via down-regulation of survivin expression." Biomed Pharmacother **63**(5): 375-379.
- Hatfield, D. L., M. J. Berry and V. N. Gladyshev (2011). Selenium: its molecular biology and role in human health, Springer Science & Business Media.
- Hodlur, R. M. and M. K. Rabinal (2014). "A new selenium precursor for the aqueous synthesis of luminescent CdSe quantum dots." Chemical Engineering Journal **244**: 82-88.
- Huang, B., J. Zhang, J. Hou and C. Chen (2003). "Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro." Free Radical Biology and Medicine **35**(7): 805-813.
- Kallel, F., D. Driss, F. Chaari, L. Belghith, F. Bouaziz, R. Ghorbel and S. E. Chaabouni (2014). "Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties." Industrial Crops and Products **62**: 34-41.
- Kápolna, E. and P. Fodor (2006). "Speciation analysis of selenium enriched green onions (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS." Microchemical Journal **84**(1-2): 56-62.
- Kettiger, H., A. Schipanski, P. Wick and J. Huwyler (2013). "Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism." International Journal of Nanomedicine **8**: 3255-3269.
- Khurana, A., S. Tekula, M. A. Saifi, P. Venkatesh and C. Godugu (2019). "Therapeutic applications of selenium nanoparticles." Biomed Pharmacother **111**: 802-812.
- Kokila, K., N. Elavarasan and V. Sujatha (2017). "Diospyros montana leaf extract-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their biological applications." New Journal of Chemistry **41**(15): 7481-7490.
- Kong, L., Q. Yuan, H. Zhu, Y. Li, Q. Guo, Q. Wang, X. Bi and X. Gao (2011). "The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis." Biomaterials **32**(27): 6515-6522.
- Kumari, M., L. Ray, M. P. Purohit, S. Patnaik, A. B. Pant, Y. Shukla, P. Kumar and K. C. Gupta (2017). "Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **117**: 346-362.
- Li, H. F., S. P. McGrath and F. J. Zhao (2008). "Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite." New Phytologist **178**(1): 92-102.

- Liao, W., Z. Yu, Z. Lin, Z. Lei, Z. Ning, J. M. Regenstein, J. Yang and J. Ren (2015). "Biofunctionalization of Selenium Nanoparticle with Dictyophora Indusiata Polysaccharide and Its Antiproliferative Activity through Death-Receptor and Mitochondria-Mediated Apoptotic Pathways." International Journal of Scientific Reports **5**: 18629.
- Lin, Z.-H. and C. C. Wang (2005). "Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles." Materials Chemistry and Physics **92**(2-3): 591-594.
- Luminita Fritea, Vasile Laslo, Simona Cavalu, T. Costea and a. S. I. Vicas (2017). "Green Biosynthesis of Selenium Nanoparticles using Parsley (*Petroselinum crispum*) leaves extract." Simona Ioana Vicas **27**(3): 203-208.
- Mafuné, F., J.-y. Kohno, Y. Takeda and T. Kondow (2002). "Full Physical Preparation of Size-Selected Gold Nanoparticles in Solution: Laser Ablation and Laser-Induced Size Control." The Journal of Physical Chemistry B **106**(31): 7575-7577.
- Mansor, N., H. J. Heng, S. J. Samsudin, S. Sufian and Y. Uemura (2016). "Quantification and Characterization of Allicin in Garlic Extract." Journal of Medical and Bioengineering **5**(1): 24-27.
- Mellinas, C., A. Jimenez and M. D. C. Garrigos (2019). "Microwave-Assisted Green Synthesis and Antioxidant Activity of Selenium Nanoparticles Using Theobroma Cacao L. Bean Shell Extract." Molecules **24**(22): 40-48.
- Menon, S., S. D. K.S, H. Agarwal and V. K. Shanmugam (2019). "Efficacy of Biogenic Selenium Nanoparticles from an Extract of Ginger towards Evaluation on Anti-Microbial and Anti-Oxidant Activities." Colloid and Interface Science Communications **29**: 1-8.
- Menon, S., S. D. Ks, S. R, R. S and V. K. S (2018). "Selenium nanoparticles: A potent chemotherapeutic agent and an elucidation of its mechanism." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **170**: 280-292.
- Mittal, A. K., Y. Chisti and U. C. Banerjee (2013). "Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts." Biotechnology Advances **31**(2): 346-356.
- Mounicou, S., J. Meija and J. Caruso (2004). "Preliminary studies on selenium-containing proteins in *Brassica juncea* by size exclusion chromatography and fast protein liquid chromatography coupled to ICP-MS." Analyst **129**(2): 116-123.
- Nomura, K. and P. Terwilliger (2019). "Self-dual Leonard pairs." Special Matrices **7**(1): 1-19.

- Papp, L. V., J. Lu, A. Holmgren and K. K. Khanna (2007). "From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health." Antioxid Redox Signal **9**(7): 775-806.
- Prasad, K. S., H. Patel, T. Patel, K. Patel and K. Selvaraj (2013). "Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **103**: 261-266.
- Qing, Y., L. Cheng, R. Li, G. Liu, Y. Zhang, X. Tang, J. Wang, H. Liu and Y. Qin (2018). "Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies." Int J Nanomedicine **13**: 3311-3327.
- Ramamurthy, C., K. S. Sampath, P. Arunkumar, M. S. Kumar, V. Sujatha, K. Premkumar and C. Thirunavukkarasu (2013). "Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells." Bioprocess and Biosystems Engineering **36**(8): 1131-1139.
- Ramesh, P. S., T. Kokila and D. Geetha (2015). "Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Embolica officinalis* fruit extract." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **142**: 339-343.
- Reid, M. E., M. S. Stratton, A. J. Lillico, M. Fakih, R. Natarajan, L. C. Clark and J. R. Marshall (2004). "A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities." Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **18**(1): 69-74.
- Satgurunathan, T., P. S. Bhavan and S. Komathi (2017). Green synthesis of selenium nanoparticles from sodium selenite using garlic extract and its enrichment on *Artemia nauplii* to feed the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. Chemistry and Environment. **21**: 1-12.
- Shah, M., D. Fawcett, S. Sharma, S. K. Tripathy and G. E. J. Poinern (2015). "Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities." Materials (Basel) **8**(11): 7278-7308.
- Sharma, G., A. R. Sharma, R. Bhavesh, J. Park, B. Ganbold, J. S. Nam and S. S. Lee (2014). "Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried *Vitis vinifera* (raisin) extract." Molecules **19**(3): 2761-2770.
- Sintubin, L., W. De Windt, J. Dick, J. Mast, D. van der Ha, W. Verstraete and N. Boon (2009). "Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles." Applied Microbiology and Biotechnology **84**(4): 741-749.

- Stacey Barnaby, Nazmul Sarker, Aaron Dowdell and Ipsita Bannerjee (2011). "The Spontaneous Formation of Selenium Nanoparticles on Gallic Acid Assemblies and their Antioxidant Properties." The Fordham Undergraduate Research Journal **1**(1): 41-46.
- Szychowski, K., K. Rybczyńska-Tkaczyk, K. Gaweł-Beben, M. Świeca, M. Karaś, A. Jakubczyk, M. Matysiak, U. Binduga and J. Gmiński (2018). "Characterization of Active Compounds of Different Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars." Polish Journal of Food and Nutrition Sciences **68**(1): 73-81.
- Thomas, C. and J.-A. Gustafsson (2011). "A CUE hints at tumor resistance." nature medicine **17**: 708-714.
- Vyas, J. and S. Rana (2017). "Antioxidant activity and green synthesis of selenium nanoparticles using allium sativum extract." International Journal of Phytomedicine **9**(4): 634.
- Wang, J. C., P. Neogi and D. Forciniti (2006). "On one-dimensional self-assembly of surfactant-coated nanoparticles." Journal of Chemical Physics **125**(19): 194717.
- Wang, X.-Y. (2014). "Properties prediction of ultra high performance concrete using blended cement hydration model." Construction and Building Materials **64**: 1-10.
- Wang, Y., P. Chen, G. Zhao, K. Sun, D. Li, X. Wan and J. Zhang (2015). "Inverse relationship between elemental selenium nanoparticle size and inhibition of cancer cell growth in vitro and in vivo." Food Chem Toxicol **85**: 71-77.
- Weisberger, A. S. and J. Pensky (1958). "Tumor Inhibition by a Sulfhydryl-blocking Agent Related to an Active Principle of Garlic (*Allium sativum*)." american association for cancer research **18**(11): 1301-1308.
- Whanger, P. and J. Butler (1988). "Effects of Various Dietary Levels of Selenium as Selenite or Selenomethionine on Tissue Selenium Levels and Glutathione Peroxidase Activity in Rats." The Journal of nutrition **118**(7): 846-852.
- Whanger, P. D. and J. A. Butler (1988). "Effects of Various Dietary Levels of Selenium as Selenite or Selenomethionine on Tissue Selenium Levels and Glutathione Peroxidase Activity in Rats." Journal of Nutrition: 46-52.
- Wiwat, W. and M. Wallaya (2009). "Effect of heat treatment on the antioxidant capacity of garlic." Maejo International Journal of Science and Technology **3**(1): 60-70.

- Yoo, M., S. Lee, S. Lee, H. Seog and D. Shin (2010). "Validation of high performance liquid chromatography methods for determination of bioactive sulfur compounds in garlic bulbs." Food Science and Biotechnology **19**(6): 1619-1626.
- Zeebaree, S. Y. S., A. Y. S. Zeebaree and O. I. H. Zebari (2020). "Diagnosis of the multiple effect of selenium nanoparticles decorated by Asteriscus graveolens components in inhibiting HepG2 cell proliferation." Sustainable Chemistry and Pharmacy **15**: 100210.
- Zhang, J.-S., X.-Y. Gao, L.-D. Zhang and Y.-P. Bao (2001). "Biological effects of a nano red elemental selenium." BioFactors **15**(1): 27-38.
- Zhang, J., E. W. Taylor, X. Wan and D. Peng (2012). "Impact of heat treatment on size, structure, and bioactivity of elemental selenium nanoparticles." International Journal of Nanomedicine **7**: 815-825.
- Zhang, W., J. Zhang, D. Ding, L. Zhang, L. A. Muehlmann, S. E. Deng, X. Wang, W. Li and W. Zhang (2018). "Synthesis and antioxidant properties of Lycium barbarum polysaccharides capped selenium nanoparticles using tea extract." Artif Cells Nanomed Biotechnol **46**(7): 1463-1470.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวปิ่นประภา ศรีเบ็ญจรัตน์
วัน เดือน ปี เกิด	06 กันยายน 2537
สถานที่เกิด	ชลบุรี
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษา - มัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียน เซนต์ปอลคอนแวนต์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนปลาย จาก โรงเรียนศรีราชา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จากมหาวิทยาลัยศิลปากร คณะ วิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ที่อยู่ปัจจุบัน	10/8 ม.3 ต.สุรศักดิ์ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี 20110
ผลงานตีพิมพ์	Selenium nanoparticles biosynthesized by garlic extract as antimicrobial agent. Pinprapha Sribenjarat ¹ , Nuananong Jirakanjanakit ² , and Kalyanee Jirasripongpun ^{1*} . SEHS 2020 vol 14 (1) ; 22-31.

