



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การสังเคราะห์และศึกษาการเกิดอัลฟาเฮลิคซ์ของโพลีเปปไทด์โดยใช้อนุภาคระดับนาโนของทองเพื่อเป็นตัวเหนี่ยวนำ เพื่อใช้ในการประยุกต์ทางการแพทย์

α -Helices of peptide using gold nanoparticles as a receptor and covalently lock the α -helices onto gold nanoparticles for biomedical applications

โดย ดร. อภิวัฒน์ ชมภูสอ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การสังเคราะห์และศึกษาการเกิดอัลฟาเฮลิคซ์ของโพลีเปปไทด์โดยใช้อนุภาคระดับนาโนของทองเพื่อเป็นตัวเหนี่ยวนำ เพื่อใช้ในการประยุกต์ทางการแพทย์

α -Helices of peptide using gold nanoparticles as a receptor and covalently lock the α -helices onto gold nanoparticles for biomedical applications

ผู้วิจัย

ดร. อภิวัฒน์ ชมภูสอ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480038

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์และศึกษาการเกิดอัลฟาเฮลิคส์ของโพลีเปปไทด์โดยใช้อนุภาคระดับนาโนของทองเพื่อเป็นตัวเหนี่ยวนำ เพื่อใช้ในการประยุกต์ทางการแพทย์

ชื่อนักวิจัย : ดร. อภิวัฒน์ ชมภูสอ

อีเมลล์ : apiwat@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี 6 เดือน (มิถุนายน 2554 – ธันวาคม 2557)

บทคัดย่อ:

โครงการวิจัยนี้ ได้ทำการพัฒนาการใช้อนุภาคนาโนเพื่อประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง โดยในแนวทางป้องกันการเกิดมะเร็งจะทำการสังเคราะห์ตัวรับ ซึ่งสามารถจับกับโปรตีน MDM2 ซึ่งตัวรับที่สังเคราะห์ขึ้นนี้จะเป็อนุภาคระดับนาโนของทองที่มีประจุบวก ซึ่งจะสามารถจับกับเปปไทด์ และเหนี่ยวนำให้เปปไทด์มีโครงสร้างแบบอัลฟาเฮลิคส์ จากผลการทดลองพบว่าสามารถสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนของทองที่มีประจุบวกและเหนี่ยวนำให้เปปไทด์เกิดโครงสร้างแบบอัลฟาเฮลิคส์กับทองได้ และมีความเสถียรถึง 6 ชั่วโมง ซึ่งสามารถติดตามการเกิดอัลฟาเฮลิคส์ได้ โดยใช้เทคนิคเซอร์คูลาร์ไดโครอิสซึม แต่อนุภาคที่สังเคราะห์ได้นี้ไม่เสถียรในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ซึ่งปัญหานี้ควรจะได้รับการพัฒนาจึงจะสามารถใช้ได้จริง อีกแนวทางหนึ่งคือการรักษาโรคมะเร็งโดยใช้ตัวนำส่งระดับนาโน โดยการพัฒนาวีธีการเตรียมอนุภาคนาโนผลการทดลองพบว่าตัวเคลือบทั้ง พอลิไวนิลแอลกอฮอล์และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตจะให้อนุภาคที่มีขนาดเล็กและมีการปลดปล่อยยาที่ดี แสดงให้เห็นว่าวัสดุนาโนมีคุณสมบัติที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้

คำหลัก: อนุภาคนาโน, อัลฟาเฮลิคส์, การรักษามะเร็ง

Abstract

Project Code : MRG5480038

Project Title : α -Helices of peptide using gold nanoparticles as a receptor and covalently lock the α -helices onto gold nanoparticles for biomedical applications

Investigator : Dr. Apiwat Chompoosor

E-mail Address : apiwat@kku.ac.th

Project Period : 3 years 6 months (June 2011 – December 2015)

Abstract:

This work is aimed to develop the use of nanoparticles in the prevention and therapy of cancer. In the prevention of cancer, a synthetic receptor which could be able to bind with MDM2 protein was fabricated. Gold nanoparticles decorated with cationic-terminated ligand were synthesized. The cationic gold nanoparticles were bound with peptide and induced the alpha-helix structure of peptide. The formation of helical conformation were monitored using circular dichroism spectrophotometer. The results showed that the helical structure was stable for 6 hours. This hybrid nanostructure were unstable in the presence of 15 mM of sodium chloride solution. This problem is required to be solved in order to use the hybrid material in biomedical application. The second approach of cancer therapy needed to be developed is the fabrication of nanoparticles. The results showed that stabilizers such as polyvinyl alcohol and sodium dodecyl sulphate play a crucial role in the formation of nanopartilces. These stabilizers also facilitated the release of drug which is essential in cancer therapy. This research has demonstrated that nanomaterials have a promising potential to be use in biomedical application.

Keywords : Nanoparticles, alpha-helix, cancer therapy

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

ในการพัฒนางานวิจัยทางด้านนาโนเทคโนโลยีเพื่อใช้อนุภาคระดับนาโนในการป้องกันและรักษา มะเร็งมีความสำคัญอย่างมาก ซึ่งในแนวทางป้องกันการเกิดโรคมะเร็งโดยแนวทางของอันตรกิริยาของเปปไทด์-โปรตีนมีความน่าสนใจอย่างมากในการศึกษาและพัฒนา โดยอนุภาคนาโนที่มีประจุบวกที่สังเคราะห์ขึ้นนี้มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เปปไทด์ ที่มีประจุลบมาจับผ่านอันตรกิริยาแบบไฟฟ้าสถิตย์ ซึ่งผลจาก CD พบว่าอัลฟาเฮลิกซ์ที่เกิดขึ้นสามารถคงอยู่ได้ถึง 6 ชั่วโมง แต่ปัญหาที่พบก็คืออันตรกิริยานี้จะไม่เสถียรในสภาวะที่มีเกลือ อีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการพัฒนางานด้านการรักษาโรคมะเร็งก็คือ การพัฒนาวิธีการเตรียมอนุภาคนาโนให้มีขนาดพอเหมาะต่อการนำส่ง และมีความเสถียร และที่สำคัญสามารถปลดปล่อยยาได้ดี ก็มีความน่าสนใจ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงกลยุทธ์ในการเตรียมอนุภาคที่มีความเสถียรและมีขนาดที่เหมาะสมคือ 80 นาโนเมตรและ ปลดปล่อยยาที่ดี ซึ่งเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าแนวทางการพัฒนางานวิจัยเหล่านี้ยังสามารถที่จะทำต่อยอด เพื่อที่จะให้สามารถนำ นาโน มาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในอนาคตได้

ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics โดยมีชื่อเรื่องคือ “The Role of Anionic Stabilizer on the Formation of Polyoxalate Nanoparticles: In Vitro Release and Cytotoxicity of Polyoxalate Nanoparticles”

สารบัญ

บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)	iii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 อนุภาคนาโนของทอง	4
2.2 สมบัติของทองและอนุภาคนาโนของทอง	5
2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง	7
2.4 การแลกเปลี่ยนลิแกนด์ของอนุภาคนาโนของทอง	9
2.5 Circular dichroism	9
2.6 อนุภาคนาโน	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	14
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	14
3.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์	16
3.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง	17
3.4 การศึกษาการเกิดอัลฟาเฮลิคัล	18
3.5 การศึกษาการเกิดพันธะโคเวเลนต์ของเปปไทด์กับ อนุภาคนาโนของทอง	18
3.6 การสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโน	19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	21
4.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์	21
4.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง	21
4.3 การศึกษาการเกิดอัลฟาเฮลิคัล	23
4.4 การศึกษาการเกิดพันธะโคเวเลนต์ของเปปไทด์กับ อนุภาคนาโนของทอง	24
4.5 การสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโน	26
บทที่ 5 สรุปผลงานวิจัย	31
ภาคผนวก	32
เอกสารอ้างอิง	33

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันนาโนเทคโนโลยี มีความสำคัญในการพัฒนางานทางด้านชีวการแพทย์อย่างมาก โดยเฉพาะงานทางด้านการตรวจวินิจฉัย การนำส่งยาเพื่อการพัฒนาการรักษา วัสดุนาโนที่จะนำมาใช้ในงานทางด้านชีวการแพทย์ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างมาก โดยเฉพาะอนุภาคนาโนของทองและอนุภาคนาโนจากพอลิเมอร์ เนื่องจากอนุภาคนาโนเหล่านี้มีขนาดเล็ก ในระดับนาโนซึ่งจากคุณสมบัติที่มีขนาดเล็กนี้มีข้อดีหลายประการได้แก่ มีพื้นที่ผิวสัมผัสที่สูง และสามารถบรรจุลิแกนด์ที่เคลือบอนุภาคได้จำนวนมาก ด้วยคุณสมบัติที่พิเศษนี้ นักวิจัยจึงมีความสนใจในวัสดุระดับนาโน เพื่อประยุกต์ใช้งานทางด้านชีวการแพทย์

ในปัจจุบัน มีผู้ป่วยโรคมะเร็งจำนวนมาก และมีรายงานว่ามียาจำนวนมากที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งและการรักษาโรคมะเร็ง กันอย่างกว้างขวาง ในส่วนของการรักษา ปัจจุบันนักวิจัยได้มีการพัฒนาการนำส่งยา ยีนส์ และโปรตีน เพื่อหาวิธีการใหม่ๆ ที่จะพัฒนาประสิทธิภาพในการรักษา กล่าวคือเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็ง โดยในการฆ่าเซลล์มะเร็งอาจจะกระทำผ่านกระบวนการลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งก็ได้ หรืออาจจะเกิดผ่านกลไกการนำส่งยาเข้าไปยังเซลล์มะเร็ง และเกิดการปลดปล่อยยาที่เป้าหมาย และยา ก็จะออกฤทธิ์ทำลาย เซลล์มะเร็ง ซึ่งในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาทั้งสองยุทธวิธี กลุ่มวิจัยหลายกลุ่มได้พยายามค้นคว้าหาวิธีการรักษาโรคมะเร็งหรือป้องกันการเกิดมะเร็งให้ได้ หนึ่งใน การค้นพบที่น่าสนใจอย่างมากก็คือพบว่าในการเกิดเซลล์มะเร็งนั้น มีโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งมีชื่อว่า p53 ซึ่งโปรตีนชนิดนี้เป็นตัวควบคุมวงจรของเซลล์ ทั้งการแบ่งเซลล์และการตายของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า p53 มีบทบาทในการยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ โดยจากข้อมูลรายงานว่าในเซลล์มะเร็งจะมีปริมาณของ p53 ในปริมาณที่ต่ำกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งจากการที่มี p53 ที่ต่ำนี้ จะทำให้การควบคุมวงจรการแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์ผิดปกติไป เป็นสาเหตุหนึ่งซึ่งนำไปสู่การเกิดมะเร็ง และยังพบว่า การที่มีปริมาณ p53 ที่น้อยลงนี้ เกิดจากการสลายตัวของ p53 เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่า MDM2 โดยตำแหน่งที่เกิดอันตรกิริยานี้จะเกิดตรงตำแหน่ง อัลฟาเฮลิคซ์ ของ p53และส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิกของ MDM2

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนากระบวนการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งด้วยอนุภาคนาโน โดยในกระบวนการศึกษาการป้องกันการเกิดมะเร็งโดยการยับยั้งอันตรกิริยาระหว่าง p53/MDM2 โดยจะ

สังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนของทองซึ่งมีลิแกนด์เป็นประจุบวกและสังเคราะห์เปปไทด์ที่มีลำดับเลียนแบบเปปไทด์ของ p53 ที่มีประจุเป็นลบ แล้วก็นำอนุภาคของทอง (ประจุบวก) มาเข้าคู่กันกับเปปไทด์ (ประจุลบ) อนุภาคของทองจะเหนี่ยวนำให้เปปไทด์เกิดเป็นเกลียว (α -helix formation) ซึ่งจากรายงานพบว่าถ้าไม่มีอนุภาคของทองเป็นตัวเหนี่ยวนำแล้วเปปไทด์ก็并不会เกิดเป็นเกลียว หลังจาก ได้เกลียวของเปปไทด์บนพื้นผิวของทองแล้วก็จะลอกอนุภาคทั้งสองไว้ด้วยพันธะเคมี และจะได้อนุภาคระดับของทองที่มีผิวเป็นอัลฟาเฮลิคซ์เปปไทด์ติดอยู่จากขนาดระดับนาโนของทองซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีนเป้าหมาย (MDM2) โดยคาดว่าอนุภาคที่ได้นี้จะจับกับ MDM2 ได้เหมือนกับอันตรกิริยาของ p53/MDM2 โดยเกิดผ่านอันตรกิริยาเดียวกันคือ “อัลฟาเฮลิคซ์-ไฮโดรโฟบิก” ด้วยวิธีการนี้จะทำให้ไม่มี MDM2 ไปจับและทำลาย p53 จะทำให้มีปริมาณ p53 ที่สูงขึ้น แล้วก็จะทำให้ p53 สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์และ การฆ่าเซลล์ได้อย่างเป็นปกติ ส่วนในกระบวนการพัฒนาประสิทธิภาพการรักษามะเร็งจะผ่านกลไกการประดิษฐ์วัสดุระดับนาโนที่มีความเสถียร และศึกษาการปลดปล่อยยาจากระบบนำส่งในระดับนาโน

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 พัฒนารูปแบบในการรักษามะเร็งผ่านอันตรกิริยาของเปปไทด์กับโปรตีน
- 1.2.2 พัฒนาการประดิษฐ์อนุภาคนาโนเพื่อให้ได้อนุภาคนาโนที่มีความเสถียรและมีขนาดอยู่ในระดับนาโน
- 1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ เพื่ออาจนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านการรักษามะเร็งและด้านชีวการแพทย์
- 1.2.4 ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยจะเน้นไปที่การสังเคราะห์อนุภาคนาโน, เปปไทด์ และวัสดุนาโน เพื่อใช้ในการศึกษาอันตรกิริยา และพัฒนาวิธีประดิษฐ์วัสดุนาโน เพื่อใช้ในกระบวนการป้องกันและรักษา โรคมะเร็ง ซึ่งขอบเขตของงานวิจัยนี้ประกอบด้วย

- 1.3.1 การสังเคราะห์อนุภาครับนาโนของทองที่มีขนาด ประมาณ 2 นาโนเมตร และเคลือบด้วยลิแกนด์ที่เป็นสารกลุ่มเอมีน ซึ่งมีประจุบวก

- 1.3.2 การศึกษาอันตรกิริยาและการฟอร์มเฮลิคซ์ของเปปไทด์ บนอนุภาคระดับนาโนของทอง ซึ่งจะติดตามการเกิดเฮลิคซ์ ได้โดยการวัด circular dichroism
- 1.3.3 ออกแบบและประดิษฐ์ อนุภาคนาโนที่มีความเสถียร เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง
- 1.3.4 ศึกษาความสามารถของอนุภาคนาโนในการควบคุมการปลดปล่อยยา เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

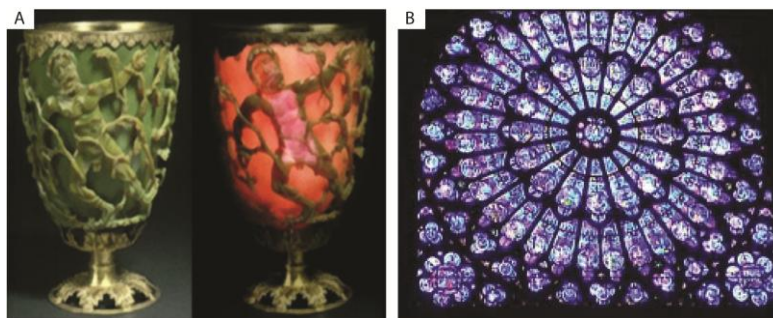
- 1.4.1 ได้อนุภาคนาโนที่มีความเสถียรและมีประสิทธิภาพในการใช้รักษาโรคมะเร็ง
- 1.4.2 เครือข่ายความร่วมมือระหว่างนักวิจัยทั้งในและต่างสถาบัน
- 1.4.3 ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุภาคนาโนของทอง

โครงสร้างระดับนาโนของทองได้รับความสนใจจากนักวิจัย อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติที่โดดเด่น ในเรื่อง เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (Surface Plasmon Resonance, SPR) ซึ่ง SPR ก็คือ ปรากฏการณ์เชิงแสง ซึ่งเกิดจากอันตรกิริยาของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า และอิเล็กตรอนที่อยู่ในโลหะระดับนาโน กล่าวคือเมื่อมีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมาตกกระทบโลหะ กลุ่มอิเล็กตรอนที่ถูกจำกัดอยู่ในอนุภากระดับนาโนจะเกิดการสั่นรวม (collective oscillation) และเมื่อคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอก มีความยาวคลื่นเดียวกันกับความยาวคลื่นที่อิเล็กตรอนสั่นในอนุภาคนาโน จะทำให้เกิดการก่อกวนขึ้น [1] ซึ่งอันตรกิริยาที่แสงกระทำต่อโลหะจะเกิดได้สองแบบคือ แสงจะตกกระทบและสะท้อนออกไปด้วยความยาวคลื่นเท่าเดิมทุกทิศทาง เรียกว่าการกระเจิง (scattering) และในขณะเดียวกัน บางโฟตอนก็จะถูกดูดกลืนและถูกเปลี่ยนไปเป็นพลังงานการสั่น ซึ่งเรียกว่าการดูดกลืนแสง (absorption) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว โครงสร้างระดับนาโนของทองจะเกิดทั้งกระบวนการกระเจิงแสงและการดูดกลืนแสง ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับ ขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโน ยกตัวอย่างเช่น อนุภาคแบบทรงกลมของทอง เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 50 นาโนเมตร จะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร ซึ่งจะให้สีแดงทับทิม ไมเคิล ฟาราเดย์ เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่สามารถสังเคราะห์ อนุภากระดับนาโนของทอง ได้โดยวิธีการทางเคมี โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง โกลด์คลอไรด์ กับ ฟอสฟอรัสในน้ำ ซึ่งอนุภาคที่เตรียมได้ยังคงเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์ ในกรุงลอนดอน ประเทศอังกฤษ [2] ด้วยคุณสมบัติ SPR ของทอง ทำให้ทองถูกนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น อนุภาคนาโนแบบทรงกลมถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการทำให้เกิดสีในแก้ว ตั้งแต่สมัยโบราณ ดังรูปที่ 2.1 ในสมัยโรมันมีการนำอนุภาคนาโนของทองมาผสมในแก้วไลเคอร์กัส และสีของกระจกในโบสถ์ ซึ่งเป็นตัวอย่างแรกๆ ที่มีการนำวัสดุนาโนมาใช้ แม้ว่าในตอนนั้นผู้คนอาจจะยังไม่เข้าใจกลไกการเกิดสีของแก้วก็ตาม แก้วไลเคอร์กัส ซึ่งสะท้อนแสงสีเขียวและส่งผ่านแสงสีแดงทับทิม ซึ่งกลไกการเกิดสีก็มาจากการกระเจิงและการดูดกลืนแสงของอนุภากระดับนาโนของทองที่ฝังอยู่ในแก้วนั่นเอง



รูปที่ 2.1 แสดงรูปการใช้อนุภาคนาโนของทองในสมัยโบราณ (A) แก้วไลเคอร์กัส (B) สีของกระจกในโบสถ์ Notre Dame Cathedral

(ที่มา : ปรับปรุงจาก <http://szou.cos.ucf.edu/outreach/webpage/Page383.htm>)

อนุภาคนาโนของทองถูกใช้ถูกใช้ในงานชีวการแพทย์มาอย่างยาวนานตั้งแต่สมัยโบราณแล้ว เนื่องจากสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่มีพิษ และมีความเฉื่อยทางเคมีที่สุด ขนาดของอนุภาคนาโนของทองสามารถควบคุมได้ในระหว่างการสังเคราะห์และการติดหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกันไป อนุภาคนาโนของทองจะมีการสะสมบริเวณเซลล์มะเร็งและแสดงการกระจายตัวเชิงแสงจึงสามารถแสดงความเป็นโพรวัดได้ ในการศึกษาเซลล์มะเร็งจึงใช้อนุภาคนาโนของทองในการรักษาทางเคมีการวินิจฉัย [3] การนำส่งยา ยีนส์ และโปรตีน เป็นต้น [4-6]

2.2 สมบัติของทองและอนุภาคนาโนของทอง

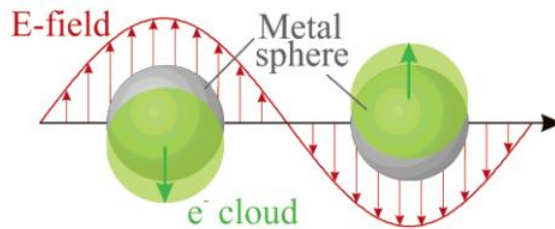
2.2.1 สมบัติของทอง

ทองเป็นโลหะที่ไม่ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงทนต่อการผุกร่อนและไม่เกิดสนิม แต่จะทำปฏิกิริยากับคลอรีน ฟลูออรีนและน้ำประสานทอง นอกจากคุณสมบัติที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นทองยังมีคุณสมบัติที่ดี เช่น นำไฟฟ้า สะท้อนความร้อนได้ดี เป็นต้น [7]

2.2.2 สมบัติอนุภาคนาโนของทอง

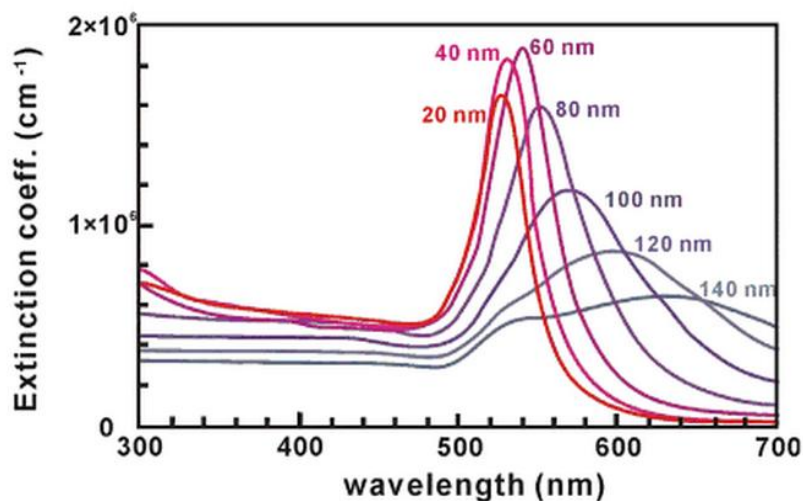
ในทองคำที่มีขนาดใหญ่ (bulk) เราจะทราบดีว่าสีของทองคำจะมีสีเหลืองแต่ด้วยคุณสมบัติของวัสดุนาโนเราจะพบว่าอนุภาคนาโนของทองนั้นจะให้สีต่างๆกันออกไปตามขนาด ซึ่งปรากฏการณ์นี้ได้ถูกอธิบายไว้อย่างละเอียดในปี ค.ศ.1908 โดย Gustav Mie ผู้ซึ่งใช้สมการของ Maxwell อธิบายค่าสนามแม่เหล็กที่ส่งผลต่ออนุภาคทรงกลมโลหะขนาดเล็ก ตามทฤษฎีของ Mie ได้กล่าวว่า ค่าการสูญเสียพลัง (extinction cross section) เชิงแสงนั้น ประกอบด้วยค่าจากการดูดกลืน (adsorption) และค่าการกระเจิง (scattering) ซึ่งถูกเปลี่ยนมาเป็นการสั่นทางไฟฟ้าและแม่เหล็ก เมื่ออนุภาคทรงกลมขนาดเล็กได้รับพลังงานจากแสงการฉายแสงอิเล็กตรอนอิสระที่ถูกขังอยู่ในแถบการนำ (Conduction band) ของทรงกลมโลหะนั้นจะมีการเคลื่อนที่สัมพันธ์กับนิวเคลียสของอะตอมในเนื้อโลหะนั้น และสั่นสอดคล้องกับ

สนามแม่เหล็ก เนื่องจากเกิดแรงกลับสู่สมดุลเกิดขึ้นในทิศตรงข้ามกับแรงดึงดูดระหว่างอิเล็กตรอนกับนิวเคลียส ทำให้การสั่นของกลุ่มหมอกอิเล็กตรอนสั่นด้วยความถี่จำเพาะค่าหนึ่งที่อยู่ในช่วงเดียวกับความถี่ภายใน ในทิศตรงข้ามกัน [8] ดังภาพที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงการสั่น Plasmon ของอนุภาคโลหะทรงกลมที่กลุ่มหมอกอิเล็กตรอนมีการเคลื่อนที่สัมพันธ์กับนิวเคลียส

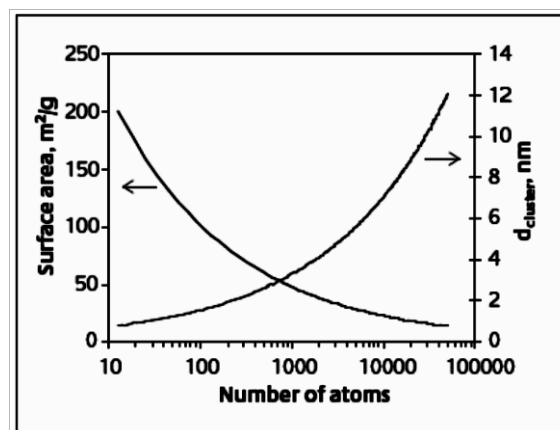
สำหรับอนุภาคนาโนของทอง แถบ Surface Plasmon จะปรากฏในช่วง 520 nm อย่างไรก็ตาม การลดขนาดของแกนกลาง (core) ของอนุภาคนาโนของทองลงให้น้อยกว่า 3 nm จะปรากฏค่าความคมของกราฟความเข้มจะมีค่าลดลง เนื่องจากการถูกรบกวนจากปรากฏการณ์ทางควอนตัม ที่แถบพลังงานมีความไม่ต่อเนื่องนั่นเอง ค่า Surface Plasmon ปรากฏได้หลายความถี่ ความเข้ม และหลายความกว้าง เนื่องจากขนาดของอนุภาค รูปร่างและดัชนีการหักเหของสารละลาย ตัวอย่างเช่น อนุภาคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20, 80 และ 120 nm จะเกิดพีคการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 522, 550 และ 615 nm ดังภาพที่ 2.3 จึงกล่าวได้ว่า ค่า Surface Plasmon ของอนุภาคนาโนของทองจะมีการเลื่อนของกราฟไปสู่ความยาวคลื่นที่ยาวขึ้นเมื่อขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น [9]



รูปที่ 2.3 ค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนของทองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างกันในการละลายน้ำ

2.2.3 พื้นที่ผิวต่อปริมาตรมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของอนุภาค

อนุภาคนาโนของทองจะมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตร (Surface to volume) สูงเมื่อเทียบกับทองชนิดเดียวกันแต่มีขนาดที่ใหญ่กว่า เนื่องจากมีอะตอมจำนวนมากอยู่บริเวณผิวหน้าทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีได้ง่าย ดังแสดงในภาพที่ 2.4 แสดงขนาดของอนุภาคนาโนของทองที่มีขนาดเล็กลงนั้นคือมีจำนวนอะตอมที่เล็กลงและมีพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้อนุภาคนาโนของทองที่มีขนาดเล็กยังมีอะตอมบนบริเวณผิวหน้า จะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเคมีบนพื้นผิวหน้าของวัสดุได้ง่าย [10] เนื่องจากอนุภาคทองมีขนาดที่ใกล้เคียงกับโปรตีน จึงมีการศึกษาพัฒนากันอย่างกว้างขวางเพื่อจะใช้ทองเป็นตัวทำอันตรกิริยากับโปรตีนและทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรตีน

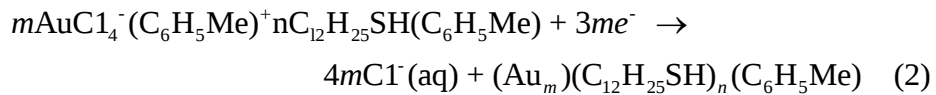
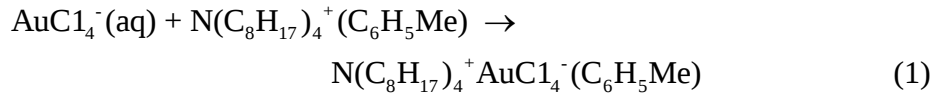


รูปที่ 2.4 การประมาณจำนวนอะตอมของอนุภาคนาโนของทองที่มีขนาดต่างกัน

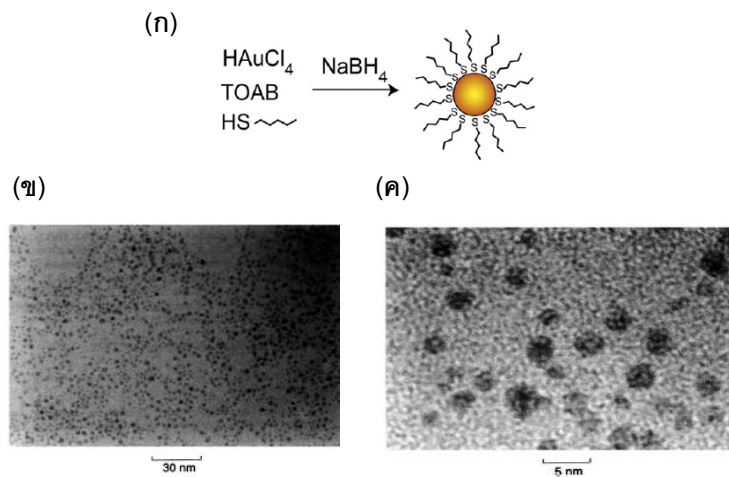
2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง

Brust et al. [11] ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง (AuCl_4^-) ด้วยวิธี Two-phase หรือวิธี Brust-Schiffrin พวกเขาพบว่า อัตราส่วนระหว่างทองกับสารประกอบไรโออลมีผลต่อขนาดของอนุภาคของทองและอนุภาคนาโนของทองที่ได้จากการสังเคราะห์มีขนาดประมาณ 2-6 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1990 และใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองในสารละลายอินทรีย์ (ได้แก่ โทลูอีน) ซึ่งปกติจะไม่เข้ากันกับน้ำ เป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากสารละลายกรดคลอโรอริก (AuCl_4^-) กับสารละลาย tetraoctylammonium bromide (TOAB) ในโทลูอีน เป็นตัวนำส่งเปลี่ยนเฟส และมีตัวรีดิวซ์คือ sodium borohydride (NaBH_4) ซึ่งจะเติมพร้อมกับ dodecanethiol ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$) ซึ่งจับได้กับผิว

ของทอง เมื่อเติมตัวรีดิวซ์ สารละลายโพลูอินจะเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นน้ำตาลเข้มภายในไม่กี่นาที ปฏิกิริยารวมสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้



อิเล็กตรอนที่ได้มาจาก BH_4^- ในที่นี้จะได้อนุภาคนาโนของทองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 2-6 นาโนเมตรซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างไฮดรอลและทอง

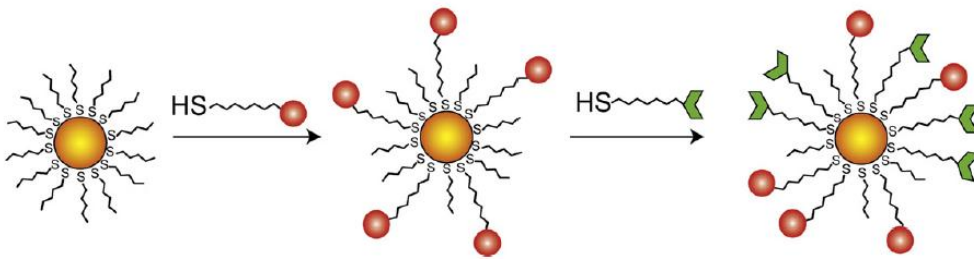


ภาพที่ 2.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองโดยวิธี Brust-Schiffrin และแสดงภาพ(Transmission Electron Micrographs) TEM ของอนุภาคนาโนของทองที่มีลิแกนด์ติดอยู่ (ข) ภาพกำลัง ขยายต่ำ (ค) ภาพกำลังขยายสูง

ในภาพที่ 2.5 แสดงรูปร่างของอนุภาคที่มีการกระจายทางโครงสร้างทั้งแบบ cuboctahedral และ icosahedral นอกจากนี้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองในหลายๆวิธีมักจะพบการจับตัวของอนุภาคแบบ twinning แต่สำหรับวิธีนี้ หมู่ไฮดรอลจะจับตัวล้อมรอบกลุ่มนิวคลีโอของทอง ทำให้ป้องกันการจับตัวของอนุภาคแบบ twinning ขนาดของอนุภาคนาโนของทองจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของไฮดรอล (SH)/ทอง ถ้าปริมาณของไฮดรอลมีมาก ขนาดของอนุภาคก็จะเล็ก โครงสร้างของอนุภาคที่มีไฮดรอลเป็นชั้นผิวห่อหุ้มทองอยู่ จะมีทองประมาณ 102 อะตอม และ p-mercapto benzoic acid 44 หน่วย [12]

2.4 การแลกเปลี่ยนลิแกนด์ของอนุภาคนาโนของทอง

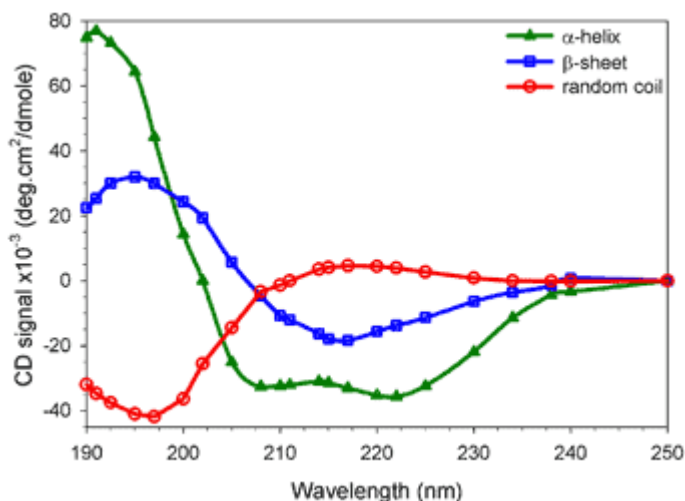
Placed-exchange reaction (ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์) เป็นการปรับปรุงพื้นผิว (functionalization) ให้กับอนุภาคของทอง เพื่อให้เหมาะกับการใช้งาน หรือเพิ่มประสิทธิภาพให้กับตัวนำส่ง ดังแสดงในภาพที่ 2.11 อนุภาคนาโนของทองที่สังเคราะห์ขึ้นในขั้นต้นจะสามารถนำมาทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ระหว่างไธออล (thiol ligands) ที่ติดอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนของทองกับลิแกนด์ภายนอก กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่สำคัญในการเตรียมอนุภาคของทองให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ [13]



รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองที่ได้จากปฏิกิริยาและเปลี่ยนลิแกนด์

2.5 Circular dichroism

Circular dichroism (CD) สามารถประยุกต์ใช้เพื่อวัดความเป็นไครัลลิตีของสารโมเลกุลขนาดเล็ก ไปจนถึงโมเลกุลขนาดใหญ่พวกโปรตีน ดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ ได้ โดยทั่วไป CD ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจสอบโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์และโปรตีนได้ และที่สำคัญคือเทคนิคนี้จะไม่ทำลายสารตัวอย่างอีกด้วย โดยหลักการของ CD จะวัดการดูดกลืนแสงของโมเลกุลที่เป็นไครัล โดยจะวัดการดูดกลืนแสงที่ต่างกันระหว่าง การดูดกลืนแสงที่หมุนวนซ้าย (left circularly polarized light) และ หมุนวนขวา (right circularly polarized light) ทำให้แสงที่ผ่านโมเลกุลมีลักษณะของการบิดของระนาบแสงจากรูปวงกลมเป็นวงรี โดยโครงสร้างทุติยภูมินี้จะสามารถสังเกตได้ในช่วงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 260 และ 180 นาโนเมตร ดังรูปที่ 2.7 ซึ่งแสดง CD สเปกตรัม ของ โครงสร้างแบบ α -helix β -sheet และ random coil [14]



รูปที่ 2.7 แสดง CD สเปกตรัมของโครงสร้างแบบ α -helix β -sheet และ random coil

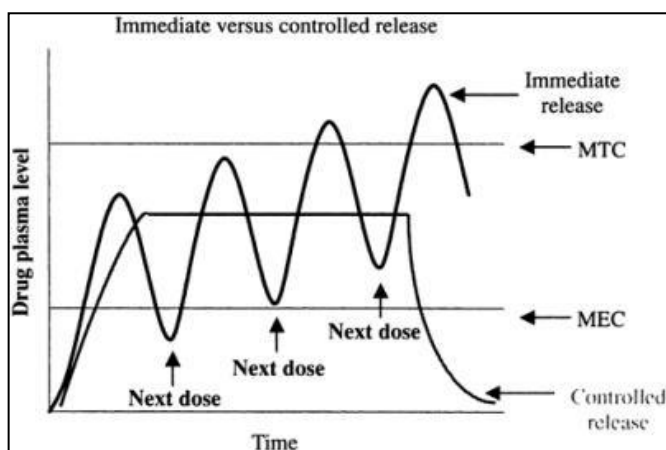
2.6 อนุภาคนาโน

อนุภาคนาโนเป็นอนุภาคที่มีขนาดในระดับนาโนเมตร บางครั้งอาจจะถึง ถึง 1 ไมครอน โดยจุดเด่นของอนุภาคนาโนคือ มีอัตราส่วนระหว่างพื้นผิวต่อปริมาตร (surface-to-volume ratio) สูง สัณฐานที่ง่ายนอกจากนี้ในอนุภาคนาโนยังมีสมบัติทางชีวภาพที่ดี [15] การใช้อนุภาคนาโนเพื่อเป็นตัวนำส่งยา จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของอนุภาคนั้นๆ และคุณลักษณะเฉพาะของสัณฐานวิทยาในระดับนาโน อีกทั้งความหลากหลายในการสังเคราะห์วัสดุจำพวกนี้ ทำให้อนุภาคนาโนได้รับความนิยมอย่างมากสำหรับการนำส่งยา ประโยชน์เหล่านี้ทำให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยยา, โปรตีน และ ดีเอ็นเอ ออกมาจากอนุภาคนาโนนี้ได้ [16]

ความท้าทายในระบบนำส่งยาส่วนมากจะเป็นความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความเสถียรในร่างกายสิ่งมีชีวิต ความสามารถในการละลายและการดูดซึมที่ลำไส้ และการไปถึงอวัยวะเป้าหมาย ประสิทธิภาพในการรักษา ผลข้างเคียง และความผันผวนของยาในพลาสมาซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของยาลดต่ำเกินกว่าจะออกฤทธิ์ หรือหลุดออกจากช่วงความเข้มข้นที่สามารถรักษาได้ อย่างไรก็ตามนาโนเทคโนโลยีในระบบนำส่งยาจะใช้ออกแบบเพื่อเอาชนะข้อจำกัดเหล่านี้ได้จากการพัฒนาและการประดิษฐ์โครงสร้างนาโนที่มีขนาดในระดับไมโครหรือนาโนเมตรซึ่งจะให้ประโยชน์ได้มากยิ่งขึ้น [17]

ในอดีต ยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยส่วนมากจะอยู่ในรูปของยารับประทานและยาในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาเม็ด (tablets) แคปซูล (capsules) ยาลูกกลอน (pills) ครีม (cream) ขี้ผึ้ง (ointments) ยาน้ำ (liquids) ยาฉีดพ่น (aerosols) ยาฉีด (injectables) และยาเหน็บ (suppositories) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การให้ยาเหล่านี้ในรูปแบบธรรมดาจำเป็นต้องควบคุมระดับความเข้มข้นของยาให้อยู่ในช่วงการรักษา (therapeutic

levels) ซึ่งจำเป็นต้องให้ยาหลายครั้งต่อวันเพราะตัวยาจะถูกปล่อยออกมามากในช่วงแรกและเมื่อร่างกายดูดซึมจะทำให้ความเข้มข้นของยาลดลง จึงจำเป็นต้องให้ยาอีกครั้ง ทำให้ระดับความเข้มข้นของยาในเลือดมีรูปแบบเป็นกราฟฟันเลื่อย ดังภาพที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงระดับความเข้มข้นของยาในเลือดที่อยู่ในระดับรักษา (Therapeutic level) และระดับที่เกิดพิษ (Toxic level) ของการให้ยาแบบปกติ (immediate release) และการควบคุมการปลดปล่อยยา (Control release)

ลักษณะเช่นนี้อาจทำให้ระดับความเข้มข้นของยาในเลือดต่ำมากจนไม่อาจแสดงฤทธิ์ (Minimum effective concentration; MEC) หรืออาจสูงมากจนอาจเกิดผลข้างเคียง (Side effect) หรือเป็นพิษได้ (Minimum toxic concentration; MTC) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีและกรรมวิธีในการออกแบบหรือควบคุมกำหนดการปลดปล่อยยาให้ออกมาในช่วงที่ต้องการ ทำให้ช่วงเวลาที่ยาแสดงฤทธิ์ได้นานขึ้น มีประสิทธิภาพในการรักษามากยิ่งขึ้น เรียกว่า ระบบนำส่งยา (drug delivery system) ซึ่งได้รับการออกแบบและสร้างขึ้นเพื่อนำตัวยาสำคัญไปสู่อวัยวะเป้าหมายในร่างกาย ระดับของยาในส่วนอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการรักษาจึงลดลงทำให้มีความจำเพาะของการนำส่งยามากยิ่งขึ้น

นาโนเทคโนโลยี ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญอย่างมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทางด้านเภสัชกรรมและการแพทย์ ความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยี ทำให้สามารถสังเคราะห์อนุภาคในระดับนาโน ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษหลายประการ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์และงานทางด้านเภสัชกรรม เช่น การสังเคราะห์อนุภาคในระดับนาโนเพื่อใช้ในการนำส่งยา ทำให้เกิดการรักษาที่มีประสิทธิภาพ และสามารถลดผลข้างเคียงจากการใช้ยา เมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาแบบดั้งเดิม อย่างมีนัยสำคัญ และใน

งานวิจัยนี้ ได้ทำการสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนโพลีออกซาเลต เพื่อใช้ในการนำส่ง และปลดปล่อยยา ซึ่งลักษณะเด่นของโพลีเมอร์ชนิดนี้คือ การทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่สามารถพบได้ในสภาวะที่ร่างกายหรืออวัยวะเกิดการอักเสบ โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหรืออาจพบได้ในมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น โดยมีการสังเคราะห์และการศึกษาคุณลักษณะ ตลอดจนการหาเงื่อนไขในการสังเคราะห์เพื่อให้ได้มาซึ่งอนุภาคนาโนที่มีประสิทธิภาพต่อการนำส่งและการปลดปล่อยยา

ขนาดของอนุภาคนาโนก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ โดยขนาดที่เหมาะสมจะช่วยให้ เกิดการนำส่งยาแบบ Passive targeting เป็นการนำส่งยาไปยังเป้าหมายโดยอาศัยปัจจัยของการเกิดมะเร็ง โดยปกติเซลล์มะเร็งจะมีการขยายและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เซลล์มะเร็งจึงมีการสร้างหลอดเลือดเข้ามาหล่อเลี้ยงบริเวณนี้มากขึ้น เพื่อให้ได้สารอาหาร, ออกซิเจนและกำจัดของเสียจากเซลล์ที่ต้องการมากขึ้นด้วย เรียกกระบวนการนี้ว่า angiogenesis การเกิด angiogenesis นี้จะส่งผลให้เยื่อบุเอ็นโดทีเรียลของผนังหลอดเลือดฝอยขาดความแข็งแรง ทำให้ผนังของเส้นเลือดเกิดช่องว่างเกิดขึ้นซึ่งอาจมีขนาดถึง 100 นาโนเมตรถึง 2 ไมครอนขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้องอก ส่งผลทำให้ตัวยาที่บรรจุในตัวนำส่งสามารถหลุดเข้าสู่บริเวณเซลล์ที่เป็นมะเร็ง แล้วสามารถนำยาให้ออกฤทธิ์ได้ นอกจากนี้บริเวณเซลล์มะเร็งมีการจัดเรียงตัวกันอย่างหลวมของเซลล์ (vasculature) และความผิดปกติของระบบน้ำเหลืองในเนื้อเยื่อของเนื้องอก ทำให้เซลล์มะเร็งมีความดันที่สูงกว่าบริเวณรอบนอก ความดันที่สูงนี้จะช่วยเพิ่มการไหลเวียนของของเหลวภายในมากขึ้น ทำให้ตัวนำส่งยาขนาดนาโนสามารถข้ามผ่านชั้นเอ็นโดทีเลียมของเซลล์มะเร็งได้และทำให้เพิ่มปริมาณของยาในเซลล์เนื้องอก ในขณะที่ยาจะเข้าไปในเซลล์ปกติได้น้อยกว่าเนื่องจากเซลล์เหล่านั้นมีเยื่อบุเอ็นโดทีเลียมที่แข็งแรง ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Enhanced Permeation and Retention (EPR) effect [18]

ในระบบนำส่งยา อันตรกิริยาระหว่างเซลล์กับอนุภาคนำส่งจำเป็นที่จะต้องทำความเข้าใจ ประจุขนาด และการปรับปรุงคุณสมบัติเชิงผิวจะส่งผลต่อการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค Retello และ Vachet ได้แสดงให้เห็นว่าประจุและความไม่ชอบน้ำจะเป็นตัวกำหนดการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคของทอง Chan และคณะได้รายงานว่า การเข้าสู่เซลล์ของทองจะขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค โดยอนุภาคนาโนของทองที่เขาศึกษาจะอยู่ในช่วง 2-100 นาโนเมตร โดยนำมาเคลือบด้วยยารักษามะเร็ง Herceptin และทดสอบเซลล์เต้านม ซึ่งจะมี ErbB2 เป็น receptor พบว่าขนาดของอนุภาคที่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้มากที่สุดจะอยู่ในช่วง 20-50 นาโนเมตร และเซลล์มีการตายแบบ apoptosis ที่อนุภาคนาโนขนาด 40-50 นาโนเมตร สำหรับการศึกษากายในสิ่งมีชีวิต (in vivo) แบบ passive targeting อนุภาคนาโนของทองสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดี

ในช่วง 10- 100 นาโนเมตร ผู้วิจัยพบว่า อนุภาคนาโนของทองขนาดเล็กจะมีการแพร่อย่างรวดเร็วไปยังกลุ่มก้อนมะเร็ง ขณะที่อนุภาคขนาดใหญ่ยังคงอยู่ใกล้ๆกับบริเวณเส้นเลือด Stellacci และคณะ พบว่าลักษณะลิแกนด์ที่เป็นเปลือกหุ้มจะมีผลต่อการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของอนุภาคนาโนของทอง ซึ่งอนุภาคนาโนของทองที่ติดลิแกนด์บางชนิดจะเป็นพิษต่อเซลล์หากเข้าสู่เซลล์โดยตรง โดยไม่มีการสร้างรูพรุนบนผนังเซลล์ การปรับปรุงคุณสมบัติเชิงผิวด้วยลิแกนด์เพื่อติด targeting หรือ ออแกนเนลที่จำเพาะ Brust และคณะได้ใช้กล้อง TEM ในการศึกษาการปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคนาโนของทองด้วยเปปไทด์ และออแกนเนลอื่นๆ ซึ่งสามารถจำเพาะต่อเป้าหมายได้ Feldheim และคณะได้แสดงให้เห็นการประดิษฐ์อนุภาคนาโนของทอง (20 nm) ที่จำเพาะต่อนิวเคลียส โดยการปรับปรุงพื้นผิวของทองด้วยลำดับเปปไทด์ที่เลียนแบบมาจากลำดับเปปไทด์ของไวรัส [19]

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

- Gold (III) chloride trihydrate ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- Sodium Borohydride ผลิตโดยบริษัท Merck chemicals
- 1-Dodecanethiol ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- Tetraoctylammonium bromide ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- 11-Mercaptoundecanoic acid ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- Chlorotriphenylmethane ผลิตโดยบริษัท Merck chemicals
- Triethylenetetraamine ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- Di-*tert*-butyl dicarbonate ผลิตโดยบริษัท Merck chemicals
- 1-Ethyl-3-(3-diaminopropyl) carbodiimide (EDC) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- N-Hydroxysulfosuccinimide ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- Hydroxybenzotriazole (HOBt) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- Acetic acid ผลิตโดยบริษัท RCI Labscan limited
- Sodium hydroxide ผลิตโดยบริษัท Merck chemicals
- N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) ผลิตโดยบริษัท Merck chemicals
- Triisopropylsilane ผลิตโดยบริษัท Merck chemicals
- Trifluoroacetic acid ผลิตโดยบริษัท RCI Labscan limited
- Sodium chloride ผลิตโดยบริษัท Quality Reagent Chemical

- Sodium sulfate anhydrous ผลิตโดยบริษัท Quality Reagent Chemical
- Peptide ผลิตโดยบริษัท GL Biochem, China
- Toluene ผลิตโดยบริษัท Quality Reagent Chemical
- Chloroform-D1 ผลิตโดยบริษัท Merck chemicals
- Oxalyl chloride ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich
- p-Hydroxybenzyl alcohol บริษัท MERCK chemicals
- 1,8-Octanediol บริษัท MERCK chemicals
- Rhodamine B ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich
- Triethylamine บริษัท MERCK chemicals
- Tetrahydrofuran บริษัท MERCK chemicals
- Dichloromethane ผลิตโดยบริษัท Quality Reagent Chemical
- Ethanol ผลิตโดยบริษัท Quality Reagent Chemical ความบริสุทธิ์ 99.9%
- Hexanes บริษัท MERCK chemicals
- Ethyl acetate บริษัท MERCK chemicals
- Silica gel บริษัท MERCK chemicals
- polyvinyl alcohol (MW 77,000-82,000) ซื้อจากบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

สารเคมีทั้งหมดถูกนำมาใช้ โดยไม่ได้ทำการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เครื่อง Varian NMR-400 MHz

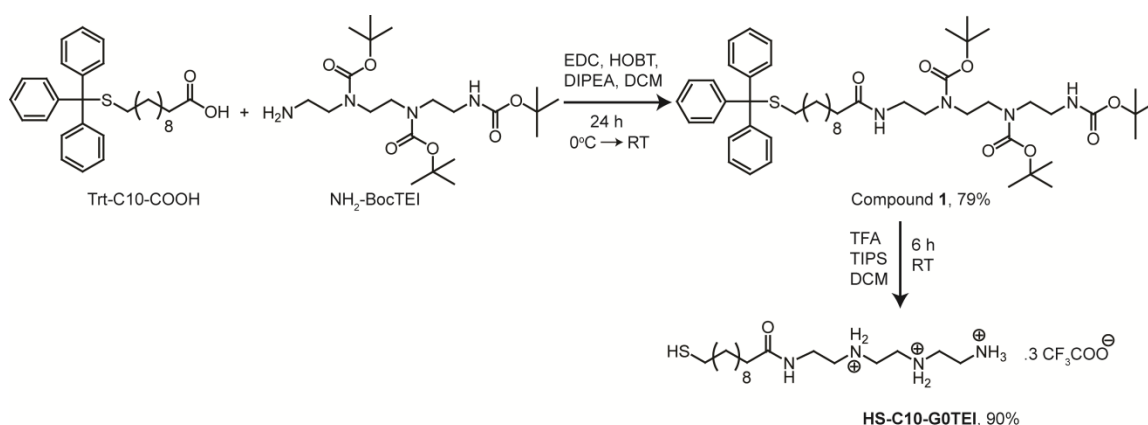
เครื่อง TEM ผลิต โดยบริษัท FEI รุ่น TECNAI G2 20

เครื่อง SEM (LEO VP1450, UK)

เครื่อง Circular Dichroism (Jasco 720 spectrophotometer)

3.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์

สารเคมีทุกอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ หลังจากซื้อมาจากบริษัทตัวแทนจำหน่ายจะถูกใช้เลย โดยไม่ได้ทำการผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมและเปอร์เซ็นต์ผลที่ได้จะถูกคำนวณจาก สารที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ซึ่ง $^1\text{H-NMR}$ จะใช้เครื่อง 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ ในขั้นนี้ของงานวิจัยจะเป็นการสังเคราะห์ลิแกนด์ที่มีประจุบวก HS-C10-G0TEI โดยวิธีการสังเคราะห์แสดงในรูปที่ 3.1 โดยสารตั้งต้นคือ Trt-C10-COOH จะทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{-BocTEI}$ โดยใช้สารที่ช่วยในการสร้างพันธะ นั่นก็คือ EDC, HOBT และ DIPEA หลังจากนั้นก็จะทำการสลายหมู่ป้องกันออกไปโดยใช้เงื่อนไขที่เป็นกรด ของ Trifluoroacetic acid และ TIPS ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์กับ C12-AuNP



รูปที่ 3.1 แสดงวิธีการเตรียมลิแกนด์ที่มีประจุเป็นบวก HS-C10-G0TEI

การสังเคราะห์ลิแกนด์หมายเลข 1

ละลายสาร Trityl protected 11-mercaptoundecanoic acid (Trt-C10-COOH, 0.300 g, 0.64 mmol) ในตัวทำละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน 50 มิลลิลิตรแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติม EDC (0.146 กรัม, 0.77 มิลลิโมล) HOBt.H₂O (0.098 กรัม, 0.64 มิลลิโมล) DIPEA (0.210 มิลลิลิตร, 1.28 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย Trityl protected 11-mercaptoundecanoic acid ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม Boc protected triethylene amine (NH₂-BocTEI, 0.290 กรัม, 0.64 มิลลิโมล) ลงไปอย่างช้าๆ จากนั้นก็ยกขวดก้นกลมออกมาจากอ่างน้ำแข็ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมน้ำลงไป และสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (25 มิลลิลิตร x3) ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เก็บเอาชั้นสารละลายอินทรีย์ แล้วเติมโซเดียมซัลเฟต เพื่อกำจัดน้ำ ทำการระเหยเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออกไปด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน หลังจากนั้นก็ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุซิลิกา ลงไป แล้วชะด้วยสารเอธิลอะซีเตต และนำไปตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีโดยใช้เครื่อง ¹H-NMR ต่อไป

การสังเคราะห์ HS-C10-GOTEI

ละลายสารหมายเลข 1 (0.400 g, 0.449 mmol) ในไดคลอโรมีเทน หลังจากนั้นก็พ่นแก๊ส ไนโตรเจนเป็นเวลาประมาณ 5 นาทีเพื่อไล่แก๊สออกซิเจนออกจากระบบ หลังจากนั้นเติมกรดไตรฟลูออโรอะซีติก (TFA, 1.65 มิลลิลิตร) สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสี ไปเป็นสีเหลือง หลังจากนั้นก็เติม triisopropylsilane (TIPS, 0.485 มิลลิลิตร) และปล่อยให้สารละลายปั่นด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี แล้วก็ตั้งรีแอกชันทิ้งไว้ประมาณ 6 ชั่วโมง ทำการระเหยเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออกไปด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน จากนั้นก็ล้างสารที่ได้ด้วย อีเธอร์ (15 มิลลิลิตร x 3) และเฮกเซน (15 มิลลิลิตร x 3) จากนั้นก็ใช้ high vacuum ดูด เพื่อให้แห้งและนำไปตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีโดยใช้เครื่อง ¹H-NMR ต่อไป โดยสารนี้สามารถนำไปใช้เตรียมอนุภาคนาโนของทองได้

3.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง

3.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง ขนาด 2 นาโนเมตร

ละลาย Hydrogen tetrachloroaurate 0.3275 กรัม ด้วยน้ำ 30 มล. ในขวดก้นกลม ขนาด 500 มล. เติมสารละลาย Tetraoctylammoniumbromide 2.1900 กรัม ในโทลูอิน 80 มล. ทำการปั่นด้วยแท่งแม่เหล็กเติม 1-dodecanethiol 170 มิลลิกรัม และเติม Sodium borohydride 0.3833 กรัม ในน้ำ 25 มล. ปั่นด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชม. หลังจากนั้นแยกเอาเฉพาะชั้นโทลูอินโดย

ใช้กรวยแยก จากนั้นนำชั้นโทลูอินไประเหยสารละลายออกจนแห้ง เติมนเอทานอล 400 มล. ทิ้งไว้จนตกตะกอนในตู้เย็น เก็บเอาส่วนที่ตกตะกอน แล้วทำให้แห้ง C12-AuNPs ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) โดย C12-AuNPs จะถูกนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป (ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์)

3.3.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองที่เคลือบด้วยลิแกนด์ที่มีประจุบวก

อนุภาคนาโนของทองที่เคลือบด้วยลิแกนด์ที่มีประจุบวกจะถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ ด้วยวิธีการการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ (placed-exchange) โดยอนุภาคนาโนของทองที่เตรียมขึ้นมามีหมู่ของ dodecane thiol ห่อหุ้มอยู่ (C12-AuNP) และเราจะทำการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ ซึ่งก็คือ HS-C10-GOTEI (ภาพที่ xxx) ละลาย C12-AuNP 25 มิลลิกรัม ในสารละลายผสมของ DCM : เมทานอล 2:1 (v/v) 1.5 มล. จากนั้นเติมนสารประกอบ HS-C10-GOTEI 105 มิลลิกรัม ซึ่งละลายในผสมของ DCM : เมทานอล 2:1 (v/v) 1.5 มล. ฟันแก๊สไนโตรเจนเข้าไปในระบบ เพื่อไล่แก๊สออกซิเจนที่อาจจะรบกวนปฏิกิริยาได้ ปฏิกิริยาจะถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม. ระเหยเอาตัวทำละลายออกไป แล้วล้างด้วย DCM หลังจากนั้นละลายอนุภาคนาโนของทองที่เตรียมได้ด้วย น้ำ และทำการไดอะไลซิส เพื่อกำจัดลิแกนด์ที่ไม่ติดอยู่กับทองออกไป

3.4 การศึกษาการเกิดอัลฟาเฮลิคส์

เปปไทด์ Ac-W-A-A-D-A-K-A-D-A-A-D-A-A-A-D-A-K-NH₂ ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์และสารละลายนาโนของทอง ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ของ กรดอะซิติก/โซเดียมไฮดรอกไซด์ (5 มิลลิโมลาร์ pH 5) ผสมสารทั้งสองและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วปิเปตใส่ 1-mm คิวเวตต์ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ ของเปปไทด์ circular dichroism ด้วยเครื่อง Spectropolarimeter (Jasco 720) ซึ่งจะให้เครื่องอ่านค่าสเปกตรัมในช่วง 190-250 nm และตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ความเร็วในการสแกนเท่ากับ 20 นาโนเมตร ต่อ นาที response time เท่ากับ 8 วินาที spectral band width เท่ากับ 2 นาโนเมตร สัญญาณที่ได้จะลบออกด้วยสัญญาณจากแบลงค์ (สัญญาณจากสารละลายอนุภาคนาโนของทอง 5 ไมโครโมลาร์)

3.5 การศึกษาการเกิดพันธะโควาเลนต์ของเปปไทด์กับ อนุภาคนาโนของทอง

เปปไทด์ Ac-W-A-A-D-A-K-A-D-A-A-D-A-A-A-D-A-K-NH₂ ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์และสารละลายนาโนของทอง ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ของ กรดอะซิติก/โซเดียมไฮดรอกไซด์ (5 มิลลิโมลาร์ pH 5) ผสมสารทั้งสองและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายของ EDC/ sulfo-NSH ปั่นด้วยแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 15 มิลลิโมลาร์ ลงไป แล้วปิเปตใส่ 1-mm คิวเวตต์ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ ของเปปไทด์ circular dichroism ด้วยเครื่อง Spectropolarimeter (Jasco 720) ซึ่งจะให้เครื่องอ่านค่าสเปกตรัม ในช่วง 190-250 nm และตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ความเร็วในการสแกนเท่ากับ 20 นาโนเมตร ต่อวินาที response time เท่ากับ 8 วินาที spectral band width เท่ากับ 2 นาโนเมตร สัญญาณที่ได้จะลบออกด้วยสัญญาณจากแบล็ก (สัญญาณจากสารละลายอนุภาคระดับนาโนของทอง 5 ไมโครโมลาร์)

3.6 การสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโน

3.6.1 การสังเคราะห์พอลิออกซาเลต

1,8-octanediol (21.96 มิลลิโมล) และ 4-hydroxybenzyl alcohol (5.49 มิลลิโมล) ละลายใน dry tetrahydrofuran (THF) 20 mL ภายใต้สภาวะของแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้น เติม triethylamine (60 มิลลิโมล) อย่างช้าๆ (ทีละหยด) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น เติม Oxalyl chloride (27.45 มิลลิโมล) ซึ่งละลายใน dry THF 25 mL อย่างช้าๆ (ทีละหยด) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ดูภาพที่ X.3) ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดไอของกรตไฮโดรคลอริกจำนวนมาก เพราะฉะนั้น จึงจำเป็นต้องทำปฏิกิริยาในตู้ดูดควัน หลังจากนั้น ปฏิกิริยาจะถูกทิ้งไว้ค้างคืน ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน และพอลิเมอร์ที่ได้จะถูกสกัดโดยใช้ไดคลอโรมีเทน และการตกตะกอนในเฮกเซนเย็น หลังจากนั้นก็นำพอลิเมอร์ที่ได้ไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Gel permeation chromatography (GPC) (Shimadzu LC 20AD toluene column ยี่ห้อ waters) โดยใช้ฟลิสไตรีน เป็นสารมาตรฐาน หลังจากนั้นก็นำไปวัด NMR (400 MHz ^1H NMR spectrometer) เพื่อหาโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์ต่อไป

3.6.2 การเตรียมอนุภาคนาโนโดยวิธีอิมัลชัน

ละลายพอลิออกซาเลตปริมาณ 50 มิลลิกรัม ในสารละลายไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสีย้อมโรดามีน บี (rhodamine B) ความเข้มข้น 0.1 % โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นเฟสของน้ำมัน จากนั้นทำการเติมสารละลายพอลิเมอร์ ลงใน 10% ของสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นเฟสของน้ำ นำสารละลายพอลิเมอร์ผสมที่ประกอบด้วยเฟสของ น้ำและน้ำมันมาทำการ sonicate ด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทำการ homogenize ต่อเป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายคอลลอยด์ หรืออนุภาคนาโนพอลิออกซาเลตที่ต้องการ และเพื่อให้ได้อนุภาคนาโนที่มีความ

สมบูรณ์ นำสารละลายคอลลอยด์ที่ได้ มาทำการเติมลงใน สารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (หรือขึ้นกับพอลิเมอร์ surface stabilizer) ที่ใช้เป็น ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักอีกรอบ และทำการ homogenize อีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที จะได้อนุภาคนาโนพอลิออกซาเลตที่มีความสมบูรณ์มากขึ้น ทำการระเหยสารละลาย ไดคลอโรมีเทนออก และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลต ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำถอดประจุ สองครั้ง ผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วย lyophilizer เก็บผงอนุภาคนาโนและนำไปศึกษาคุณลักษณะด้านต่างๆ ต่อไป

การศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลต

การศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลต ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาทั้งคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพ โดยในการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS) และ Zeta Potential เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิว รูปทรง รูปร่าง การหาขนาด และประจุของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลตที่สังเคราะห์ได้ตามลำดับ ส่วนการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพจะเป็นการศึกษาและทดสอบเกี่ยวกับความเข้ากันได้ทางชีวภาพและทดสอบความเป็นต่อเซลล์ของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลต ตลอดไปถึงการทดสอบการปลดปล่อยยา/สี ของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลต ในสภาวะร่างกายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.4 ที่มีและไม่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในช่วงเวลาต่างๆ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์

การสังเคราะห์ลิแกนด์หมายเลข 1 จากการสังเคราะห์สารและผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าได้สารที่มีลักษณะเหนียวหนืด และไม่มีสี มีน้ำหนัก 0.45 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลได้ เท่ากับ 79%

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.40 (m, 6H, TrtH_{Ar}), 7.30 (m, 6H, TrtH_{Ar}), 7.23 (m, 3H, TrtH_{Ar}), 3.31 (m, 12H, $-\text{CH}_2\text{N}- + -\text{NCH}_2-$), 2.15 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{S}- + -\text{CH}_2\text{CO}-$), 1.48-1.17 (m, 43H, $-\text{CH}_2-$ + $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

การสังเคราะห์ HS-C10-GOTEI จากการสังเคราะห์สารและผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าได้สารที่มีลักษณะเหนียวหนืด และไม่มีสี มีน้ำหนัก 0.286 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลได้ เท่ากับ 90%

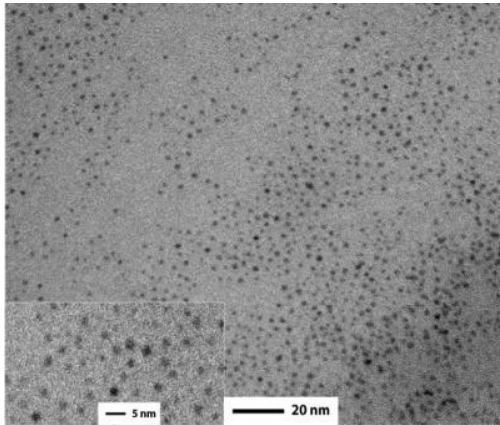
^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 3.39 (br m, 12H, $-\text{CH}_2\text{N}- + -\text{NCH}_2-$), 2.51 (t, 2H, $^3J = 7.44 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{S}-$), 2.15 (br m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 1.56-1.15 (m, 16H, $-\text{CH}_2$).

4.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง

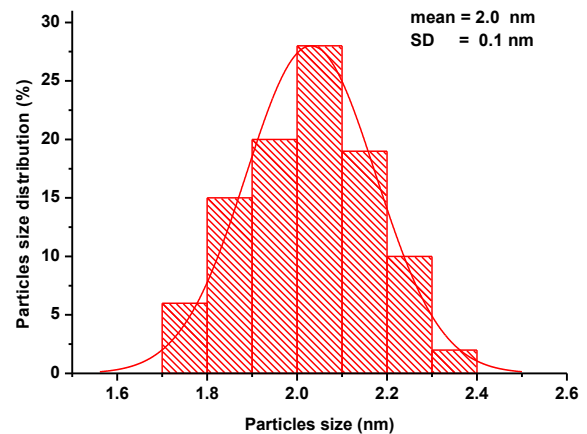
4.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองขนาด 2 นาโนเมตร

ผลการศึกษาลักษณะพื้นฐานของขนาดของแกนกลางของอนุภาคนาโนของทองด้วยเทคนิค TEM ดังแสดงในภาพที่ 4.1 (ก) พบว่า แกนกลางของอนุภาคนาโนของทองที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม และจากการวัดขนาดแกนกลางของอนุภาคนาโนของทอง เพื่อนำไปสร้างความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาค แสดงในภาพที่ 4.1 (ข) พบว่าแกนกลางของอนุภาคนาโนของทองที่เตรียมได้มีขนาดเฉลี่ย 2 ± 0.1 นาโนเมตร ด้วยโปรแกรมอิมเมจเจ (Image J) ซึ่งทำการเลือกตัวแทนอนุภาคมาจำนวน 100 อนุภาค จากขนาดเฉลี่ยของอนุภาคข้างต้น พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hong et al. ซึ่งแกนกลางอนุภาคนาโนของทองที่ได้จากการเตรียมมีขนาดประมาณ 2 นาโนเมตร

(ก)



(ข)

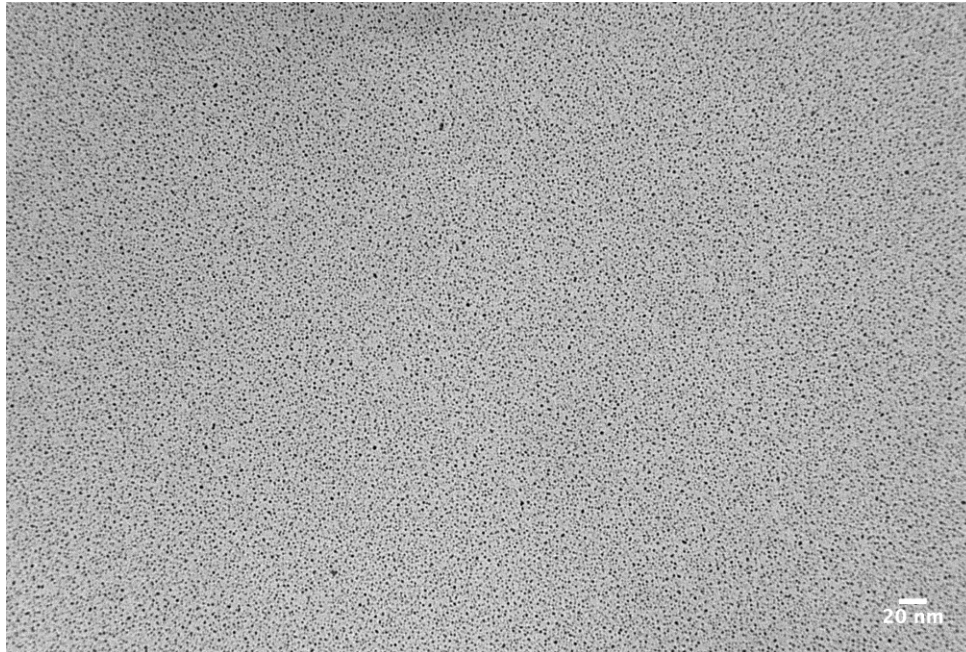


รูปที่ 4.1 (ก) ภาพถ่าย TEM แสดงโครงสร้างทางจุลภาคของส่วนของแกนกลางของอนุภาคนาโนของทอง และ (ข) การกระจายตัวของอนุภาคนาโนของทอง C_{12} -Au ซึ่งการกระจายตัวของอนุภาคนาโนของทองนั้น ได้ทำการเลือกตัวแทนอนุภาคมาจำนวน 100 อนุภาค

4.2.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองที่เคลือบด้วยลิแกนด์ที่มีประจุบวก

ผลการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของขนาดของอนุภาคนาโนของทอง ด้วยเทคนิค TEM ดังแสดงภาพที่ 4.2 พบว่า อนุภาคนาโนของทอง ที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม และจากการวัดขนาดของอนุภาคนาโนของทอง เพื่อนำไปสร้างความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาค พบว่าขนาดของอนุภาคนาโนของทอง ที่เตรียมได้มีขนาดเฉลี่ย 2 ± 0.2 นาโนเมตรด้วยโปรแกรมอิมเมจ (Image J) ซึ่งทำการเลือกตัวแทนอนุภาคมาจำนวน 100 อนุภาค และมีค่าศักย์ซีต้า (Zeta potential) เท่ากับ $+40.6 \pm 1.53$ มิลลิโวลต์ พบว่าศักย์ซีต้าของอนุภาคนาโนของทอง ได้ค่าน้อยกว่า ± 30 มิลลิโวลต์ แสดงว่าอนุภาคนาโนของทอง มีความเสถียร ซึ่งการวัดค่าศักย์ซีต้าเพื่อหาประจุโดยรวมบนผิวของอนุภาคและการกระจายตัวของอนุภาคที่อยู่ในรูปคอลลอยด์ ค่าศักย์ซีต้าจะขึ้นกับค่าพีเอช ซึ่งอนุภาคแขวนลอยจะความเสถียรถ้ามีค่าศักย์ซีต้ามากกว่า $+30$ มิลลิโวลต์ หรือ น้อยกว่า -30 มิลลิโวลต์ [20] เมื่ออนุภาคมีค่าศักย์ซีต้าสูงเคลื่อนตัวเข้าใกล้กันจะทำให้อนุภาคเหล่านั้นเกิดการผลักกัน และส่งผลให้เกิดการกระจายตัวที่ดีของอนุภาค ในทางตรงกันข้ามอนุภาคมีค่าศักย์ซีตาดำจะมีแรงผลักกันน้อยเมื่อเคลื่อนที่เข้าใกล้กันอาจเกิดการเกาะกลุ่มกันและตกตะกอนได้ง่าย ส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของระบบขึ้น และพบว่าขนาดของอนุภาคนาโนของทองที่มีลิแกนด์ติดอยู่ไม่ได้ทำให้ขนาดของอนุภาคนาโนของทองเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu X et al. ที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนของ $Au-DPT_x DDT_{1-x}$ หรือ สังเคราะห์

อนุภาคนาโนของทองโดยใช้ลิแกนด์ ซึ่งอนุภาคนาโนของทองที่เราสังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 2 นาโนเมตร [21]

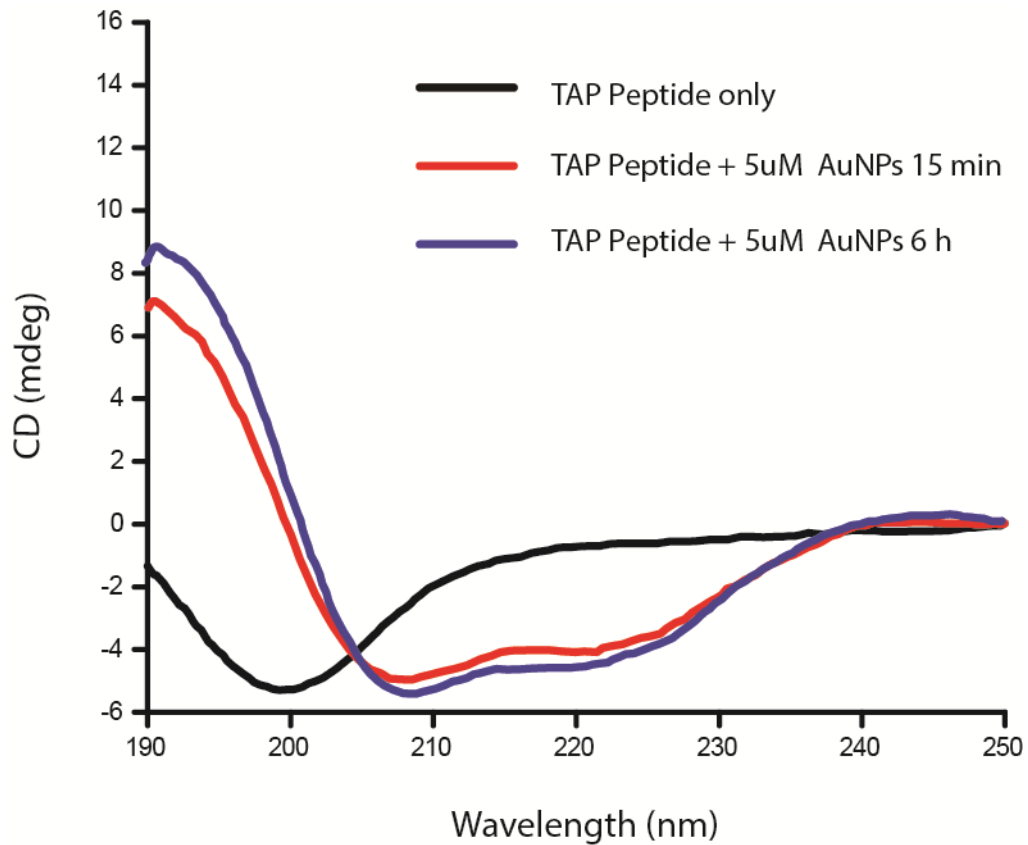


รูปที่ 4.2 แสดงภาพอิเล็กตรอนของอนุภาคระดับนาโนของทองที่มีขนาด 2 นาโนเมตร

4.3 การศึกษาการเกิดอัลฟาเฮลิคส์

ในขั้นแรกศึกษา CD ของสารละลายเปปไทด์เพียงอย่างเดียว โดยละลายเปปไทด์ 15 ไมโครโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ของ กรดอะซิติก/โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 มิลลิโมลาร์ ($\text{pH} = 5$) ได้ผล CD ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งจะสังเกตเห็นพีคที่ประมาณ 200 นาโนเมตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ มีคอนฟอร์เมชันเป็นเกลียวแบบสุ่ม (random coil) ในขั้นต่อมาจึงศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างแบบอัลฟาเฮลิคส์ของเปปไทด์ โดยใช้อนุภาคนาโนเป็นตัวเหนี่ยวนำ โดยใช้อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ผสมกับเปปไทด์ 15 ไมโครโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ของ กรดอะซิติก/โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 มิลลิโมลาร์ ($\text{pH} = 5$) ได้ผล CD ดังรูปที่ 4.3 ที่เวลา 15 นาที ซึ่งจะสังเกตเห็นพีคซึ่งแสดงลักษณะของอัลฟาเฮลิคส์ ที่ประมาณ 208 นาโนเมตร และ 222 นาโนเมตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างแบบอัลฟาเฮลิคส์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ P. Ghosh [22] ที่ใช้อนุภาคของทองที่เคลือบด้วยไลซีน ซึ่งมีประจุบวกเหมือนกัน และเมื่อตรวจวัดค่า CD ที่เวลา 6 ชั่วโมงพบว่า ยังคงเห็นพีคที่ประมาณ 208 นาโนเมตร และ

222 นาโนเมตร เหมือนเดิม แสดงว่าอนุภาคนาโนและเฮลิคซ์เปปไทด์มีความเสถียร และคงตัวอยู่ได้เป็นเวลานาน



รูปที่ 4.3 แสดงภาพ CD สเปกตรัม ของเปปไทด์ อนุภาคนาโนของทอง/เปปไทด์ ที่เวลา 15 นาที และ 6 ชั่วโมง

4.4 การศึกษาการเกิดพันธะโควาเลนต์ของเปปไทด์กับ อนุภาคนาโนของทอง

หลังจากที่ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดอัลฟาเฮลิคซ์แล้ว ขั้นตอนต่อไปเป็นการลอคเปปไทด์ไว้บนอนุภาคนาโน ผ่านพันธะโควาเลนต์ ซึ่งจะกระทำผ่านปฏิกิริยาของ 1-ethyl-3-(3-diaminopropyl) carbodiimide และ N-hydroxysulfosuccinimide แล้วทำการเติม โซเดียมคลอไรด์ 15 มิลลิโมลาร์เพื่อทำลายอันตรกิริยาแบบไฟฟ้าสถิตย์ ระหว่างอนุภาคนาโนและอัลฟาเฮลิคซ์ แล้วทำการตรวจวัด CD ปรากฏว่าไม่พบสัญญาณของ อัลฟาเฮลิคเปปไทด์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่สามารถลอคเปปไทด์บนอนุภาคนาโนของทองได้

ในขณะเดียวกันกลุ่มวิจัยของเรายังได้สนใจศึกษาพัฒนาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งโดยเฉพาะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่เสถียร และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาของ

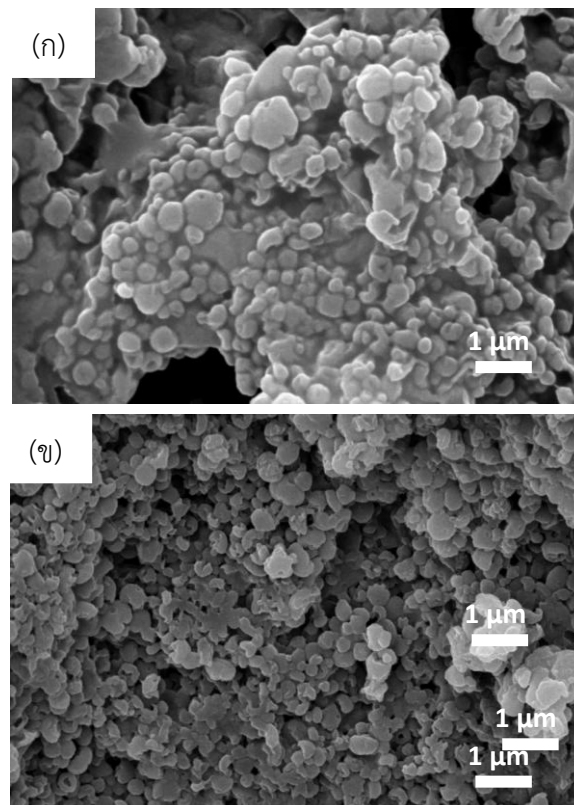
อนุภาคนาโนอีกด้วยซึ่งได้เคยรายงานความก้าวหน้าไปในรายงานรอบ 1 ปี และ 18 เดือน ในปัจจุบัน อนุภาคนาโนได้รับความสนใจอย่างมาก โดยเฉพาะในงานวิจัยทางการแพทย์ เพราะสามารถใช้เป็นส่วนการนำส่งยา (drug delivery) การพัฒนาอนุภาคนาโน เพื่อให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการนั้น จำเป็นต้องมีการพัฒนาพื้นผิวของอนุภาคนาโน โดยเฉพาะการควบคุมคุณสมบัติในเชิงเคมีของอนุภาคนาโน ทั้งนี้การพัฒนาอนุภาคนาโนเพื่อใช้เป็นตัวนำส่งยา ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในหลายๆ กลุ่มวิจัย เพราะอนุภาคนาโนมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตร (surface-to-volume ratio) ที่สูงและคุณสมบัติที่โดดเด่นอีกอย่างหนึ่งคือ ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยยา การควบคุมการปลดปล่อยยาอย่างแม่นยำ ทั้งตำแหน่งที่ปลดปล่อย และเวลาในการปลดปล่อยยา ได้รับการพัฒนาอย่างมากในปัจจุบัน เพราะการนำส่งยาไปยังเป้าหมายที่ต้องการ และสามารถปลดปล่อยยาในเวลาที่ต้องการ จะทำให้ประสิทธิภาพของยานั้นเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งงานวิจัยทางการแพทย์การควบคุมการปล่อยยาจำเป็นอย่างยิ่ง ที่ต้องอาศัยการออกแบบ และกำหนดคุณสมบัติของวัสดุที่ใช้เป็นตัวนำส่งเพื่อให้ตอบสนองต่อสภาวะที่ต้องการจะปลดปล่อยยา โดยในเชิงอุดมคติ ระบบนำส่งยาจะต้องมีความเสถียร แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะหนึ่ง หรือเมื่อมีตัวช่วยในการปลดปล่อยยา ตัวนำส่งนั้น ต้องตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อสภาวะนั้น แล้วยาจะสามารถหลุดออกมาจากตัวนำส่งได้อย่างรวดเร็ว กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือตัวนำส่งจะต้องตอบสนองต่อสิ่งเร้าได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการที่จะสร้างระบบนำส่งยาที่ดี จะต้องอาศัยความสามารถในการออกแบบวัสดุ โดยเฉพาะการควบคุมคุณสมบัติทางเคมีของวัสดุนาโน เพื่อให้อนุภาคนั้นตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่ต้องการ ทั้งภายในและภายนอกร่างกายได้

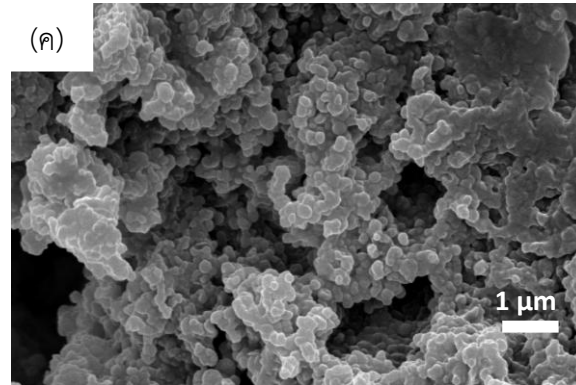
ในงานส่วนนี้ เราได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการปลดปล่อยยา โดยอนุภาคนาโนซึ่งประกอบไปด้วยพอลิออกซาเลต พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และ สีย้อม จะถูกขึ้นรูปเป็นอนุภาคนาโน โดยวิธีอิมัลชัน พอลิออกซาเลตที่ใช้ จะสามารถเกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดไดออกซีเพนไดโอน ซึ่งจะไม่เสถียร แล้วจะสลายไปเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในที่สุด ทั้งนี้หลังจากเกิดปฏิกิริยา อนุภาคนาโนจะเกิดการสลายตัว ทำให้สีย้อม ที่ฝังตัวอยู่ในอนุภาคจะถูกปลดปล่อยออกมา ภายใต้สภาวะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าในบางโรค เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก และแผลที่อักเสบ จะมีปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงกว่าปกติ โดยจุดเด่นของงานวิจัยชิ้นนี้ก็คือการใช้สารที่หลั่งออกมาจากแผล นั่นก็คือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นตัวปลดปล่อยยาที่ฝังตัวอยู่ในอนุภาคนาโน เมื่อใดก็ตามที่เกิดการอักเสบขึ้น แผลที่อักเสบจะหลั่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมา แล้วไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกหลั่งออกมานั้นก็จะไปทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโน นั่นก็คือพอลิออกซาเลตซึ่งจะนำไปสู่การสลายตัวของอนุภาคนาโน และการ

ปลดปล่อยยาออกมาจากอนุภาคนาโน การสังเคราะห์และการศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลตครั้งนี้ ได้ทำการหาเงื่อนไขในการสังเคราะห์ โดยทำการปรับเปลี่ยนปัจจัยที่มีผลต่อการฟอร์มอนุภาค ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของ surface stabilizer, ชนิดและขนาดของแรงที่ทำให้เกิดการฟอร์มอนุภาค ตลอดจนการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลต เพื่อให้เหมาะแก่การใช้งานและนำส่งยา/ปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

4.4 การสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโน

surface stabilizer ซึ่งอยู่ในเฟสของน้ำ มีความสำคัญอย่างมาก ต่อการเตรียมอนุภาคนาโน โดยวิธีอิมัลชัน ซึ่งในงานนี้ได้ศึกษาผลของ surface stabilizer ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ ผลการสังเคราะห์ อนุภาคนาโนพอลิออกซาเลตที่เตรียมโดยใช้ PVA เป็น surface stabilizer ด้วยวิธีอิมัลชันแบบ oil in water แสดงในภาพที่ 4.4 ผลการทดลองพบว่า อนุภาคนาโนพอลิออกซาเลตมีขนาดเล็กลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PVA จาก 5%wt, 10%wt และ 20%wt ตามลำดับ แต่อนุภาคที่สังเคราะห์ได้ ยังมีการเกาะกันค่อนข้างมาก เนื่องจาก PVA มีคุณสมบัติที่เป็นไฮโดรฟิลิก และสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดี แม้ว่าการสังเคราะห์ครั้งนี้จะได้อนุภาคที่มีขนาดอยู่ในระดับนาโน แต่การเกาะกลุ่มกันของอนุภาคจะก่อให้เกิดปัญหาในการใช้งานในอนาคตได้ ปัญหานี้จึงจำเป็นต้องได้รับการแก้ไขและพัฒนา





รูปที่ 4.4 ลักษณะพื้นผิวของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลตที่เตรียมโดยใช้ PVA เป็น surface stabilizer ด้วยวิธีอิมัลชันแบบ oil in water ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดย (ก) 5%wt (ข) 10%wt และ (ค) 20%wt

การสังเคราะห์อนุภาคในระดับนาโนเมตร ปัญหาและอุปสรรคประการหลักๆ ที่พบคือ อนุภาคนาโนมักจับกลุ่มรวมตัวกัน เป็นผลมาจากความไม่เสถียรของอนุภาค ดังนั้นในการครั้งนี้ จึงมีการปรับปรุง และ แก้ปัญหาจากการสังเคราะห์ โดยการเติมสารละลายประเภท Detergent ซึ่งจะทำหน้าที่ในการลดพลังงาน พื้นผิวของอนุภาค และเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มและการรวมตัวกันของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลต สารละลายที่ใช้คือ sodiumdodecyl sulfate (SDS) ซึ่งมีผลการทดลอง แสดงในรูปที่ 4.5 โดยอนุภาคที่ สังเคราะห์ได้โดยวิธีการใช้ สารลดแรงตึงผิวซึ่งก็คือ SDS ร่วมกับ PVA พบว่าได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กลง และ พบว่าเมื่อมีปริมาณของ SDS เพิ่มขึ้นจะทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง กล่าวคือเมื่อใช้ SDS เท่ากับ 0%wt, 0.5%wt, 1% wt, 2%wt และ 4%wt จะได้อนุภาคที่มีขนาด เท่ากับ 285, 275, 266, 191 และ 80 นาโนเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) อนุภาคที่ได้ไม่พบว่ามีเกาะกันเหมือนดัง กรณีที่ไม่มีสารลดแรง ตึงผิว ซึ่งสาเหตุ ที่อนุภาคมีขนาดเล็กลง และไม่เกาะกันนี้น่าจะมาจาก 2 ปัจจัยหลักที่เคลือบอนุภาคไว้ นั้น ก็คือ

1. ค่าศักย์ซีตาของอนุภาคมีค่าสูง จากการวัดค่าศักย์ซีตาของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ มีค่าดังแสดง ในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีประจุที่สูงทำให้ เกิดแรงผลักกันทางไฟฟ้าสถิตย์ ทำให้ อนุภาคไม่เกิดการเกาะกลุ่มรวมกัน ทั้งนี้ เพราะแต่ละอนุภาคต่างก็มีประจุที่เหมือนกันทำให้เกิดแรงผลักกัน ขึ้น จึงทำให้ไม่เกิดการรวมตัวกันขึ้น ซึ่งปัจจัยนี้มีความสำคัญต่อการกระจายตัวของอนุภาคนาโน เปรื่องจาก อนุภาคนาโนจะมีขนาดเล็ก ทำให้มีพลังงานพื้นผิวสูง ซึ่งโดยทั่วไประบบจะเกิดปรากฏการณ์ที่จะลด พลังงานพื้นผิวลง ซึ่งนำไปสู่การเกาะรวมกันให้มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ในกรณีที่อนุภาคมีประจุการเกาะรวมกัน จะเกิดขึ้นได้ยากเนื่องจากมีแรงผลักระหว่างประจุ

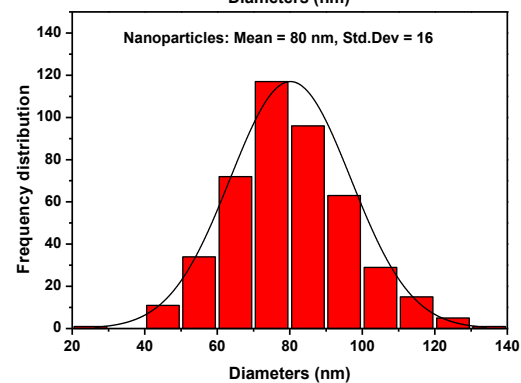
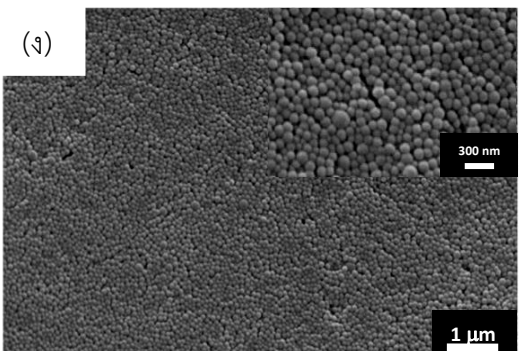
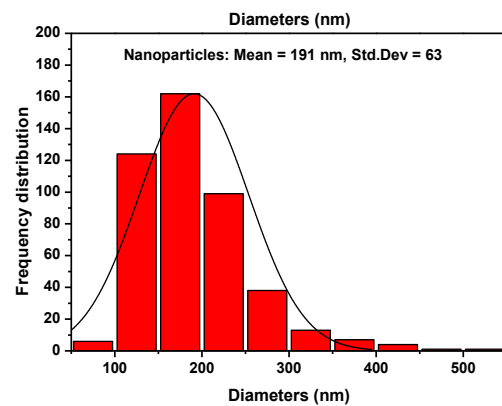
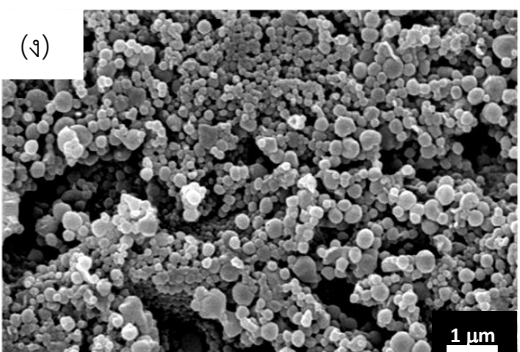
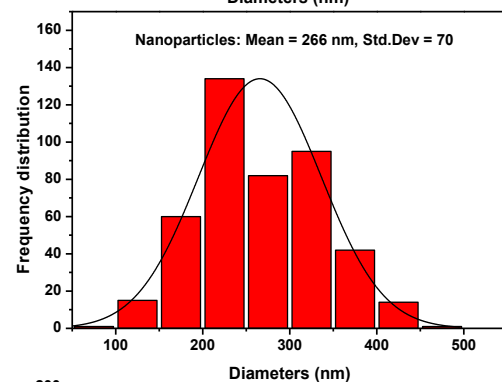
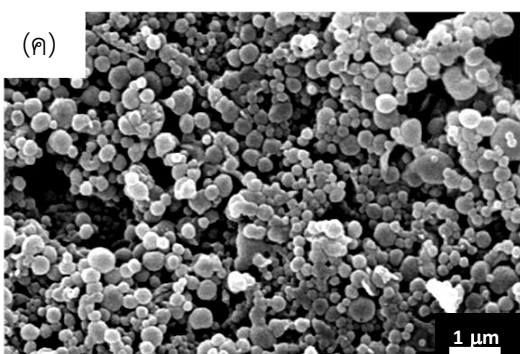
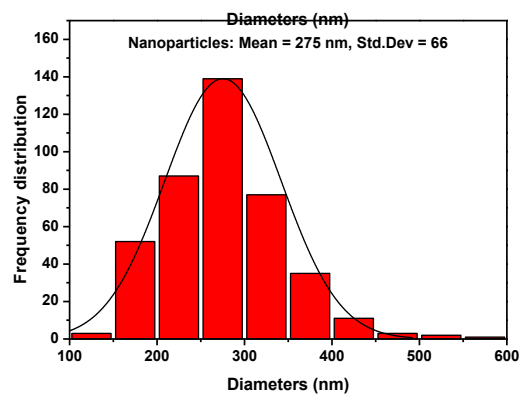
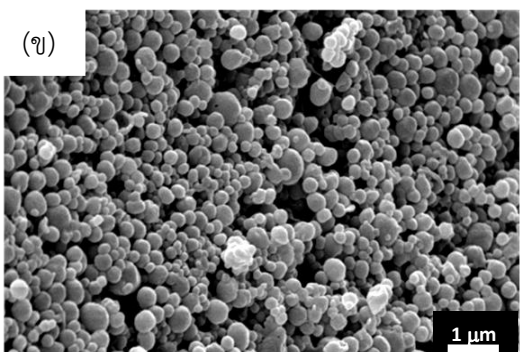
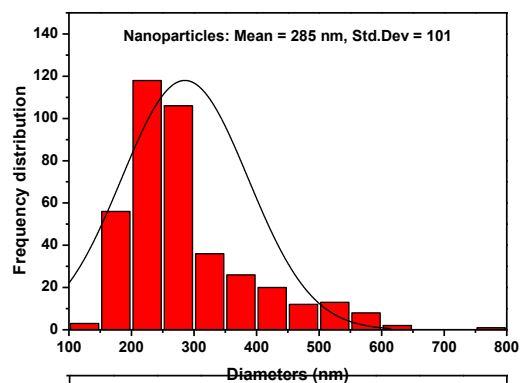
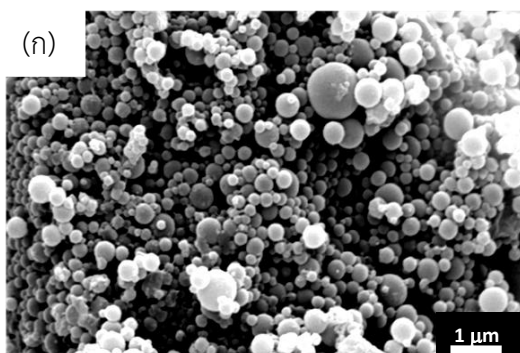
ตารางที่ 1 แสดงค่าศักย์ซีตาและขนาดของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้

อนุภาคนาโน	ค่าศักย์ซีตา (mV)	ขนาดของอนุภาค (nm)
SDS-0-NPs	-21.9 ± 1.2	285 ± 101
SDS-0.5-NPs	-20.3 ± 1.1	275 ± 66
SDS-1-NPs	-23.5 ± 0.7	266 ± 70
SDS-2-NPs	-24.7 ± 1.1	191 ± 63
SDS-4-NPs	-25.1 ± 0.9	80 ± 16

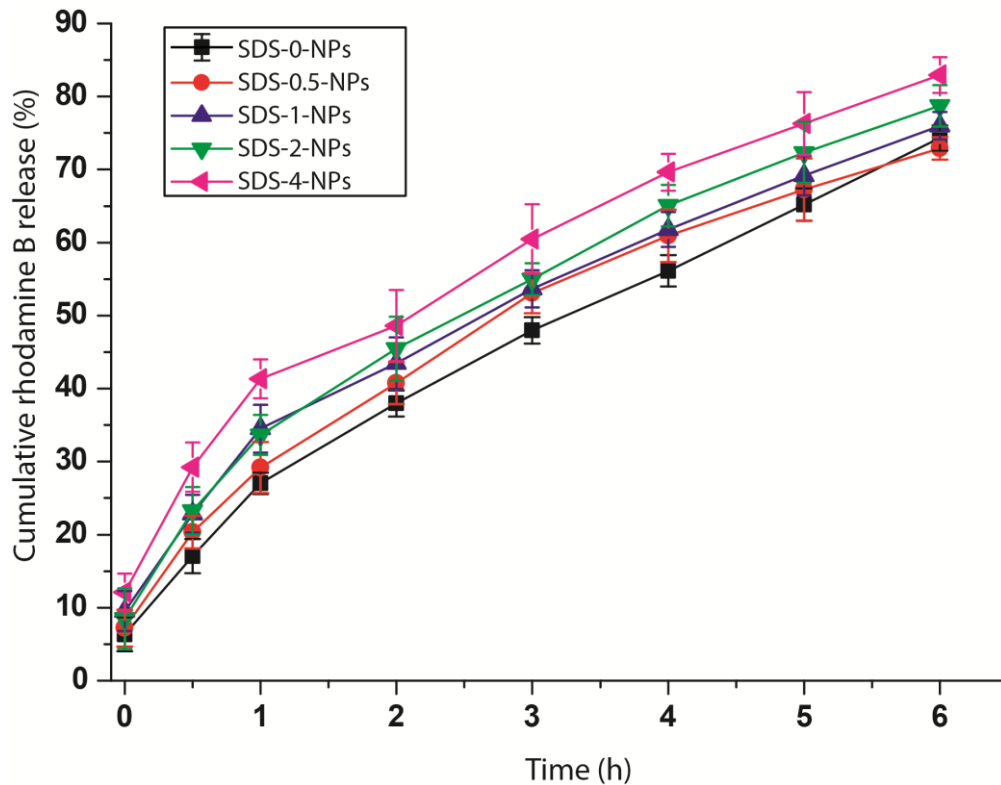
2. สารเคลือบที่เคลือบอนุภาคไว้นั้นก็คือ PVA โดยพอลิเมอร์ จะเป็นตัวขวางกั้นไม่ให้อนุภาคเกิดการรวมตัวกัน ซึ่งจากผลการทดลอง จะเห็นว่าผลของประจุน่าจะมีผลมากกว่า

หลังจากที่หาเงื่อนไขที่เหมาะสมที่สังเคราะห์อนุภาคที่มีขนาดอยู่ในระดับนาโนแล้ว ขั้นตอนต่อไปจะศึกษาการปลดปล่อยยา ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการใช้อนุภาคนาโนเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวนำส่งยา และงานวิจัยในส่วนถัดมาเป็นการศึกษาการปลดปล่อยยาของอนุภาคนาโนพอลิออกซาลेट โดยมี rhodamine B ซึ่งเป็น fluorescence dye ทำหน้าเป็นยาจำลอง ภายในหลอดทดลอง (in vitro) ในสภาวะเลียนแบบร่างกาย ที่อุณหภูมิ 37°C และ pH 7.4 ซึ่งเงื่อนไขต่างๆ ในการสังเคราะห์ ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 4.6

จากผล การทดลองการปลดปล่อยยาพบว่า อนุภาคที่มีปริมาณ SDS มากที่สุดจะปลดปล่อยยาได้ในอัตราที่เร็วที่สุดทั้งนี้ ก็อาจเกิดเนื่องมาจากอนุภาคที่มี SDS สูงจะมีขนาดเล็กที่สุด ซึ่งสาเหตุที่มีขนาดเล็กก็ได้อภิปรายไว้ก่อนหน้านี้แล้ว โดยอนุภาคมีขนาดเล็กทำให้มีพื้นที่ผิวสูง และมีพื้นที่สัมผัสกับมีเดียได้สูงกว่า ทำให้ยาปลดปล่อยออกมาได้ดีกว่า และอีกเหตุผลหนึ่งก็คือถ้ามีขนาดเล็ก ระยะทางที่ยาเคลื่อนที่ออกมาผ่านกระบวนการแพร่ จะเกิดได้เร็วกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ อีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลก็คือผลของสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคจะทำให้ยาสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ อนุภาคได้ดีขึ้น



รูปที่ 4.5 ลักษณะพื้นผิวของอนุภาคนาโนพอลิออกซาเลตที่เติมสารละลาย SDS ที่ ความเข้มข้น ก) 0%wt ข) 0.5%wt ค) 1% wt ง) 2%wt และ จ) 4%wt



รูปที่ 4.6 การปลดปล่อยยาของอนุภาคระดับนาโนที่มีองค์ประกอบของ SDS ที่ ความเข้มข้น 0%wt, 0.5%wt, 1% wt, 2%wt และ 4%wt

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าอนุภาคนาโนมีความสำคัญต่อการพัฒนางานทางด้านการรักษาโรคมะเร็ง ไม่ว่าจะเป็นการใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำเปปไทด์ให้เกิดโครงสร้างแบบทุติยภูมิ แบบอัลฟาเฮลิกซ์ เพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการจับกับโปรตีน หรือใช้อนุภาคนาโนในการขนส่งยาเพื่อใช้รักษามะเร็ง

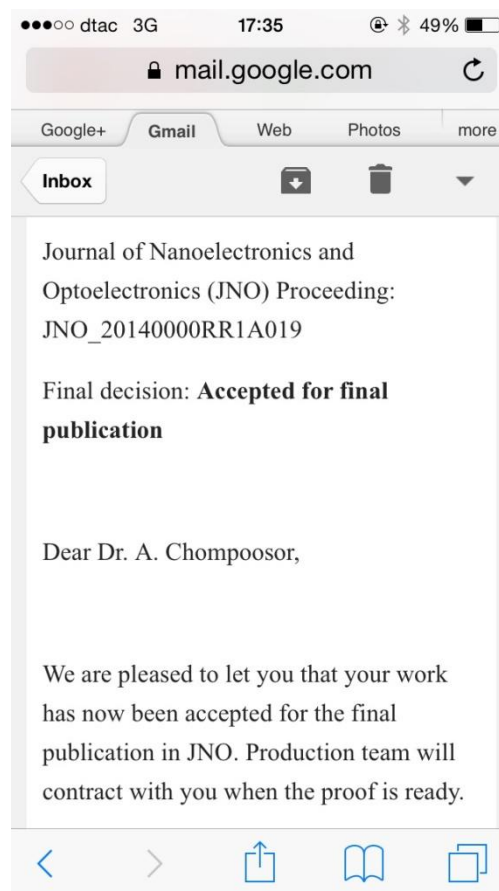
บทที่ 5

สรุปผลงานวิจัย

ในการพัฒนางานวิจัยทางด้านนาโนเทคโนโลยีเพื่อใช้อนุภาคระดับนาโนในการป้องกันและรักษา มะเร็งมีความสำคัญอย่างมาก ซึ่งในแนวทางป้องกันการเกิดโรคมะเร็งโดยแนวทางของอันตรกิริยาของเปปไทด์-โปรตีนมีความน่าสนใจอย่างมากในการศึกษาและพัฒนา โดยอนุภาคนาโนที่มีประจุบวกที่สังเคราะห์ขึ้นนี้มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เปปไทด์ ที่มีประจุลบมาจับผ่านอันตรกิริยาแบบไฟฟ้าสถิตย์ ซึ่งผลจาก CD พบว่าอัลฟาเฮลิคซ์ที่เกิดขึ้นสามารถคงอยู่ได้ถึง 6 ชั่วโมง แต่ปัญหาที่พบก็คืออันตรกิริยานี้จะไม่เสถียรในสถานะที่มีเกลือ อีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการพัฒนางานด้านการรักษาโรคมะเร็งก็คือ การพัฒนาวิธีการเตรียมอนุภาคนาโนให้มีขนาดพอเหมาะต่อการนำส่ง และมีความเสถียร และที่สำคัญสามารถปลดปล่อยยาได้ดี ก็มีความน่าสนใจ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงกลยุทธ์ในการเตรียมอนุภาคที่มีความเสถียรและมีขนาดที่เหมาะสมคือ 80 นาโนเมตรและ ปลดปล่อยยาที่ดี ซึ่งเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าแนวทางการพัฒนางานวิจัยเหล่านี้ยังสามารถที่จะทำต่อยอด เพื่อที่จะให้สามารถนำ นาโน มาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในอนาคตได้

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ลงในวารสาร **Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics** ภายใต้ชื่อเรื่อง “The Role of Anionic Stabilizer on the Formation of Polyoxalate Nanoparticles: In Vitro Release and Cytotoxicity of Polyoxalate Nanoparticles”



เอกสารอ้างอิง

- [1] Eustis S., El-Sayed M. A. **Chem. Soc. Rev.** 2006, 35, 209-217.
- [2] Faraday M. **Philos. Trans. R. Soc. London.** 1857, 147, 145-181.
- [3] Tomar A., Garg G. **Glob. J. Pharmacol.** 2013, 7, 34-38.
- [4] Jain P. K., El-Sayed, I. H., El-Sayed, M. A. **Nanotoday** 2007, 2, 18-29.
- [5] Perrault S. D., Walkey C., Jennings T., Fischer H. C., Chan W. C. **Nano Lett.** 2009, 9, 1909-1915.
- [6] Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., Chan, W. C., **Nano Lett.** 2006, 6, 662-668.
- [7] Daniel, M. C., Astruc, D. **Chem. Rev.** 2004, 104, 293-346.
- [8] Jain P. K., Huang X., El-Sayed I. H., El-Sayed M. A. **Acc. Chem. Res.** 2008, 41, 1578-1586.
- [9] Kelly K. L., Coronado E., Zhao L. L., Schatz G. C. **J. Phys. Chem. B** 2003, 107, 668-677.
- [10] Link, S., El-Sayed M. A. **Int. Rev. Phys. Chem.** 2000, 19, 409-453.
- [11] Brust M., Wlaker M., Bethell D., Schiffrin D. J., Whyman R. **J. Chem. Soc. Chem. Comm.** 1994, 7, 801-802.
- [12] Tomar A, Garg G. **Glob. J. Pharmacol.** 2013, 7, 34-38.
- [13] Templeton A. C., Wuelfing M. P., Murray R. W. **Acc. Chem. Res.** 2000, 33, 27-36.
- [14] Verma A., Nakade H., Simard J. M., Rotello V. M. **J. Am. Chem. Soc** 2004, 126, 10806-10807.
- [15] Langer R. **Nature** 1998, 392, 5-10.
- [16] Allen T. M., Cullis P. R., **Science** 2004, 303, 1818-1822.

- [17] อรุณศรี ปรีเปรม, อีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง, ปราโมทย์ มหคุณากร. **นาโนเทคโนโลยีกับสุขภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2555 หน้า 51-102.
- [18] Byrne J. D., Betancourt T., Brannon-Peppas L. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2008, 60, 1615–1626.
- [19] Trivedi N., Patel N., Upadhyay U. M., Shah V. **Pharmacie Globale (IJCP)** 2012, 6(01).
- [20] พิศิษฐ์ สิงห์ใจ. การวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนโดยใช้เครื่อง DLS และ Zeta Potential Sizer. **วารสารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่** 2551, 2, 148-153.
- [21] Liu X., Atwater M., Wang J. Huo Q. **Colloids Surf B Biointerfaces** 2007, 58, 3-7.
- [22] Ghosh, P. S.; Han, G.; Erdogan, B.; Rosado, O.; Rotello, V. M. **J. Pept. Sci.** 2008, 14, 134-138.