



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

อนุภาคนาทองที่มีเดนดรอนเป็นตัวเคลือบและช่วยพยุงนาโนแคปซูลเพื่อการนำส่งยา
(Gold nanoparticle with dendritic monolayers to stabilize nanocapsules for drug delivery)

โดย

รศ.ดร. อภิวัฒน์ ชมภูสอ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

พฤษภาคม 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

อนุภาคนาโนทองคำที่มีเดนดรอนเป็นตัวเคลือบและช่วยพยุงนาโนแคปซูลเพื่อการนำส่งยา
(Gold nanoparticle with dendritic monolayers to stabilize nanocapsules for drug delivery)

ผู้วิจัย

รศ.ดร. อภิวัฒน์ ชมภูสอ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG6180272

ชื่อโครงการ: อนุภาคนาโนทองที่มีเดนดรอนเป็นตัวเคลือบและช่วยพุงนาโนแคปซูลเพื่อการนำส่งยา

ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร. อภิวัฒน์ ชมภูสอ

ต้นสังกัด: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

อีเมล: apiwat@ru.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (ตั้งแต่ กรกฎาคม 2561 ถึง พฤษภาคม 2563)

บทคัดย่อ:

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบนำส่งยาที่ประกอบไปด้วยไขมันเป็นแกนกลาง และเคลือบด้วยอนุภาคนาโนทองที่มีลิแกนด์เป็นเดนดรอน เพื่อนำไปใช้ในการรักษามะเร็ง อนุภาคนาโนทองจะใช้เป็นตัวเคลือบ เพื่อช่วยให้นาโนแคปซูลมีเสถียรภาพมากขึ้น โดยอนุภาคจะอยู่ระหว่างเฟสของไขมันกับเฟสของน้ำ และช่วยเพิ่มการเข้าสู่เซลล์ได้ โดยในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์อนุภาคทองที่เคลือบด้วยลิแกนด์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่ปลาย และศึกษาสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนทองโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าที่สภาวะเงื่อนไขที่เหมาะสมจะได้อนุภาคที่มีลักษณะกลม และมีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 13 นาโนเมตร มีความเสถียรไม่ตกตะกอน เมื่อเคลือบด้วยลิแกนด์ที่มีหมู่ปลายเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก พบว่าอนุภาคนาโนทองมีความเสถียรที่สูงมาก สามารถทำให้แห้งแล้วละลายน้ำได้หลายครั้ง โดยไม่สูญเสียเสถียรภาพของอนุภาคนาโนทอง หลังจากนั้นจึงนำอนุภาคนาโนทองไปสร้างพันธะกับแอนติบอดี พบว่าสามารถใช้ตรวจวัดแบคทีเรียจากอาหารได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ชนิดนี้ มีประโยชน์ในการใช้งานเป็นตัวเคลือบทองที่เสถียรและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการติดกับสารอื่นๆ เพื่อให้อนุภาคนาโนทองสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลายยิ่งขึ้น

คำหลัก: อนุภาคนาโนทอง, นาโนแคปซูล, เดนดรอน, การนำส่งยา

Abstract

Project Code: MRG6180272

Project Title: Gold nanoparticle with dendritic monolayers to stabilize nanocapsules for drug delivery

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Apiwat Chompoosor

Affiliation: Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University

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

Project Period: 2 years (from July 2018 to May 2020)

Abstract:

In this work, we aim to develop drug delivery systems with an oil core and coated with a dendritic monolayer gold nanoparticle for using as cancer therapy. The gold nanoparticle is used to stabilize and increase a stability of the nanocapsules. The gold nanoparticle is located between an oil phase and an aqueous phase and eventually enhanced cellular uptake of nanocapsule. In this work, the gold nanoparticles were synthesized using Turkevich method. Then the gold nanoparticle was coated with carboxylic terminated ligand. The morphology of nanoparticle was analyzed using TEM and dynamic light scattering. The resultant gold nanoparticle had a spherical shape with a ranges of 13 nm. The gold nanoparticle had a high stability and no sign of precipitation. After coated with the carboxylic terminated ligands, an excellent stability was observed. The nanoparticles can be freezed and thawed many times without losing the characteristics of the nanoparticles. Thereafter the nanoparticles can be further attached to antibody and can be used to detect bacteria from foods. This result indicated that the synthesized ligands hold a promising prospect with high stability and further attach with other functional materials, making them multifunctional nanomaterials.

Keywords: Gold nanoparticles, nanocapsule, dendron, drug delivery

บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

ปัจจุบันการรักษามะเร็งโดยวิธีทางเคมีบำบัดยังมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่าง รวมทั้งการเข้าสู่เซลล์ที่ต่ำและ การเลือกเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย อนุภาคนำส่งที่มีประจุเป็นลบ และอนุภาคนำส่งที่มีประจุเป็นกลาง จะมีความเป็นพิษต่ำ แต่การเข้าสู่เซลล์จะน้อยทำให้การนำส่งยาไปในเซลล์น้อย ส่งผลให้ประสิทธิภาพลดต่ำลง ในขณะที่เดียวกันอนุภาคนำส่งที่มีขนาดใหญ่ จะทำให้มีความเสถียรต่ำ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่มีความเสถียรสูง โดยการเคลือบด้วยลิแกนด์ที่มีหมู่ปลายเป็นกรดคาร์บอกซิลิก

จากผลการวิจัยพบว่าอนุภาคนาโนทองที่เคลือบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก จะมีความเสถียรสูง สามารถเก็บแบบผงได้ และสามารถละลายกลับได้ดี นอกจากนี้หมู่ปลายของลิแกนด์ยังสามารถต่อกับแอนติบอดีและสามารถนำไปใช้เป็นเซนเซอร์ในการตรวจวัดแบคทีเรียจากอาหารได้

จากผลการดำเนินงานโครงการ สามารถสร้างองค์ความรู้ใหม่ (Journal paper) โดยผลงานวิจัยกำลังอยู่ในระหว่างการเตรียมบทความเพื่อส่งตีพิมพ์ นอกจากนี้ยังได้นำองค์ความรู้ใหม่ไปใช้เป็นตัวอย่างในการเรียนการสอนในวิชา CMS2202 หัวข้อเรื่องการนำเคมีอินทรีย์ไปประยุกต์ใช้ในสาขาวัสดุศาสตร์และนาโนเทคโนโลยี ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
บทสรุปผู้บริหาร.....	III
สารบัญ.....	IV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 นาโนเทคโนโลยีกับการนำส่งยา.....	3
2.2 อนุภาคนาโนกับระบบนำส่งยา.....	3
2.3 นาโนแคปซูล.....	6
2.4 อนุภาคนาโนทองกับการนำส่งยา.....	9
2.5 นาโนแคปซูลสำหรับการนำส่งยา.....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	15
3.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง	16
3.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์.....	16
3.4 การเตรียมอนุภาคนาโนทองที่เคลือบด้วยคาร์บอกซิลิกเป็นหมู่ปลาย.....	18
3.5 การตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนอนุภาคนาโนทอง	19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	21
4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง.....	21
4.2 การสังเคราะห์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์	23
4.3 การแลกเปลี่ยนคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์บนอนุภาคนาโนทอง.....	26
4.4 การตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนอนุภาคนาโนทอง.....	31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	34
เอกสารอ้างอิง.....	35
ภาคผนวก.....	38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบัน “นาโนเทคโนโลยี” มีความสำคัญอย่างยิ่ง ในการพัฒนาการนำส่งยา หรือสารสำคัญ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการรักษาเพิ่มมากขึ้น โดยอาศัยตัวนำส่งระดับนาโน (Nanocarrier) เป็นตัวนำพา ยา หรือสารสำคัญเข้าสู่เซลล์ โดยผ่านกลไกต่าง ๆ เพื่อไปยังอวัยวะเป้าหมาย กระบวนการสังเคราะห์ตัวนำส่งหรือการเตรียมอนุภาคนาโน (Nanoparticles) จึงเป็นสิ่งที่ควรจะได้ รับการพัฒนา เพื่อให้ได้ระบบนำส่งที่มีประสิทธิภาพที่ดี ปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพการนำส่งลดน้อยลงคือ การเข้าสู่เซลล์ที่ต่ำ ส่งผลให้ยาที่ติดกับระบบนำส่งอาจจะถูกปลดปล่อยออกมาน้อย ดังนั้นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการออกแบบวัสดุเพื่อการนำส่งยา คือการออกแบบระบบนำส่งให้มีความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ได้ดี

ปัจจุบันการรักษามะเร็งโดยวิธีทางเคมีบำบัดยังมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่าง รวมทั้งการเข้าสู่เซลล์ที่ต่ำและ การเลือกเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย อนุภาคนำส่งที่มีประจุเป็นลบ และอนุภาคนำส่งที่มีประจุเป็นกลาง จะมีความเป็นพิษต่ำ แต่การเข้าสู่เซลล์จะน้อยทำให้การนำส่งยาไปในเซลล์น้อย ส่งผลให้ประสิทธิภาพลดต่ำลง ในขณะเดียวกันอนุภาคนำส่งที่มีประจุเป็นบวกถึงแม้ว่าจะเข้าสู่เซลล์ได้ดี แต่ก็มี ความเป็นพิษสูง ซึ่งถ้าอนุภาคนำส่งที่มีประจุเป็นบวกไม่มีการเลือกสรรในการเข้าสู่เซลล์ จะทำให้เกิดพิษต่อ เซลล์อื่นได้ด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาระบบนำส่งที่มีประจุเป็นทั้งบวกและลบในสภาวะร่างกาย ซึ่งจะไม่ มีพิษต่อเซลล์และเข้าสู่เซลล์ได้ไม่ดี แต่ระบบนำส่งนี้จะเปลี่ยนเป็นประจุบวกในสภาวะของก้อนมะเร็ง ทำให้ ความเป็นพิษมากขึ้น และเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น

เพื่อมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวัสดุนาโนที่มีความเสถียร สามารถบรรจุยาได้ในปริมาณที่สูง และ สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีในสภาวะที่เหมาะสม งานวิจัยนี้จึงได้สังเคราะห์ตัวนำส่งที่มีความเสถียร โดยอาศัย การออกแบบลิแกนด์ ที่มีความเสถียรสูง ละลายน้ำได้ดี และสามารถนำไปสร้างพันธะกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตัวอื่นได้ เพื่อเพิ่มประโยชน์ในการใช้งานได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 พัฒนาระบบนำส่งที่มีขนาดเล็กในระดับนาโน มีเสถียรภาพสูง และละลายน้ำได้ดี

1.2.2 นำระบบนำส่งที่พัฒนาขึ้นไป ศึกษาความเสถียรและความสามารถในการต่อกับแอนติบอดีเพื่อเพิ่มคุณสมบัติและการใช้งานของวัสดุ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง

1.3.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์หมู่ปลายเป็นกรดคาร์บอกซิลิก

1.3.3 การเตรียมอนุภาคนาโนของทองที่ติดกับลิแกนด์ที่มีหมู่ปลายเป็นกรดคาร์บอกซิลิกและทดสอบความเสถียร

1.3.4 การตรวจวัดแบบที่เรียสังเคราะห์พอลิออกซาเลตและสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองที่ว่องไวต่อการด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ระบบนำส่งที่มีความเสถียรและละลายน้ำได้ดี และความสามารถในการต่อกับแอนติบอดีได้

1.4.2 นำองค์ความรู้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ และใช้ประกอบการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษา

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อัตราการเสียชีวิตเนื่องจากโรคมะเร็งนั้นมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาด้านสุขภาพอีกปัญหาหนึ่งที่กำลังคุกคาม คุณภาพชีวิตของมนุษย์เป็นอย่างมาก ส่งผลให้เหล่านักวิจัยและบริษัทยาเกิดการตื่นตัวในการคิดค้นวิธีการวินิจฉัย และรักษาโรคมะเร็งมาเป็นเวลานานหลายปี ทำให้เกิดวิธีการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีการที่หลากหลาย เช่น การทำเคมีบำบัด (Chemotherapy) การผ่าตัด (Surgery) การฉายรังสี (Radiotherapy) วิธีต่างๆ เหล่านี้ มีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ซึ่งการที่จะเลือกใช้วิธีใดนั้น ขึ้นอยู่กับระยะของการเกิดโรคและสุขภาพของผู้ป่วย

ปัจจุบันได้มีแนวความคิดใหม่ในการนำนาโนเทคโนโลยี ซึ่งเป็นเทคโนโลยีเกี่ยวกับวัสดุที่มีขนาดเล็กมาก (10^{-9} เมตร) มาประยุกต์ใช้ในด้านชีวการแพทย์ เช่น ใช้เป็นตัวรับรู้ ใช้เป็นตัววินิจฉัยโรค ใช้เป็นเวชสำอางค์ และใช้เป็นตัวนำส่งยา เป็นต้น ซึ่งนาโนเทคโนโลยีทำให้งานวิจัยทางด้านชีวการแพทย์มีการพัฒนา และก้าวหน้าอย่างมาก (1)

2.1 นาโนเทคโนโลยีกับการนำส่งยา

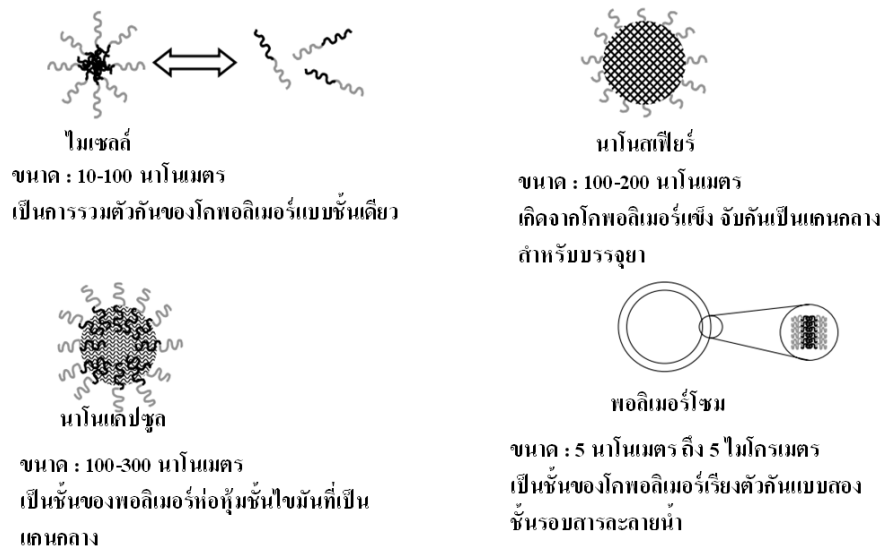
ระบบนำส่งยา คือ การเตรียมนอนุภาคนาโน (Nanoparticles) ที่ภายในบรรจุสารหรือยาเพื่อใช้ในการรักษาซึ่งเมื่อนำเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วยแล้ว ตัวนำส่งนาโน (Nanocarriers) จะสามารถไปยังตำแหน่งเซลล์ที่เกิดโรคและปลดปล่อยตัวยาในบริเวณที่กำหนดได้ ซึ่งการนำตัวยาสำคัญไปสู่อวัยวะเป้าหมายในร่างกาย สามารถลดผลข้างเคียงจากฤทธิ์ของยาต่อเซลล์ปกติอื่นๆ ได้

ความท้าทายในระบบนำส่งยาส່วนมากจะเป็นความเข้ากันได้ทางชีวภาพและความเสถียรในร่างกายสิ่งมีชีวิต ความสามารถในการละลายและการดูดซึมที่ลำไส้ และการไปถึงอวัยวะเป้าหมาย ประสิทธิภาพในการรักษา ผลข้างเคียง และความผันผวนของยาในพลาสมาซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของยาลดต่ำเกินกว่าจะออกฤทธิ์ หรือหลุดออกจากช่วงความเข้มข้นที่สามารถรักษาได้ อย่างไรก็ตาม นาโนเทคโนโลยีในระบบนำส่งยา จำเป็นต้องออกแบบเพื่อเอาชนะข้อจำกัดเหล่านี้ให้ได้ ดังนั้นการพัฒนาและการประดิษฐ์โครงสร้างนาโนที่มีขนาดในระดับไมโครหรือนาโนเมตร จะทำให้เกิดประโยชน์ได้มากยิ่งขึ้น (2)

2.2 อนุภาคนาโนกับระบบนำส่งยา

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา นักวิจัยได้ให้ความสนใจ ในการใช้อนุภาคนาโนมาประยุกต์ใช้ในระบบนำส่งยา โดยอนุภาคนาโนเป็นอนุภาคแขวนลอยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 1-1000 นาโนเมตร และตัวยาสามารถถูกกักเก็บ ห่อหุ้ม หรือกระจายตัวยู่ภายในอนุภาคนาโนนี้ได้ ความหลากหลายของ

อนุภาคนาโนที่นำมาใช้จะขึ้นอยู่กับวัสดุที่นำมาใช้ เช่น ไขมัน พอลิเมอร์ และวัสดุอนินทรีย์ ได้ถูกพัฒนาขึ้น ส่งผลให้ระบบนำส่งยามีความหลากหลายตามสมบัติทางกายภาพของวัสดุเหล่านั้น (3) ในปัจจุบันระบบนำส่งยาโดยใช้อนุภาคนาโนกำลังพัฒนาขึ้นตัวอย่างเช่น ลิโปโซม ไมเซลล์ นาโนสเฟียร์ ไนโอโซม นาโนแคปซูล อนุภาคนาโนไขมันแข็ง ไมโครอิมัลชันและท่อนาโนคาร์บอน เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างของระบบนำส่งยาบางชนิด แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของอนุภาคนาโน ไมเซลล์ นาโนสเฟียร์ พอลิเมอร์โซม และนาโนแคปซูล

โครงสร้างนาโนมีความสามารถในการปกป้องยา โดยการห่อหุ้มไว้ภายในและช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำ (Hydrolytic) และเอนไซม์ (Enzymatic) ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งโดยทั่วไปแล้วยารักษาโรคมะเร็งจะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ และสามารถถูกกำจัดได้โดยง่ายด้วยตับ ดังนั้นระบบอนุภาคนาโนเหล่านี้จะสามารถปกป้องยาที่บรรจุได้ และด้วยขนาดที่เล็กในระดับนาโน ทำให้สามารถฉีดเข้าระบบกระแสเลือดได้โดยที่ไม่เสี่ยงต่อการอุดตันเส้นเลือด (4) นอกจากนี้ ขนาดที่เล็กในระดับนาโนยังเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดระยะเวลาการคงอยู่ในร่างกาย ส่วนอนุภาคที่มีขนาดใหญ่จะถูกกำจัดโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวได้มากกว่าอนุภาคขนาดเล็ก (5) และอนุภาคที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 200 นาโนเมตร จะมีอัตราการถูกกำจัดออกจากร่างกายได้น้อย และสามารถคงอยู่ในระบบกระแสเลือดได้นานขึ้น เมื่อเทียบกับอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า (6) ปรากฏการณ์นี้เกิดจาก อนุภาคที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นผิว ที่มีรัศมีมีความโค้งสูง ซึ่งช่วยป้องกันการจับของออปโซนิน (Opsonins) ซึ่งเป็นตัวที่ช่วยให้เกิดกระบวนการทำลายเชื้อโรค (Phagocytosis) ของร่างกาย (7)

นอกจากนี้ การเพิ่มระยะเวลาการคงอยู่ในกระแสเลือดของอนุภาคนาโน สามารถทำได้โดยการปรับปรุงคุณสมบัติที่ผิวของอนุภาคนาโนโดยการติดโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ เช่น พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol; PEG) (8) สายโซ่ของพอลิเอทิลีนไกลคอล จะทำให้ผิวของอนุภาคตัวนำส่งละลายน้ำได้ดีขึ้น และช่วยปกป้องการจับของออปโซนิ (9) นอกจากนี้อนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กจะมีผลต่อการคงอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้นแล้ว ขนาดที่เล็กยังช่วยเพิ่มการสะสมของยาในเนื้อเยื่อได้อีกด้วย โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อมะเร็งซึ่งมีระบบน้ำเหลืองบกพร่อง ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า ปรากฏการณ์ enhanced permeability and retention (EPR) effect ซึ่งมีหลักการเดียวกันกับ การนำส่งยาแบบพาสซีฟ (passive) โดยอนุภาคนาโนจะเลือกนำพาไปยังส่วนที่เป็นก้อนเนื้อมะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ เนื่องจากก้อนเนื้อมะเร็งมีการจัดเรียงตัวที่หลวมกว่า ทำให้การสะสมของยาบริเวณเนื้อเยื่อปกติจะลดลง เป็นการลดการเกิดผลข้างเคียง โดยทั่วไปแล้วอนุภาคนาโนจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ ซึ่งสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาออกมาจากตัวนำส่งได้ เมื่อพอลิเมอร์มีการสลายตัว (10)

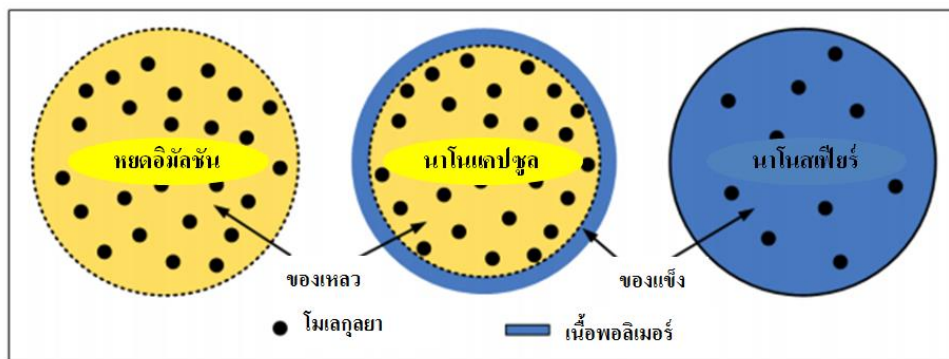
แอมฟิฟิลิกบล็อกโคพอลิเมอร์ (Amphiphilic block copolymer) ถูกนำมาใช้ในการฟอร์มอนุภาคนาโนได้นั้นมีหลายชนิด พอลิเมอร์เหล่านี้จะถูกประดิษฐ์โดยการพอลิเมไรเซชันของพอลิเมอร์มากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ ส่วนแรกเป็นส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่สองเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ อยู่ในพอลิเมอร์สายเดียวกัน ดังนั้น สายโซ่ส่วนหนึ่งจะจัดเรียงตัวโดยให้ส่วนที่ชอบน้ำหันออกสู่น้ำ ทำให้ระบบนำส่งแบบนี้กระจายตัวในน้ำได้ดี วัสดุเหล่านี้จะต้องมีคุณสมบัติที่เข้ากันได้ทางชีวภาพและสลายตัวได้เอง ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่เป็นที่นิยม ได้แก่ พอลิเอสเทอร์ หรือ พอลิ (อะมิโน แอไซด์) ซึ่งสร้างพันธะโควาเลนต์กับบล็อกโคพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ เช่น พอลิเอทิลีนไกลคอล อย่างไรก็ตาม บล็อกโคพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ เช่น พอลิ(เอิน-ไวนิล-2-ไพโรลิโดน) (Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)) พอลิ (2-เอทิล-2-ออกซาโซลีน) (Poly(2-ethyl-2-oxazoline)) และพอลิ (อะคริลิก แอไซด์) (Poly(acrylic acid)) ก็ได้รับความนิยมเช่นเดียวกัน การใช้พอลิเมอร์ในการฟอร์มอนุภาคนาโนยังสามารถควบคุมขนาดโดยการสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่มีความยาวของสายโซ่ให้มีขนาดต่าง ๆ กันได้ ทั้งส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำได้อีกด้วย

จากรายงานการวิจัยที่มีการศึกษาแอมฟิฟิลิกบล็อกโคพอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบและวิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน จะทำให้เกิดโครงสร้างของอนุภาคนาโนที่ต่างกันอย่างสิ้นเชิง เช่น ไมเซลล์ นาโนสเฟียร์ อนุภาคนาโนแบบคอร์-เชลล์ นาโนแคปซูล และพอลิเมอร์โซม เป็นต้น (11) สำหรับในงานนี้จะขอกล่าวเฉพาะลงไปในเรื่องของอนุภาคนำส่งแบบนาโนแคปซูล

2.3 นาโนแคปซูล

นาโนแคปซูล เป็นตัวนำส่งยาแขวนลอย ที่มีขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตรถึงไมโครเมตร ซึ่งมีโครงสร้างทางสัณฐานอยู่ระหว่าง นาโนอิมัลชัน และนาโนสเฟียร์รูปที่ 2.2 นาโนแคปซูลจะถูกห่อหุ้มด้วยชั้นของเปลือกรอบๆ แกนกลางที่เป็นไขมัน แกนกลางของนาโนแคปซูลยังสามารถเป็นน้ำได้ด้วย ซึ่งจะถูกระบุว่าเป็นพอลิเมอร์โซม ที่เกิดจากการรวมกลุ่มกันเอง (Self-assembly) ของพอลิเมอร์ นาโนสเฟียร์แตกต่างจากนาโนแคปซูลโดยนาโนสเฟียร์จะประกอบด้วยส่วนของแข็งทั้งหมด

นาโนสเฟียร์จะมีตัวยากระจายตัวอยู่ในเนื้อพอลิเมอร์ ซึ่งฟอร์มเป็นตัวนำส่ง แต่ในนาโนอิมัลชันและนาโนแคปซูลยาจะถูกกักเก็บไว้ในส่วนของชั้นไขมัน ซึ่งในกรณีของนาโนแคปซูลชั้นไขมันนี้ก็จะถูกห่อหุ้มด้วยชั้นพอลิเมอร์อีกครั้ง



รูปที่ 2.2 ภาพแสดงโครงสร้างของนาโนอิมัลชัน (ซ้าย) นาโนแคปซูล (กลาง) และนาโนสเฟียร์ (ขวา) (12)

การแยกนาโนแคปซูลออกจากนาโนอิมัลชันและนาโนสเฟียร์สามารถแยกออกโดยการหมุนเหวี่ยง (Centrifugation) ตามความหนาแน่นของอนุภาค เนื่องจากพบว่านาโนแคปซูลมีความหนาแน่นอยู่ระหว่างนาโนอิมัลชันและนาโนสเฟียร์

ในทางทฤษฎีนาโนแคปซูลมีข้อดีกว่านาโนอิมัลชัน เนื่องจากมีเปลือกหุ้มที่คอยปกป้องตัวยาไม่ให้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยตรง ดังนั้น อันตรกิริยาระหว่างระหว่างยาและสิ่งแวดล้อมก็จะน้อยลง นั่นคือตัวยาถูกปกป้องจากการย่อยสลาย และยังลดการระคายเคืองต่ออวัยวะข้างเคียงอีกด้วย นอกจากนี้เปลือกพอลิเมอร์ยังทำให้อนุภาคมีความเสถียรมากขึ้น ข้อดีอีกอย่างของนาโนแคปซูล เมื่อเปรียบเทียบกับนาโนสเฟียร์ คือสามารถบรรจุยาได้ในปริมาณที่สูงกว่า ซึ่งพบว่า อัตราส่วนของยาต่อพอลิเมอร์ ของนาโน

แคปซูลเท่ากับ 5: 1 เนื่องจากส่วนที่เป็นแกนกลางประกอบด้วยตัวยา ในขณะที่อัตราส่วนของยาต่อพอลิเมอร์ของนาโนสเฟียร์มีค่าประมาณ 1: 10 ซึ่งนาโนแคปซูลจะมี ส่วนของพอลิเมอร์น้อยกว่า เมื่อเทียบกับนาโนสเฟียร์ นอกจากนี้นาโนแคปซูลยังมีข้อดีอีกอย่างคือการปลดปล่อยยาจะเกิดขึ้นได้ดีกว่าเนื่องจากยาไม่ได้สร้างพันธะเคมีกับตัวนำส่ง ซึ่งสามารถสรุปเป็นตารางเปรียบเทียบระหว่างนาโนอิมัลชัน นาโนแคปซูล และนาโนสเฟียร์ ได้ดังตารางที่ 2.1

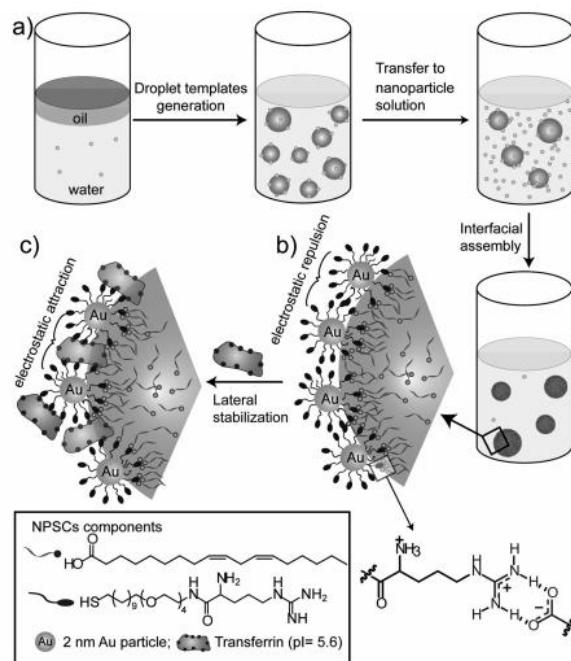
ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติต่างๆของ นาโนอิมัลชัน นาโนแคปซูล และนาโนสเฟียร์

สมบัติ	นาโนอิมัลชัน	นาโนแคปซูล	นาโนสเฟียร์
สัณฐาน	เป็นการฟอร์มตัวของไขมันหรือลิปิด	เป็นคอร์-เชลล์ โดยแกนกลางเป็นชั้นไขมันถูกห่อหุ้มด้วยชั้นพอลิเมอร์	เป็นก้อนพอลิเมอร์แข็งทั้งก้อน
การกักเก็บยา	เก็บยาในชั้นไขมัน	เก็บยาในชั้นไขมัน บริเวณแกนกลาง	เก็บยาในชั้นพอลิเมอร์
ข้อดี-ข้อเสีย	กักเก็บยาได้สูงแต่ยาสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยตรง เนื่องจากไม่มีเปลือกหุ้มอนุภาคไม่เสถียร	กักเก็บยาได้สูงถึง 5:1 เท่า เมื่อเทียบกับเนื้อพอลิเมอร์ ยาถูกปกป้องจากสิ่งแวดล้อม และยาหลุดออกม่ายกกว่านาโนสเฟียร์	อัตราส่วนของยาต่อพอลิเมอร์ของนาโนสเฟียร์มีค่าประมาณ 1: 10 ยาหลุดออกมาได้ยากกว่าเนื่องจากเนื้อพอลิเมอร์และยาติดกัน
ความเสถียร	ต่ำ	สูงเนื่องจากมีเปลือกหุ้ม	สูง

2.3.1 การเตรียมนาโนแคปซูล

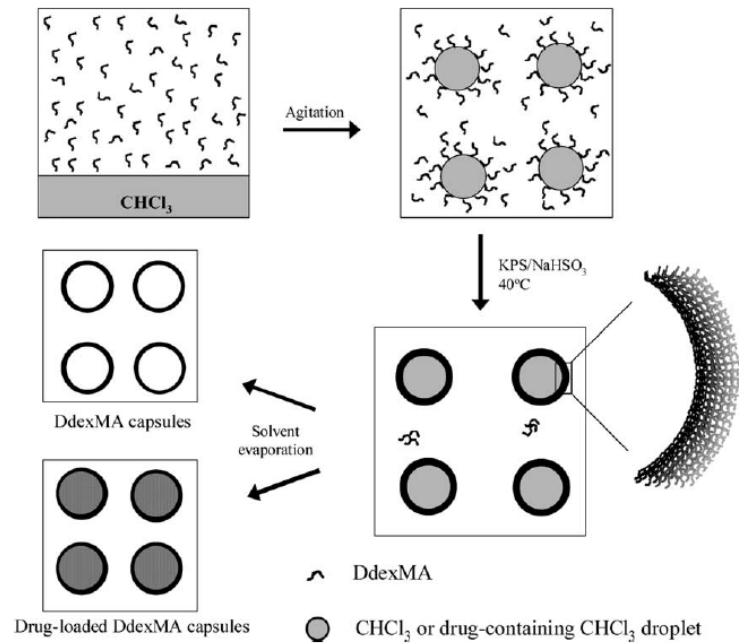
การเตรียมนาโนแคปซูลนั้นสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น วิธีนาโนพรีซิพิเทชัน (Nanoprecipitation) หรือที่เรียกว่าอินเตอร์เฟเชียลดีโพสิชัน (Interfacial deposition) วิธี อิมัลชันดิฟฟิวชัน (Emulsion-diffusion) และวิธีดับเบิลอิมัลซิฟิเคชัน (Double emulsification) ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการอินเตอร์เฟเชียลดีโพสิชัน ของการประกอบตัวกันของพอลิเมอร์ที่อยู่ในสารละลาย ในขั้นแรกจะเตรียมส่วนของไขมันสารละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น อะซิโตน โดยบางครั้งอาจจะใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมด้วย โดยทั่วไปนิยมใช้ poloxamer จากนั้นเฟสไขมันถูกทำให้กระจายตัวในน้ำ จากนั้นพอลิเมอร์ (สารลดแรงตึงผิว) ก็จะเข้าไปเกาะรอบๆหยดไขมัน เกิดเป็นนาโนแคปซูลขึ้น (13)

Xiao-Chao et al. (14) ได้ประดิษฐ์นาโนแคปซูล ที่ใช้อนุภาคนาโนของทองเป็นส่วนหนึ่งของเปลือกหุ้ม โดยการติดลิแกนด์ที่มีอาร์จินีน เป็นองค์ประกอบ อนุภาคทองที่ใช้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 นาโนเมตร) ส่วนของแกนกลางที่ใช้เป็นกรดลิโนเลอิก ซึ่งจะจับกับอาร์จินีนคาร์บอกซิเลตด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้ได้นาโนแคปซูลที่มีขนาดประมาณ 105 นาโนเมตร และมีความเสถียรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (5 nM, pH 7.4) นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มโปรตีนทรานสเฟอริน เพื่อช่วยในการเพิ่มความเสถียรของระบบ และ โปรตีนทรานสเฟอรินถูกนำมาใช้ในการเพิ่มการเข้าสู่เซลล์และการนำส่งยาไปยังเป้าหมายอีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การฟอร์มนาโนแคปซูล

Jiang et al. (15) ได้ใช้เทคนิคอินเทอร์เฟซัลพอลิเมอไรเซชัน (Interfacial polymerization) เตรียมนาโนแคปซูลที่ประกอบด้วย เอ็น,เอ็น-ไดเอทิลอะมิโนเอทิลเทรคแทน (N,N-diethylaminoethyl dextran; DEAE-dextran หรือ Ddex) กับพอลิแลกไทด์ (Polylactide; PLAM) โดย Ddex ถูกทำให้อยู่ในรูปของ Methacrylated Ddex (DdexMA) นาโนแคปซูลที่ประกอบด้วย Ddex และ PLAM ถูกฟอร์มด้วยการละลาย PLAM ในคลอโรฟอร์ม (CDCl_3) จากนั้นทำให้กระจายตัวในน้ำซึ่งมี DdexMA กระจายตัวอยู่ การเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน จะเกิดขึ้นเมื่อมีการเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate; KPS) และโซเดียมซัลไฟต์ (sodium sulfite; NaHSO_3) ภายใต้แก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นระเหยสารละลายออกจนแห้ง จะได้นาโนแคปซูลที่มีขนาดประมาณ 250 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การฟอร์มนาโนแคปซูลของพอลิเมอร์

ตัวอย่างข้างต้นแสดงให้เห็นว่านาโนแคปซูลสามารถเตรียมได้หลากหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับการออกแบบ วัสดุที่นำมาใช้เป็นแกนกลาง และเปลือกหุ้มยังเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของนาโนแคปซูล ซึ่งขึ้นอยู่กับความต้องการที่จะนำไปใช้ในงานในรูปแบบใด เช่น การนำไปใช้ในการนำส่งยา นำส่งดีเอ็นเอ นำส่งโปรตีน การใช้ในงานเวชสำอาง การรักษา และตรวจวินิจฉัยด้วยเครื่องตรวจวินิจฉัยด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Imaging; MRI) เป็นต้น

2.4 อนุภาคนาโนทองกับการนำส่งยา

อนุภาคนาโนทองถูกใช้ภายในร่างกายมนุษย์มาแล้วกว่า 50 ปี เนื่องจากสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่มีพิษ และมีความเฉื่อยทางเคมี ขนาดของอนุภาคนาโนทองสามารถควบคุมได้ในระหว่างการสังเคราะห์ และการติดหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลาย อนุภาคนาโนทองจะมีการสะสมบริเวณเซลล์มะเร็งและมีคุณสมบัติการกระเจิงแสง จึงสามารถใช้เป็นโปรบวัดได้ ในการศึกษาเซลล์มะเร็งจึงใช้อนุภาคนาโนทอง ทั้งในการรักษาทางเคมี การวินิจฉัย การนำส่งยา ยีนส์ และโปรตีน เป็นต้น

อนุภาคนาโนทองสามารถสังเคราะห์ได้หลายขนาด ในช่วงตั้งแต่ 2-100 นาโนเมตร แต่ในช่วงขนาดที่แสดงให้เห็นว่าสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุดคือช่วง 20-50 นาโนเมตร และขนาด 40-50 นาโนเมตรจะสามารถแพร่กระจายแทรกบริเวณช่องว่างในกลุ่มเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด และหากอนุภาคนาโนทองมี

ขนาดใหญ่ 80-100 นาโนเมตร จะกระจายไปในช่องว่างระหว่างเซลล์มะเร็งได้ต่ำ และมีการสะสมอยู่บริเวณหลอดเลือดเป็นส่วนใหญ่ (16)

2.4.1 ผลของขนาดต่อการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของอนุภาคนาโนของทอง

ในระบบนำส่งยา อันตรกิริยาระหว่างเซลล์กับอนุภาคนำส่ง มีปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการนำส่งหลายอย่าง เช่น ประจุ ขนาด และคุณสมบัติของตัวเคลือบบนอนุภาคนำส่ง ที่จะส่งผลต่อการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค Rotello และ Vachet ได้แสดงให้เห็นว่าประจุ และความไม่ชอบน้ำจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคของทอง Chan และคณะได้รายงานว่า การเข้าสู่เซลล์ของทองจะขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค โดยอนุภาคนาโนของทองที่อยู่ในช่วง 2-100 นาโนเมตร นำมาเคลือบด้วยแอนติบอดีเฮอเซ็ปทิน (Herceptin) และทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านมซึ่งจะมี ErbB2 เป็นตัวรับอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าขนาดของอนุภาคที่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุดจะอยู่ในช่วง 20-50 นาโนเมตร และเซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ที่อนุภาคขนาด 40-50 นาโนเมตร สำหรับการศึกษาภายในสิ่งมีชีวิต (in vivo) แบบ passive targeting ได้ศึกษาอนุภาคนาโนของทองในช่วง 10- 100 นาโนเมตร ผู้วิจัยพบว่า อนุภาคนาโนของทองที่มีขนาดเล็ก จะมีการแพร่ไปยังกลุ่มก้อนมะเร็งอย่างรวดเร็ว ขณะที่อนุภาคขนาดใหญ่ยังคงอยู่ใกล้ๆ กับบริเวณเส้นเลือด Stellacci และคณะ พบว่าลักษณะลิแกนด์ที่เป็นเปลือกหุ้มจะมีผลต่อการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของอนุภาคนาโนของทอง ซึ่งอนุภาคนาโนของทองที่ติดลิแกนด์บางชนิดจะเป็นพิษต่อเซลล์หากเข้าสู่เซลล์โดยตรง โดยไม่มีการสร้างรูพรุนบนผนังเซลล์ Brust และคณะได้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในการศึกษาการปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคนาโนของทองด้วยเปปไทด์ ซึ่งสามารถจำเพาะต่อเป้าหมายได้ Feldheim และคณะได้แสดงให้เห็นการประดิษฐ์อนุภาคนาโนของทอง (20 นาโนเมตร) ที่จำเพาะต่อนิวเคลียส โดยการปรับปรุงพื้นผิวของทองด้วยลำดับเปปไทด์ที่เลียนแบบมาจากลำดับเปปไทด์ของไวรัส (17)

2.4.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง

โดยทั่วไปแล้วการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองนั้น จะทำในของเหลว (วิธีการเคมีของเหลว) โดยการรีดักชันกรดคลอโรอริก (HAuCl_4) โดยการละลายกรดคลอโรอริกแล้วจะต้องปั่นสารละลายด้วยเครื่องปั่นด้วยแท่งแม่เหล็กอย่างรวดเร็ว แล้วเติมตัวรีดิวซ์ ซึ่งจะทำให้ไอออน Au^{3+} จะถูกรีดิวซ์เป็นอะตอมของทอง จากนั้นจะกลายเป็นสารละลายอิมัลชันด้วยอะตอมของทอง และทองจะค่อยๆ เกิดการรวมตัวกันในรูปของอนุภาคในระดับนาโนเมตร อะตอมของทองก็จะจับตัวกันเป็นอนุภาค และการปั่นสารละลายแรงๆ จะทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้ได้อนุภาคก็จะมีขนาดที่สม่ำเสมอ ในการ

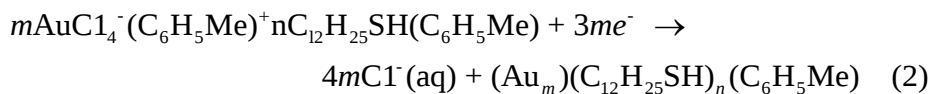
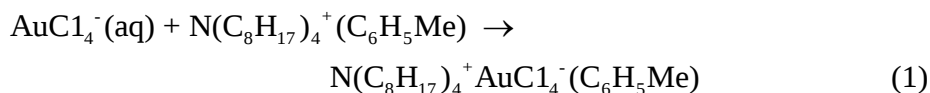
สังเคราะห์จะมีการเติมสารกลุ่มไทออลลงไปเพื่อป้องกันไม่ให้ทอง มีขนาดใหญ่เกินไป ทำให้เกิดคุณสมบัติระหว่างสารอินทรีย์-อนินทรีย์ขึ้น

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองนั้นมีหลายวิธี แต่ในปัจจุบันมีสองวิธีหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเพื่อให้สร้างสิ่งประดิษฐ์ และโครงสร้างนาโนจนกลายเป็นวิธีมาตรฐานได้แก่ วิธีเทอเควิช (Turkevich) และบรัซ-ชริฟฟริน (Burst-Schiffrin) โดยวิธีเทอเควิช จะทำโดยการรีดิวซ์เกลือของทอง AuCl_4^- ซึ่งมีซิเตรดเป็นตัวรีดิวซ์ในสารละลายน้ำ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย วิธีการนี้ถูกค้นพบโดย Turkevich ในปี ค.ศ. 1951 (18) อนุภาคนาโนของทองที่ได้จะมีลักษณะค่อนข้างกลมและมีการกระจายตัวดี ขนาดของอนุภาคสามารถควบคุมได้ โดยการปรับอัตราส่วนของไอออนทองกับตัวรีดิวซ์ วิธีการนี้ จะสามารถควบคุมขนาดของอนุภาคได้ดีที่สุดในช่วง 10-30 นาโนเมตร แต่เมื่ออนุภาคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 30 นาโนเมตร การสังเคราะห์โดยวิธีการนี้จะควบคุมขนาดได้ยาก และมีการกระจายตัวที่กว้าง (Poly disperse) ดังนั้นการสังเคราะห์อนุภาคตั้งแต่ 20-100 นาโนเมตร จึงใช้วิธีปลูกเมล็ด (Seed) และ การทำให้โต (Growth) ร่วมด้วย เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดนิวเคลียสอันดับที่สอง (Secondary nucleation) (19)

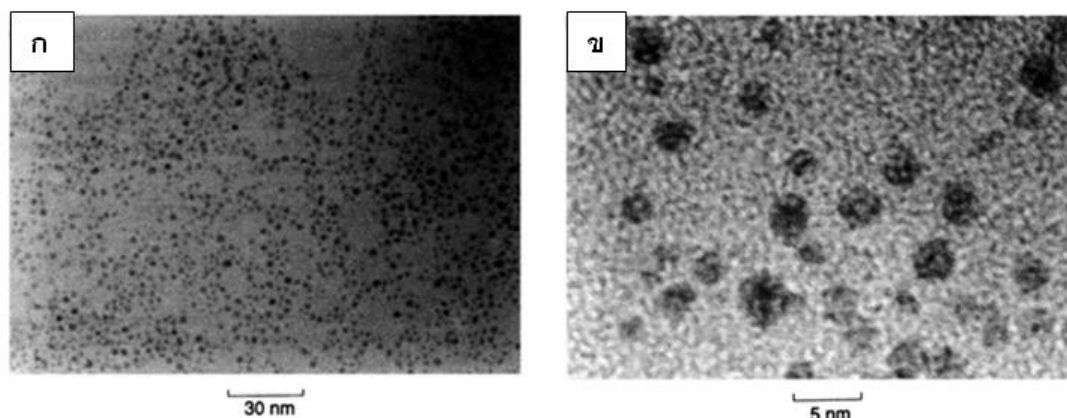
แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ไซเตียมซิเตรดเป็นตัวรีดิวซ์นี้ จะไม่สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองให้มีขนาดเล็กกว่า 10 นาโนเมตรได้ เนื่องจากความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ไม่ดีของไซเตียมซิเตรด จึงไม่สามารถฟอร์มอนุภาคนาโนของทองที่เล็กได้ ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของไซเตียมซิเตรดที่สูงมากก็ตาม โดยอนุภาคนาโนของทองที่มีขนาดเล็กกว่านี้สามารถสังเคราะห์ได้โดยการใช้ไซเตียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) เป็นตัวรีดิวซ์ (20)

วิธีบรัซ-ชริฟฟริน ค้นพบโดย Brust และ Schiffrin ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1990 (21) วิธีนี้จะใช้ลิแกนด์กลุ่มไทออลในการยึดเกาะที่ผิวของกลุ่มนิวคลีโอของโลหะ ในขณะที่นิวคลีโอกำลังเติบโต ซึ่งนิวคลีโอของอนุภาคโลหะจะถูกทำให้โตขึ้นในระบบของสารละลายสองวัฏภาค ปฏิกิริยานี้เกิดจากสารละลายกรดคลอโรออร์ริก (AuCl_4^-) จะถูกย้ายจากสารละลายน้ำมายังสารละลายโทลูอินโดยให้เตตระออกทิลแอมโมเนียมโบโรไมด์ (Tetraoctylammonium bromide) เป็นตัวพา และอนุภาคของทองจะถูกรีดิวซ์โดยไซเตียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride) และใช้โดเดเคนไธออล (Dodecanethiol; $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$) เป็นตัวเคลือบ

เมื่อเติมตัวรีดิวซ์ สารละลายโทลูอินจะเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นน้ำตาลเข้ม อย่างรวดเร็ว ปฏิกิริยารวมสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้



การสังเคราะห์ทองด้วยวิธีการนี้ได้ จะได้อนุภาคนาโนของทองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 2-6 นาโนเมตร ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างไฮดรอลและทอง



รูปที่ 2.5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคนาโนของทองที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการบรัช-ซิริฟริน ก) ภาพกำลังขยายต่ำ ข) ภาพกำลังขยายสูง (21)

รูปที่ 2.5 (ก) แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคนาโนของทองที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการดังกล่าว พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 นาโนเมตร และขนาดอนุภาคสูงสุดคือ 2-2.5 นาโนเมตร ในรูปที่ 2.5 (ข) แสดงรูปร่างของอนุภาคที่มีการกระจายทางโครงสร้างทั้งแบบทรงหลายหน้าคิวออกทาฮีดรอน (Cuboctahedral) และทรงยี่สิบหน้า (Icosahedral) นอกจากนี้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองในหลายๆวิธีมักจะพบการจับตัวของอนุภาคแบบแฝด (Twinning) แต่สำหรับวิธีนี้ หมู่ไทออลจะจับตัวล้อมรอบกลุ่มนิวคลีโอของทอง ทำให้ป้องกันการจับตัวของอนุภาคแบบแฝด

ขนาดของอนุภาคนาโนของทองจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของไฮดรอล/ทอง ถ้าปริมาณของไฮดรอลมีมากขนาดของอนุภาคก็จะเล็ก โครงสร้างของอนุภาคที่มีไฮดรอลเป็นชั้นผิวห่อหุ้มทองอยู่ จะมีทองประมาณ 102 อะตอม และกรดเตตตระเมอร์แคปโตเบนโซอิก (4-mercaptobenzoic acid) 44 หน่วย (16)

2.5 นาโนแคปซูลสำหรับการนำส่งยา

ในบรรดาตัวนำส่งยาทั้งหลาย นาโนแคปซูลถือว่าเป็นตัวนำส่งที่มีข้อดีหลายด้าน เช่น สามารถสังเคราะห์ได้ง่าย สามารถป้องกันยาจากการถูกทำลายก่อนถึงเป้าหมาย และสามารถควบคุมคุณสมบัติได้หลากหลาย โดยความพิเศษของตัวนำส่งชนิดนี้อีกอย่าง คือสามารถบรรจุยาได้มาก และยาจะถูกบรรจุโดยไม่ต้องสร้างพันธะเคมีกับตัวนำส่ง

ก) ไมโคร/นาโนแคปซูลในการประยุกต์ใช้ในระบบนำส่งยา

โครงสร้างของแคปซูลถูกพัฒนาอย่างกว้างขวางเพื่อการประยุกต์ใช้ในระบบนำส่งยา โครงสร้างที่มีรูกลวงตรงกลาง มีความน่าสนใจต่อระบบนำส่งยา เนื่องจากโครงสร้างเหล่านี้สามารถบรรจุยาได้ในอัตราส่วนที่สูง โครงสร้างเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ กลุ่มที่บรรจุสารละลายน้ำไว้ภายใน ตัวอย่างเช่น ลิโปโซม (22) พอลิเมอร์โซม (23) และคอลลอยด์โซม (24) เป็นต้น และกลุ่มที่สองได้แก่ กลุ่มที่ใช้ในการบรรจุสารที่ไม่ละลายน้ำ โครงสร้างพื้นฐานของตัวนำส่งประเภทนี้ คือจะเป็นโครงสร้างอนุภาคไขมันแข็ง ซึ่งสามารถฟอร์มตัวด้วยกระบวนการอิมัลชัน (25) ระบบนี้จะค่อนข้างทำได้ง่ายและทำได้ในห้องแล็บและคลินิกทั่วไป

ข) ความสำคัญของขนาดของอนุภาค/แคปซูลต่อการนำส่ง

ขนาดของอนุภาคมีความสำคัญมากต่อระบบนำส่งยา ซึ่งมีความสำคัญต่อสองระบบหลักได้แก่ ความสำคัญระดับเซลล์ คือ ขนาดและรูปร่างของอนุภาคมีผลต่อการเข้าสู่เซลล์ และความสำคัญในระดับระบบ คือ ขนาดของอนุภาคจะเป็นตัวควบคุมการกระจายตัวของอนุภาคในเยื่อเซลล์ และการกระจายตัวของอนุภาคสู่เนื้อเยื่อต่างๆ

1. ผลของขนาดต่อการนำเข้าสู่เซลล์ ขนาดของแคปซูลที่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้นั้นเป็นอีกตัวแปรหนึ่งในการออกแบบแคปซูลในระบบนำส่งยา ในการศึกษาของ Chen และคณะ (26) พบว่าขนาดที่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด คือ 50 นาโนเมตร พวกเขายังแสดงให้เห็นอีกว่ารูปร่างของอนุภาคมีผลต่อการนำเข้าสู่เซลล์ ตัวอย่างเช่น อนุภาคทรงกลม มีความน่าจะเป็นที่จะเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าอนุภาคที่มีรูปร่างเป็นแท่ง

2. ผลของขนาดอนุภาคต่อระบบ Enhanced Permeation and Retention (EPR) effect กล่าวคือ ตัวนำส่งที่มีขนาด 5-100 นาโนเมตร จะมีความสามารถในการเข้าสู่เซลล์มากกว่าขนาดอื่นๆ (27) EPR คือการเพิ่มการดูดซึมและคงอยู่ในก้อนเนื้อมะเร็ง ซึ่งบริเวณนี้เป็นบริเวณที่เซลล์มีการเติบโตอย่าง

รวดเร็วจึงมีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงจำนวนมาก และมีช่องว่างระหว่างเซลล์ข้างเคียงเกิดขึ้น ทำให้ตัวนำส่งจำนวนมากสามารถแทรกอยู่ระหว่างช่องว่างเหล่านี้ส่งผลให้บริเวณที่เป็นก้อนเนื้อมะเร็ง จะมีความเข้มข้นของตัวนำส่งสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งเข้มข้นมากถึง 10 เท่า (28)

ค) การประยุกต์ใช้อุณหภูมิของทองในการนำส่ง

อุณหภูมิของทองเป็นที่นิยมอย่างมากในระบบนำส่งยา (29) อุณหภูมิของทองมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะใช้ในระบบนำส่งยา ประการแรก คือ อุณหภูมิของทองสามารถสังเคราะห์ได้หลายขนาด (1-150 นาโนเมตร) (30) นอกจากนี้อุณหภูมิของทองยังมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูงทำให้สามารถติดลิแกนด์ได้อย่างหนาแน่น บรรจุยาได้ปริมาณที่สูง และสามารถเพิ่มตัวนำส่งไปยังเป้าหมายได้ ตัวอย่างเช่นอนุภาคนาโนของทองขนาด 2 นาโนเมตรสามารถติดลิแกนด์ประมาณ 100 ลิแกนด์/อนุภาค (31) ประการที่สอง คือ การติดหมู่ฟังก์ชันต่างๆสามารถทำได้หลากหลาย โดยใช้ ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ ซึ่งอาจจะเป็นการติดหมู่ฟังก์ชันหลายชนิดในอนุภาคเดียว เช่น ตัวนำส่งไปยังเป้าหมายได้ง่าย และประการสุดท้าย อนุภาคนาโนของทองไม่มีพิษ เข้ากันได้ทางชีวภาพ (32)

ความสามารถในการปลดปล่อยยาก็เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญมากในระบบการนำส่งยา (33) การควบคุมการปลดปล่อยยาจากภายนอกเป็นอีกวิธีการหนึ่ง ที่ใช้สามารถควบคุมตำแหน่งและเวลาการปลดปล่อยยาได้อย่างจำเพาะ (34) ตัวนำส่งยาได้ถูกพัฒนาให้มีความสามารถในการปลดปล่อยยาได้โดยการติดหมู่ฟังก์ชันที่สามารถแตกตัวได้ด้วยแสง (35) Rotello และคณะได้ประยุกต์กลวิธีนี้มาใช้กับตัวนำส่งที่เป็นอนุภาคนาโนของทองโดยใช้หมู่ฟังก์ชันของ o-nitrobenzyl ester ซึ่งสามารถแตกตัวได้ภายใต้แสงสามารถใช้ในการปลดปล่อย DNA (36) และการปลดปล่อยยาต้านมะเร็ง (5-fluorouracil) จากอนุภาคนาโน (37)

ง) การประยุกต์ใช้นาโนแคปซูลในการควบคุมการปลดปล่อยยา

Desai et al. กล่าวว่าอนุภาคที่มีขนาดระดับนาโนจะมีความสามารถในการการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่า อนุภาคขนาดไมโคร และได้แสดงให้เห็นว่า อนุภาคนาโนขนาด 100 นาโนเมตรพบว่าการดูดซึมมากขึ้น 2.5 เท่าเมื่อเทียบกับ 1 ไมโครเมตร (38) Yang et.al. ได้เสนอระบบนำส่งแบบใหม่ โดยใช้อุณหภูมิของกรดโลนเป็นแกนกลางและเป็นตัวบรรจุยาที่ไม่ละลายน้ำ และเคลือบกรดโลนด้วยอนุภาคทองที่เคลือบด้วยอาร์จินีนและโปรตีนทรานสเฟอร์ริน โดยในงานวิจัยนี้ใช้ยา Paclitaxel เป็นโมเดลพบว่าสามารถสร้างระบบนำส่งที่มีขนาด ประมาณ 100 นาโนเมตร และสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ (14)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงแบ่งการทดลองออกเป็น 3 หัวข้อหลัก ได้แก่

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทอง
2. การสังเคราะห์ลิแกนด์หมู่ปลายเป็นกรดคาร์บอกซิลิก
3. การเตรียมอนุภาคนาโนของทองที่ติดกับลิแกนด์ที่มีหมู่ปลายเป็นกรดคาร์บอกซิลิกและทดสอบความเสถียร
4. การตรวจวัดแบบที่เรียของอนุภาคนาโนของทองที่ติดกับลิแกนด์ที่มีหมู่ปลายเป็นกรดคาร์บอกซิลิก

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

ในการทำวิจัยนี้ สารเคมี ใช้ในการสังเคราะห์พอลิออกซาลาเลต ลิแกนด์ และอนุภาคนาโนทอง ซื้อจาก Sigma-Aldrich Merck chemicals Quality Reagent Chemical และ RCI Labscan limited และไม่ได้ผ่านการทำบริสุทธิ์เพิ่มเติม

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องเขย่าสาร Vortex (Genie 2, USA)
2. เครื่องวัดพีเอช (Metrohm, 827 pH Lab Meter, USA)
3. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้าพร้อมแท่งกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Heidoph, MR 1000, Germany)
4. เครื่องยูวี – วิสเปิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Jasco V630, USA)
5. เครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (Jasco FP-8000, USA)
6. เครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์ชนิดหัวโพรบ (Ultrasonic probe)
7. เครื่อง Varian NMR-400 MHz

3.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

3.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองขนาด 13 นาโนเมตร

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองแบบทรงกลมด้วยวิธี Turkevich method ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดกัน โดยใช้สารเริ่มต้นไฮโดรเจนเตตระคลอโรเรทไตรไฮเดรต (Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate; $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ละลายในน้ำดีไอ (DI water) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารละลายเดือด สารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองใส จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมซิเตรต (sodium citrate) ซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์ที่มีความแรงปานกลาง ความเข้มข้น 38.8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว ปล่อยให้สารละลายเดือดต่อ 15 นาที สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสารละลายใสไม่มีสี จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีดำ และสีม่วงอมแดง ตามลำดับ ทิ้งให้ เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-4 ชั่วโมง จากนั้นนำมารองด้วยฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร สารละลายที่ได้จะมีสีแดงเข้ม นำอนุภาคที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีดังกล่าวไปตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM)

3.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ (Carboxylic acid-terminate ligand)

3.3.1 การเตรียมสารตั้งต้นทรียิล-เมอร์แคปโทอันเดคานอิก-แอซิด (Trt-mercaptoundecanoic acid)

การเตรียมสารตั้งต้นทรียิล-เมอร์แคปโทอันเดคานอิก-แอซิด เพื่อใช้สำหรับเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ในขั้นต่อไป เริ่มจากชั่ง 11-เมอร์แคปโทอันเดคานอิกแอซิด (11-Mercaptoundecanoic acid) 1 กรัม ในขวดก้นกลมปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane; DCM) 10 มิลลิลิตร กวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เวลาประมาณ 10 นาที เติมโซเดียมไฮไดรด์ (Sodium hydride; NaH) 0.1214 กรัม และกวนต่ออีก 15 นาที เติมคลอโรไตรเฟนิลมีเทน (Chlorotriphenylmethane) 2.8212 กรัม ที่ละลายในไดคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร กวนสารละลายต่อเนื่องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้เติมน้ำดีไอ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บเอาชั้นของไดคลอโรมีเทนมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เก็บชั้นไดคลอโรมีเทนและเติมโซเดียมซัลเฟต 0.05 กรัม เพื่อกำจัดน้ำออก นำสารประกอบในชั้นไดคลอโรมีเทนที่ได้ไประเหยให้แห้ง แล้วตรวจสอบสารเบื้องต้นด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีโดยใช้เอธิลอะซิเตต 25 เปอร์เซ็นต์/เฮกเซน 75 เปอร์เซ็นต์ ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำสารประกอบที่ได้จากการแยก

การเตรียมสารประกอบ 2 เพื่อนำไปใช้สำหรับการสังเคราะห์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนต์ ในขั้นต่อไปโดยการนำสารตั้งต้นทริทิล-เมอร์แคปโทอันเดคาโนอิก-แอซิด 0.8 กรัม และเอ็นเอ็น-ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมด์ (N, N'-dicyclohexyl carbodiimide; DCC) 0.344 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน 8 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 10 นาที เติมนีโตรเจนเตตระเอทิลีนไกลคอล (Tetra ethylene Glycol; TEG) 3 มิลลิลิตร เติมนีโตรเจนไตรเอทิลอะมีน (Triethylamine; Et₃N) 0.26 มิลลิลิตร และ 4-ไดเมทิลามิโนไพริดีน (4-Dimethylamino pyridine; DMAP) 0.02 กรัม กวนสารละลายต่อเนื่องเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำสารประกอบที่ได้ไปกรองตะกอนออก และเติมน้ำดีไอ 10 มิลลิลิตร เก็บเอาชั้นของไดคลอโรมีเทนมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำชั้นไดคลอโรมีเทนที่ได้ เติมนีโตรเจนไตรเอทิลอะมีน 0.05 กรัม เพื่อกำจัดน้ำออก นำสารประกอบในชั้นไดคลอโรมีเทนไประเหยแห้ง ตรวจสอบสารเบื้องต้นด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีโดยใช้เอธิลอะซิเตต 25 เปอร์เซ็นต์/เฮกเซน 75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำสารประกอบที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ไประเหยแห้ง และตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี (1H-NMR)

รูปที่ 3.1 แสดงปฏิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ 3 ในการสังเคราะห์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มิเนตลิแกนด์

ขั้นตอนการสังเคราะห์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเทลิแกนด ในขั้นตอนที่ 3 แสดงปฏิกิริยาตั้งรูปที่ 3.1 โดยใช้อัตราส่วนโมลของสารประกอบ 2 : เตตระบิวทิลโบรโมอะซีเตต (tetra-butyl bromoacetate) : โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride) เท่ากับ 1: 1.5: 2 จากนั้นละลายโซเดียมไฮไดรด์ด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 15 มิลลิลิตร เติมสารประกอบ 2 และกวนสารละลายต่อเนื่องจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นค่อยๆเติมเตตระบิวทิลโบรโมอะซีเตตลงไปในปฏิกิริยา เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาคายความร้อนจึงให้ความเย็นขณะทำปฏิกิริยา เมื่อตรวจสอบว่าปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร สกัดแยกชั้นของสารประกอบด้วยไดคลอโรมีเทน นำชั้นไดคลอโรมีเทนที่ได้เติมโซเดียมซัลเฟต 0.05 กรัม เพื่อกำจัดน้ำออก นำสารประกอบในชั้นไดคลอโรมีเทนไประเหยแห้ง จากนั้นทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำสารประกอบที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ไประเหยแห้ง และตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี

ในขั้นตอนสุดท้ายคือการตัดกลุ่มปกป้องของปลายทั้งสองด้านของสารประกอบที่ 3 ออก โดยนำสารประกอบ 3 ละลายในไดคลอโรมีเทน กวนสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน ค่อยๆหยดไตรฟลูออโรอะซีติก แอซิด (trifluoroacetic acid; TFA) จนสารละลายเปลี่ยนจากใสเป็นสีส้ม หยุดปฏิกิริยาโดยหยดไตรไอโซโพรพิลไซเลน (triisopropylsilane; TIPS) จนสารละลายเปลี่ยนจากสีส้มกลับมาเป็นสารละลายใส กวนสารละลายทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไประเหยกรดออกที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฮกเซน (hexanes) เพื่อล้างเอาส่วนที่ละลายตัวออกจากปฏิกิริยา 2-3 รอบ จะได้คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเทลิแกนดที่ทางผู้วิจัยได้ออกแบบไว้ เพื่อนำไปทำหน้าที่เป็นเสมือนตัวที่ช่วยตรึงแอนติบอดีลงบนอนุภาคนาโนทอง โดยหมู่ไฮดรอกซิลของลิแกนดที่ออกแบบไว้จะสามารถสร้างยึดเกาะกับอนุภาคนาโนทอง และส่วนปลายอีกด้านของลิแกนดคือหมู่คาร์บอกซิลิกจะสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่เอมีนของแอนติบอดีได้ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาใช้กับระบบเซนเซอร์ที่ออกแบบไว้ในขั้นต่อไป

3.4 การเตรียมอนุภาคนาโนทองที่เคลือบด้วยคาร์บอกซิลิกเป็นหมู่ปลาย

การแลกเปลี่ยนคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเทลิแกนดบนอนุภาคนาโนทองทรงกลม นั้น ก็เพื่อที่จะปรับปรุงและเพิ่มคุณสมบัติพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง ต่อการนำไปสร้างพันธะกับแอนติบอดี นอกจากนั้นยังช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคนาโนทองอีกด้วย สำหรับการแลกเปลี่ยนคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเทลิแกนดบนอนุภาคนาโนทองทรงกลม จะใช้หลักการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ปลายลิแกนด ซึ่งมีความว่องไวกับพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง โดยจะเข้าไปแทนที่โมเลกุลของซิเตรทที่เคลือบอยู่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง โดยซิเตรทที่เคลือบอยู่ที่พื้นผิวของอนุภาคนาโนทองนั้น มาจากขั้นตอนการสังเคราะห์ ใน

ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนจะใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองทรงกลม ต่อความเข้มข้นของคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์ เท่ากับ 1:5 โดยนำอนุภาคนาโนทองทรงกลมที่สังเคราะห์ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 14.09 นาโนโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิตร ใส่ลงในขวดกันกลมและกวนสารละลายทิ้งไว้ จากนั้นค่อยๆเติมคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์ที่ละลายในไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 70.45 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หลังจากเติมลิแกนด์ลงไปจะสังเกตเห็นสารละลายของอนุภาคนาโนทองจะค่อยๆเปลี่ยนจากสีแดงเข้มเป็นสีแดงอมม่วง จากนั้นเติม 0.1 โมลาร์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH) เพื่อปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 8 กวนสารละลายต่อเนื่อง 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน หลังจากนั้นนำสารละลายทองที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที เพื่อล้างส่วนเกินของลิแกนด์ออก 2-3 รอบ ละลายตะกอนของอนุภาคนาโนทองทรงกลมกลับด้วยน้ำกลั่นที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8 สารแขวนลอยอนุภาคนาโนทองทรงกลมหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์ที่ได้นั้น เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงและละลายตะกอนกลับด้วยน้ำกลั่นที่มีความเป็นเบสเล็กน้อยพบว่าอนุภาคมีการกระจายตัวได้ดีในน้ำกลั่น โดยสารแขวนลอยยังคงมีสีแดงเข้ม ซึ่งมีสีแดงเข้มเช่นเดียวกับอนุภาคนาโนทองซีเตรทที่ได้จากการสังเคราะห์ แต่เมื่อนำสารแขวนลอยของอนุภาคนาโนทองซีเตรทที่ได้จากการสังเคราะห์ไปผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที บางส่วนของอนุภาคนาโนทองจะรวมกลุ่มกันเป็นตะกอนสีดำ ไม่สามารถละลายตะกอนกลับได้ และสีของสารแขวนลอยมีสีออกม่วงจางๆ ลักษณะการกระจายตัวในน้ำกลั่นได้ดีของอนุภาคนาโนทองหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์นั้น บ่งบอกถึงลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนไปของอนุภาคนาโนทองคือ การมีคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองนั้น ทำให้อนุภาคนาโนทองกลมความเสถียรมากขึ้น

3.5 การตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนอนุภาคนาโนทอง

การตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนอนุภาคนาโนทองทรงกลม โดยอาศัยปฏิกิริยาควบคู่ (Coupling reaction) ของไฮบริดไมด์ไฮโดรคลอไรด์ (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl); EDC) และเอ็น-ไฮดรอกซี ซัคซินิไมด์ (N-Hydroxysuccinimide; NHS) ให้เกิดพันธะโควาเลนต์ (Covalence bond) ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิก (Carboxylic group) ที่ปลายของแอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์และหมู่เอมีน (Amine group) ของกรดอะมิโนในโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยนำสารแขวนลอยอนุภาคนาโนทองหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยแอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์ ไปผ่านขบวนการทำแห้งเพื่อเพิ่มความเข้มข้นให้เท่ากับ 120 นาโนโมลาร์ เตรียมสารละลาย 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของไฮบริดไมด์ไฮโดรคลอไรด์และเอ็น-ไฮดรอกซี ซัคซินิไมด์ ในอะซีเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 นำสารละลายทั้ง 2 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำสารละลายผสมดังกล่าวปริมาณ 100 ไมโครลิตร เติมนลงในสารแขวนลอยอนุภาคนาโนทองความเข้มข้น

120 นาโนโมลาร์ ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1000 ไมโครลิตร ของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ชาลีน ผสมและเขย่าให้เข้ากัน นำสารแขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง 6500 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนสารละลายใสด้านบน (supernatant) ออก เพื่อล้างส่วนเกินของปฏิกิริยา จากนั้นนำโมโนคลอนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อยู่ในสารละลายที่มีพีเอชต่างกันคือ อะซีเตตบัฟเฟอร์พีเอช 5.5, ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ชาลีนพีเอช 7.4 และสารละลายทริสบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 ตามลำดับ เติมนลงในตะกอนของอนุภาคนาโนทองข้างต้น เพื่อศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการตรึงโมโนคลอนอลแอนติบอดีบนอนุภาคนาโนทอง ผสมและเขย่าให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศา เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1000 ไมโครลิตร ของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ชาลีน ผสมและเขย่าให้เข้ากัน นำสารแขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง 3500 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนสารละลายใสด้านบนออก เพื่อล้างส่วนเกินของปฏิกิริยา นำตะกอนที่ได้เก็บไว้ที่ 4 องศา สำหรับใช้เพื่อศึกษาต่อไป

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองแบบทรงกลมด้วยวิธี Turkevich method ซึ่งเป็นวิธีที่รู้จักกัน โดย ใช้สารเริ่มต้นไฮโดรเจนเตตระคลอโรเรทไตรไฮเดรต (Hydrogen tetrachloroaurate(III) trihydrate; $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ละลายในน้ำดีไอ (DI water) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารละลายเดือด สารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองใส จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมซิเตรต (sodium citrate) ซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์ที่อ่อน ความเข้มข้น 38.8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว ปลอ่ยให้สารละลายเดือดต่อ 15 นาที สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสารละลายสีไม่มีสี จากนั้น จะเปลี่ยนเป็นสีดำ และสีม่วงอมแดง ตามลำดับ ทั้งให้ เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-4 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร สารละลายที่ได้จะมีสีแดงเข้ม รูปที่ 1(ก) นำสารแขวนลอยอนุภาคนาโนทองที่ได้ไปศึกษาคุณสมบัติทางแสงด้วยการวัดยูวี-วิสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 300-800 นาโนเมตร พบว่าลักษณะกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าความยาวคลื่น (wavelength) ของอนุภาคนาโนทองที่ ความยาวคลื่น 300-800 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 4.1 (ข) แสดงค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 520 นาโนเมตร มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.733 จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 520 นาโนเมตร สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้เท่ากับ 0.02 ไมโครโม ลาร์ โดยอาศัยกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert Law)

ในสมการ $A = \epsilon Cl$ _____ (1)

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

ϵ คือ สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองทรงกลมขนาด 15 นาโน เมตร ($3.67 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

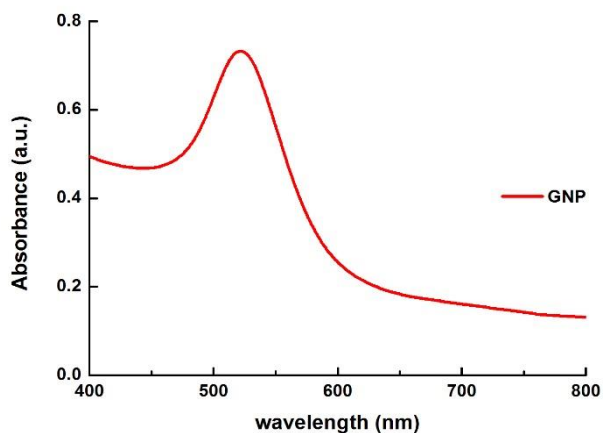
l คือ ระยะที่แสงผ่านตัวอย่าง หรือ ความกว้างของเซลล์ (cm)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลาย

(ก)

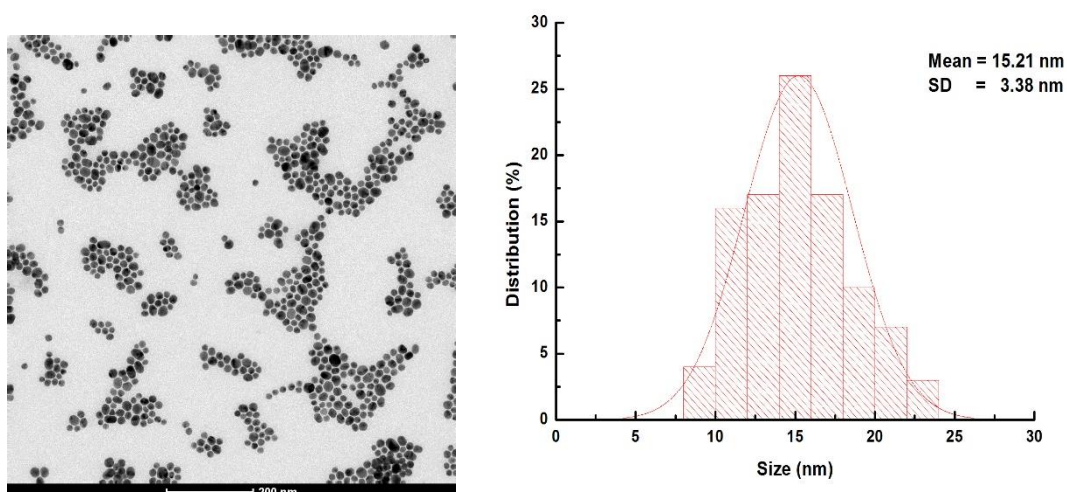


(ข)



รูปที่ 4.1 (ก) แสดงภาพถ่ายสารแขวนลอยอนุภาคนาโนทองทรงกลมที่กระจายตัวในน้ำดีไอ (ข) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นที่ 300-800 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทองทรงกลม

การศึกษาลักษณะของรูปร่างอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิค Transmission electron microscopy; TEM พบว่าลักษณะของอนุภาคนาโนทองมีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวสม่ำเสมอ แสดงดังรูปที่ 2 (ก) และจากการวัดขนาดของอนุภาคนาโนทองจากรูปที่ 4.2(ก) ผ่านการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคด้วยโปรแกรมอิมเมจเจ (Image J) เพื่อนำไปสร้างความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาค พบว่าอนุภาคนาโนทองทรงกลมที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 15.21 ± 3.38 นาโนเมตร และมีการกระจายตัวของอนุภาคขนาดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.2 (ข)

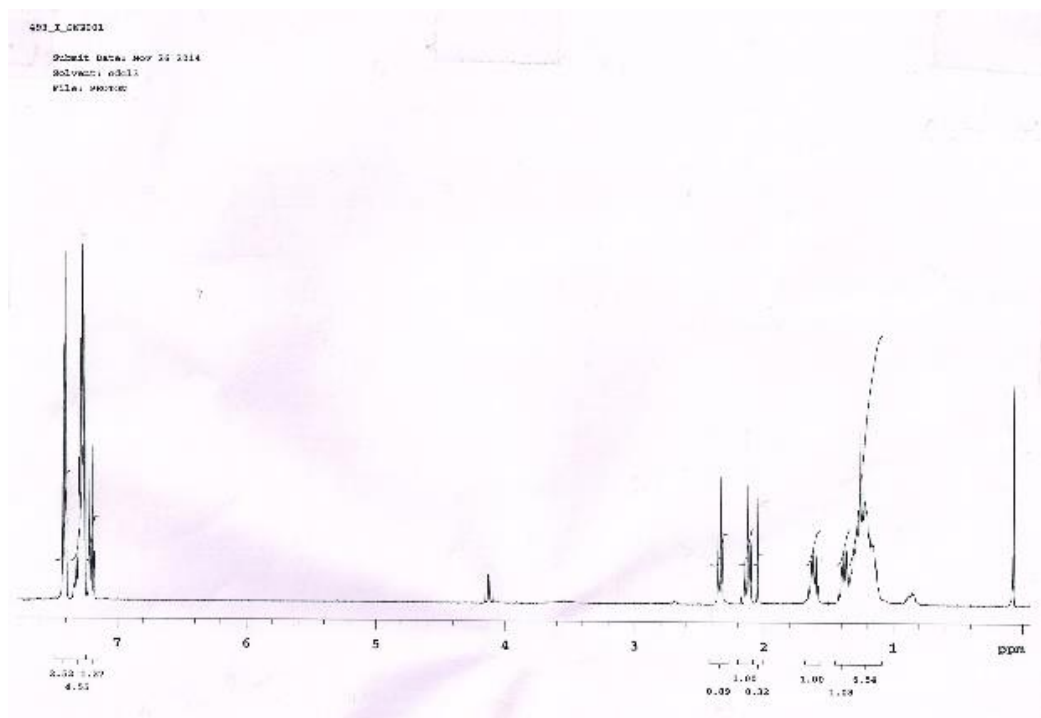


รูปที่ 4.2 (ก) ภาพถ่าย TEM แสดงลักษณะของอนุภาคนาโนทองทรงกลม และ (ข) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายตัวของอนุภาคกับขนาดของอนุภาคนาโนทองทรงกลม

4.2 การสังเคราะห์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ (Carboxylic acid-terminate ligand)

4.2.1 การเตรียมสารตั้งต้นทริทิล-เมอร์แคปโทอันเดคาโนอิก-แอซิด (Trt-mercaptoundecanoic acid)

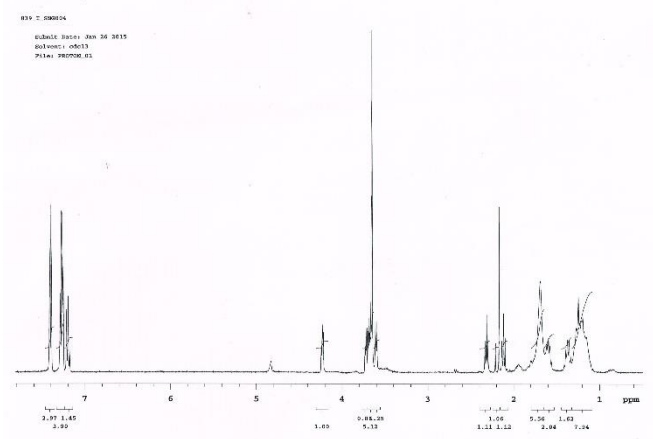
จากผลการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ทำให้สามารถทราบองค์ประกอบของสารได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบทริทิล-เมอร์แคปโทอันเดคาโนอิก-แอซิด โดยใช้คลอโรฟอร์มดี (chloroform-d , CDCl_3) เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบทริทิล-เมอร์แคปโทอันเดคาโนอิก-แอซิด พบว่าให้สัญญาณที่ 1.50-1.70 ($-(\text{CH}_2)_8-$), 2.00-2.20 ($-(\text{CH}_2)-$), 2.30 ($-(\text{CH}_2)-$) และ 7.20-7.50 ($((\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C})$) ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.3 ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ลิแกนด์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.3 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบทริทิล-เมอร์แคปโทอินเดคาโนอิก-แอซิด

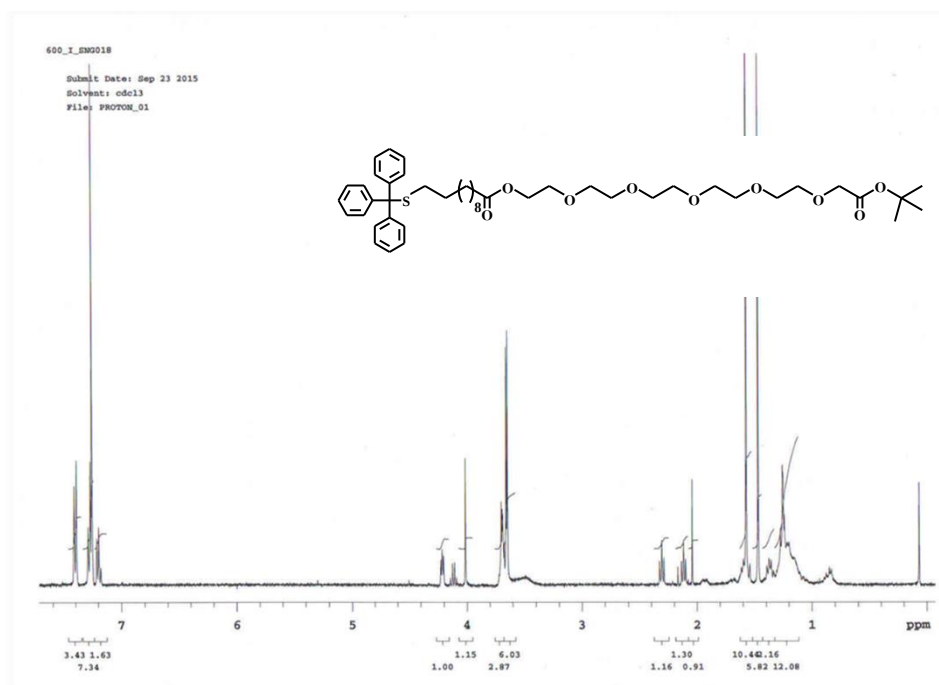
4.2.2 การเตรียมสารประกอบ 2

จากผลการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ทำให้สามารถทราบองค์ประกอบของสารได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 2 โดยใช้คลอโรฟอร์มดี (chloroform-d, CDCl_3) เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารของสารประกอบ 2 พบว่าให้สัญญาณที่ 2.00-2.20 ($-\text{CH}_2-$), 2.30 ($-\text{CH}_2-$), 3.60-3.80 ($-\text{CH}_2-$)₈, 4.20 ($-\text{CH}-$) และ 7.20-7.50 ($(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}$) ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.4 ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารประกอบ 2 สำหรับการสังเคราะห์ลิแกนด์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินต์ ในขั้นตอนต่อไปได้



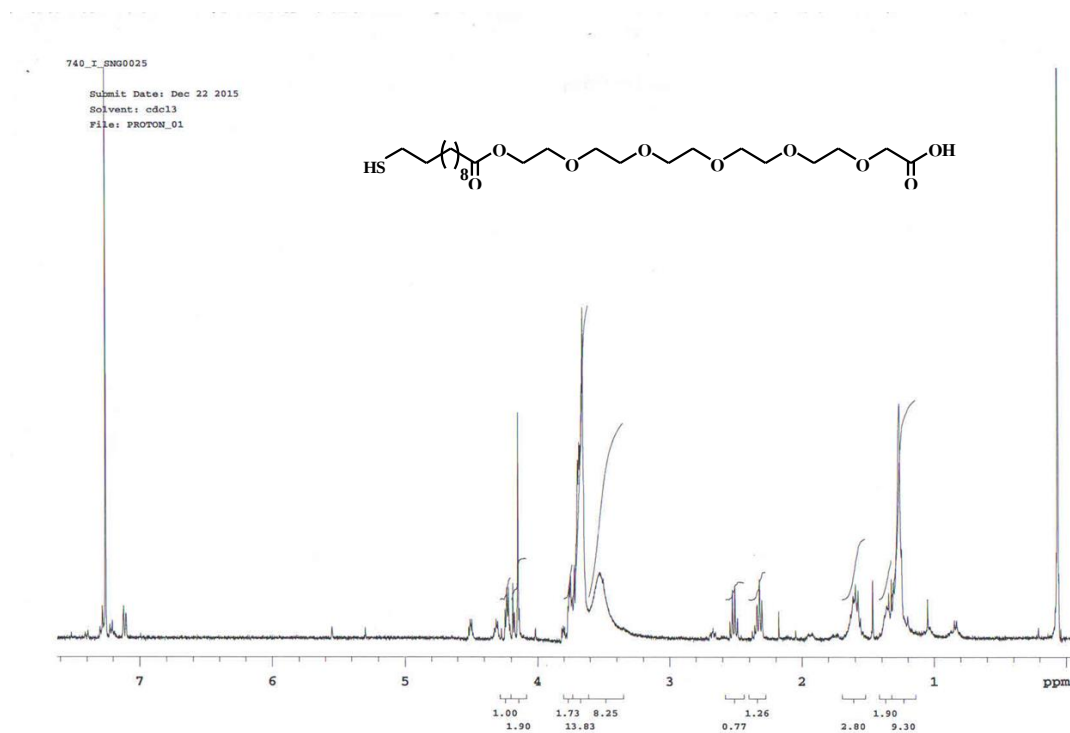
รูปที่ 4.4 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 2

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 3 โดยใช้คลอโรฟอร์มดี (chloroform-d , CDCl_3) เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 3 พบว่าให้สัญญาณที่ 1.20 ppm (m, 16H), 1.4 ppm (s, 9H), 2.10 ppm (t, 2H), 2.30 ppm (t, 2H), 3.6-3.8 ppm (m, 16H), 4.02 ppm (s, 2H) 4.2 ppm (t, 2H) และ 7.20-7.50 ppm (m, 15H) ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.5 ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารประกอบ 3 สำหรับนำไปตัดกรดเพื่อนำหมู่ปกป้องที่ปลายทั้งสองด้านออก ในขั้นตอนต่อไปได้



รูปที่ 4.5 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 3

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 3 หลังจากตัดกรดเพื่อนำเอาหมู่ปกป้องของปลายทั้งสองด้านออก เพื่อให้ได้โครงสร้างของคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด จากสเปกตรัม ^1H -NMR ของคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด พบว่าให้สัญญาณที่ 1.20-1.40 (m, 16H), 2.10 ppm (t, 2H), 2.30 ppm (t, 2H), 3.6-3.8 ppm (m, 16H), 4.02 ppm (s, 2H) และ 4.2 ppm (t, 2H) ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.6 ซึ่งสามารถนำไปใช้ป็นคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด สารประกอบ 3 สำหรับไปใช้ปรับปรุงพื้นผิวอนุภาคนาโนทองในขั้นตอนต่อไปได้



รูปที่ 4.6 แสดงสเปกตรัม ^1H -NMR ของคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด

4.3 การแลกเปลี่ยนคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนดบนอนุภาคนาโนทองทรงกลม

การแลกเปลี่ยนคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนดบนอนุภาคนาโนทองทรงกลมนั้น ก็เพื่อที่จะปรับปรุงและเพิ่มคุณสมบัติพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง ต่อการนำไปสร้างพันธะกับแอนติบอดี นอกจากนั้นยังช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคนาโนทองอีกด้วย สำหรับการแลกเปลี่ยนคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนดบนอนุภาคนาโนทองทรงกลม จะใช้หลักการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ปลายลิแกนด ซึ่งมีความว่องไวกับพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง โดยจะเข้าไปแทนที่โมเลกุลของซิเตรทที่เคลือบอยู่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง โดยซิเตรทที่เคลือบอยู่ที่พื้นผิวของอนุภาคนาโนทองนั้น มาจากขั้นตอนการสังเคราะห์ ในขั้นตอนการแลกเปลี่ยนจะใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองทรงกลม ต่อความ

เข้มข้นของคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์ เท่ากับ 1:5 โดยนำอนุภาคนาโนทองทรงกลมที่สังเคราะห์ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 14.09 นาโนโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิตร ใส่ลงในขวดกันกลมและกวนสารละลายทิ้งไว้ จากนั้นค่อยๆเติมคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์ที่ละลายในไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 70.45 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หลังจากเติมลิแกนด์ลงไปจะสังเกตเห็นสารละลายของอนุภาคนาโนทองจะค่อยๆเปลี่ยนจากสีแดงเข้มเป็นสีแดงอมม่วง จากนั้นเติม 0.1 โมลาร์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH) เพื่อปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 8 กวนสารละลายต่อเนื่อง 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน หลังจากนั้นนำสารละลายทองที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที เพื่อล้างส่วนเกินของลิแกนด์ออก 2-3 รอบ ละลายตะกอนของอนุภาคนาโนทองทรงกลมกลับด้วยน้ำกลั่นที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8

สารแขวนลอยอนุภาคนาโนทองทรงกลมหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์ที่ได้นั้น เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงและละลายตะกอนกลับด้วยน้ำกลั่นที่มีความเป็นเบสเล็กน้อยพบว่าอนุภาคมีการกระจายตัวได้ดีในน้ำกลั่น โดยสารแขวนลอยยังคงมีสีแดงเข้ม ดังรูปที่ 4.7 (ค) ซึ่งมีสีแดงเข้มเช่นเดียวกับอนุภาคนาโนทองซีเทรทที่ได้จากการสังเคราะห์ รูปที่ 4.7 (ก) แต่เมื่อนำสารแขวนลอยของอนุภาคนาโนทองซีเทรทที่ได้จากการสังเคราะห์ไปผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที บางส่วนของอนุภาคนาโนทองจะรวมกลุ่มกันเป็นตะกอนสีดำ ไม่สามารถละลายตะกอนกลับได้ และสีของสารแขวนลอยมีสีออกม่วงจางๆ ดังรูปที่ 4.7 (ข) ลักษณะการกระจายตัวในน้ำกลั่นได้ดีของอนุภาคนาโนทองหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์นั้น บ่งบอกถึงลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนไปของอนุภาคนาโนทองคือ การมีคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินเตลิแกนด์บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองนั้นทำให้อนุภาคนาโนทองกลมความเสถียรมากขึ้น

(ก)



(ข)

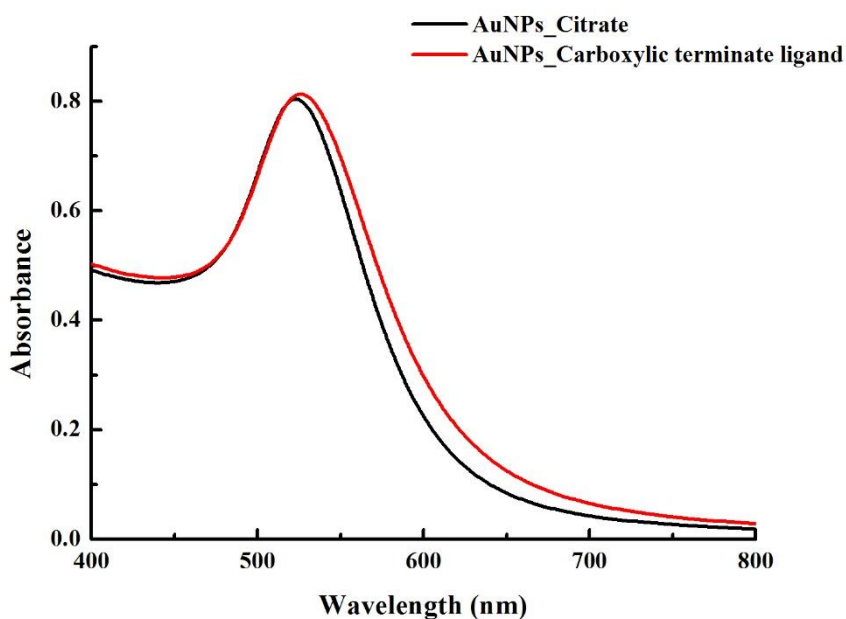


(ค)



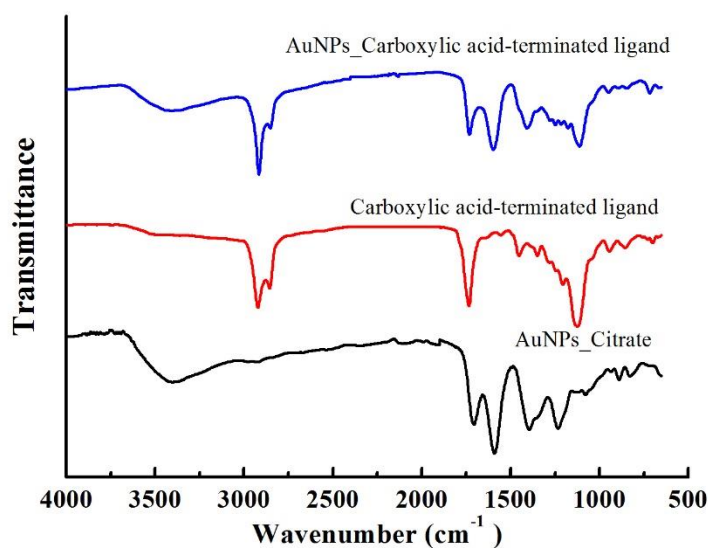
รูปที่ 4.7 แสดงภาพถ่ายสารแขวนลอย (ก) อนุภาคนาโนทองทรงกลมเคลือบผิวด้วยซิเตรทที่ได้จากการสังเคราะห์ (ข) อนุภาคนาโนทองทรงกลมเคลือบด้วยซิเตรทหลังจากการปั่นเหวี่ยง (ค) อนุภาคนาโนทองทรงกลมหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ หลังจากการปั่นเหวี่ยง ที่กระจายตัวในน้ำกลั่น

เมื่อนำสารแขวนลอยที่ได้ไปศึกษาคุณสมบัติทางแสงด้วยการวัดยูวี-วิสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร พบว่าลักษณะกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าความยาวคลื่น (wavelength) ของอนุภาคนาโนทองที่ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร แสดงดังเส้นกราฟสีแดงในรูปที่ 4.8 พบว่าสเปกตรัมจะเลื่อนทางไปขวามือเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสารแขวนลอยของอนุภาคนาโนทองก่อนปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ เส้นกราฟสีดำในรูปที่ 4.8 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่พื้นผิวของอนุภาคนาโนทองทรงกลมมีสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เมื่อมีคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ตรึงอยู่ที่พื้นผิว จึงทำให้ลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเลื่อนไปทางขวามือ



รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นที่ 400-800 นาโนเมตรของอนุภาคนาโนทองทรงกลมก่อนและหลังปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์

เมื่อนำอนุภาคนาโนทองหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ มาวิเคราะห์การสั่นพ้องพันธะเคมีของหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี (Infrared spectroscopy) โดยวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนทองซิเตรท และลิแกนด์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ ผลของสเปกตรัมการสั่นพ้องพันธะของหมู่ฟังก์ชันในอนุภาคนาโนทองซิเตรท ลิแกนด์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ และอนุภาคนาโนหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ แสดงดังสเปกตรัมสีดำ แดง และน้ำเงินตามลำดับ โดยสเปกตรัมของอนุภาคนาโนหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์นั้นจะแสดงพีคที่เป็นลักษณะการสั่นพ้องของหมู่แอลคิล ($-CH/CH_2$) ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 2915/2850 เปอร์เซนติเมตร หมู่คาร์บอนิล ($C=O$) ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1730 เปอร์เซนติเมตร หมู่คาร์บอกซิเลท (COO^-) ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1598 เปอร์เซนติเมตร รวมถึงการสั่นพ้องของพันธะของคาร์บอนกับออกซิเจน ($C-O-C$) และพันธะของคาร์บอนกับซิลเฟอ (C-S) ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1113 และ 719 เปอร์เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงการแลกเปลี่ยนลิแกนด์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์บนพื้นผิวอนุภาคนาโนทองทรงกลมได้สำเร็จ แสดงดังตารางที่ 1



รูปที่ 4.8 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของอนุภาคนาโนทองซิเตรท (ดำ) ลิแกนด์คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ (แดง) และอนุภาคนาโนหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก (น้ำเงิน) ตามลำดับ ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 500-400 ต่อเซนติเมตร

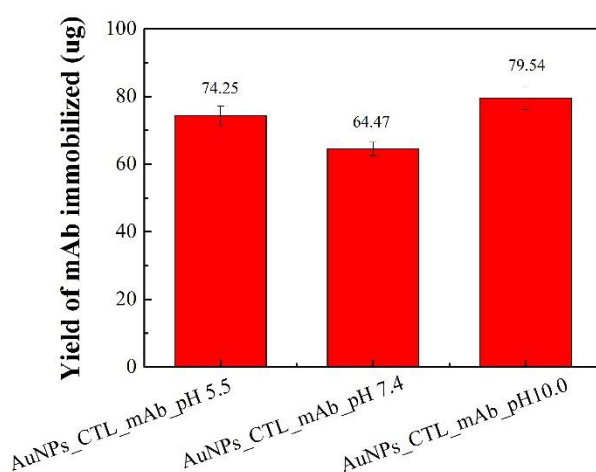
ตารางที่ 1 แสดงตำแหน่งการสั่นพ้องของหมู่ฟังก์ชันและพันธะต่างๆ ของอนุภาคนาโนทองซิทเรท คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ และอนุภาคนาโนหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ

Bond	AuNPs_Citrate	Carboxylic acid-terminated ligand	AuNPs_ Carboxylic acid-terminated ligand
C-H/C-H ₂	-	2923/2852	2915/2849
C=O (Carbonyl)	1706	1734	1734
COO ⁻ (Carboxylate)	1589	-	1598
C-H ₂	-	1451	1410
C-O-C	-	1122	1113
C-S	-	700	719

จากผลการวิเคราะห์อินฟราเรดสเปกตรัมพบว่าอนุภาคนาโนทองหลังปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ จะแสดงตำแหน่งการสั่นพ้องของหมู่คาร์บอนิลและคาร์บอกซิเลท ที่ตำแหน่งเลขคลื่นใกล้เคียงกับอนุภาคนาโนทองซิทเรท แต่คาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์นั้น จะแสดงการสั่นพ้องของหมู่คาร์บอนิลเพียงอย่างเดียว ไม่ปรากฏหมู่คาร์บอกซิเลททั้งนี้เนื่องจากการทดสอบด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี ผู้วิจัยได้ใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายลิแกนด์ จึงทำให้หมู่คาร์บอกซิลิกที่ปลายของลิแกนด์นั้นไม่แตกตัวเป็นคาร์บอกซิเลท ทำให้เส้นสเปกตรัมของคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ไม่แสดงพีคการสั่นพ้องของหมู่คาร์บอกซิเลท ซึ่งแตกต่างจากอนุภาคนาโนทองหลังปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ที่ผู้วิจัยได้ใช้น้ำกลั่นที่มีค่าเป็นเบสเล็กน้อย เป็นตัวละลายสารแขวนลอย ทำให้หมู่คาร์บอกซิลิกของปลายลิแกนด์ที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองทรกกลมนั้นสามารถแตกตัวเป็นหมู่คาร์บอกซิเลทได้ จึงแสดงพีคการสั่นพ้องของหมู่คาร์บอกซิเลทดังรูปที่ 4.8 และตารางที่ 1 ซึ่งหลังจากนี้ผู้วิจัยจะดำเนินการแก้ไขโดยการนำคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลลิแกนด์ละลายในน้ำกลั่นที่มีค่าเป็นเบสเล็กน้อย แล้วนำมาเทียบผลการวิเคราะห์อีกครั้ง

4.4 การตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนอนุภาคนาโนทอง

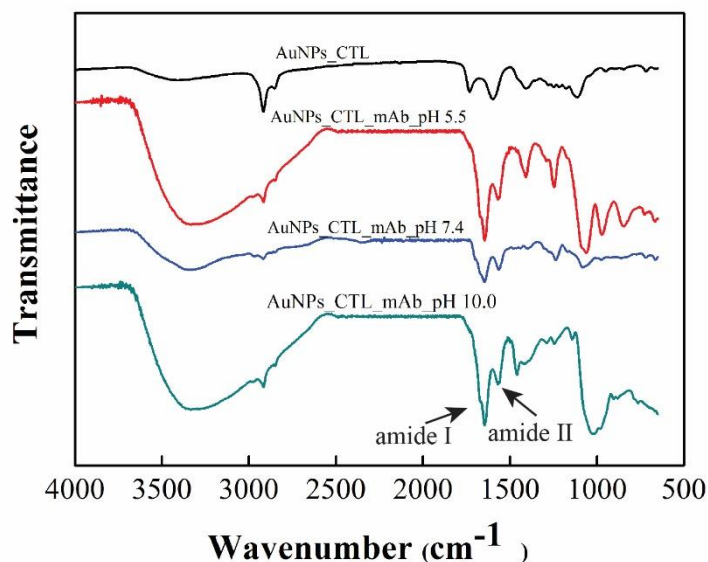
นำส่วนสารละลายใสด้านบนที่เหลือจากการตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เหลือด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford assay) นำค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมที่ได้ที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนอนุภาคนาโนทอง ที่สภาวะการเหนี่ยวนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พีเอช 5.5, 7.4 และ 10.0 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าที่สภาวะพีเอชเท่ากับ 10.0 มีปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนอนุภาคนาโนทองสูงที่สุด เท่ากับ 79.54 ± 3.42 รองลงมาคือสภาวะที่พีเอชเท่ากับ 5.5 และ 7.4 มีค่าเท่ากับ 74.25 ± 2.82 และ 64.47 ± 2.03 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกตรึงลงบนอนุภาคนาโนทองที่ผ่านการเหนี่ยวนำการเหนี่ยวนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พีเอช 5.5, 7.4 และ 10.0 ตามลำดับ

เมื่อนำอนุภาคนาโนทองหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลแลนด์ และตรึงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (AuNP_CTL_mAb) ที่สภาวะการเหนี่ยวนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พีเอช 5.5, 7.4 และ 10.0 มาวิเคราะห์การสั่นพ้องพันธะเคมีของหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) โดยเปรียบเทียบกับผลสเปกตรัมการสั่นพ้องของอนุภาคนาโนทองหลังปรับปรุงผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มินัลแลนด์ แสดงดังเส้นสเปกตรัมสีดำ โดยผลของสเปกตรัมการสั่นพ้องพันธะเคมีของหมู่ฟังก์ชันในอนุภาคนาโนทองหลังตรึงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่สภาวะการเหนี่ยวนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พีเอช 5.5, 7.4 และ 10.0 แสดงดังสเปกตรัมสีแดง น้ำเงิน และเขียวตามลำดับ โดยสเปกตรัมของอนุภาคนาโนทองหลังตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกสภาวะจะพิกที่เป็นลักษณะการสั่นพ้องของหมู่เอไมด์ I และ เอไมด์ II ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1654 และ 1539 เปอร์เซนติ

เมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนทองคำก่อนตรึงโมโนคลอนอลแอนติบอดี จะไม่แสดงพีคการสั่นพ้องที่ตำแหน่งเลขคลื่นดังกล่าว ซึ่งแสดงถึงสภาวะการเหนี่ยวนำโมโนคลอนอลแอนติบอดีที่พีเอช 5.5, 7.4 และ 10.0 สามารถตรึงโมโนคลอนอลแอนติบอดีพื้นผิวอนุภาคนาโนทองคำทรงกลมได้สำเร็จ แสดงดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของอนุภาคนาโนหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก (ดำ) อนุภาคนาโนหลังตรึงด้วยโมโนคลอนอลแอนติบอดีที่สภาวะการเหนี่ยวนำโมโนคลอนอลแอนติบอดีที่พีเอช 5.5 (แดง), 7.4 (น้ำเงิน) และ 10.0 (เขียว) ตามลำดับ ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 500-400 ต่อเซนติเมตร

จากผลการศึกษาข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าอนุภาคนาโนทองคำหลังจากปรับปรุงพื้นผิวด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มิเนตลิแกนด์ ที่ทางทีมผู้วิจัยออกแบบ และสังเคราะห์ขึ้นนั้น ช่วยเพิ่มคุณสมบัติของอนุภาคนาโนทองคำทรงกลมในการกระจายตัว และสามารถละลายกลับได้เมื่อผ่านขบวนการทำแห้ง ในสภาวะที่สารละลายมีค่าพีเอชตั้งแต่ 3.5 ถึง 10.0 และสามารถเก็บในรูปของแข็งและของเหลวที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียสได้ เป็นเวลา 4 เดือน โดยที่คุณสมบัติเชิงแสงไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนั้นยังพบว่าการปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองคำด้วยคาร์บอกซิลิก แอซิด-เทอร์มิเนตลิแกนด์ ทำให้สามารถตรึงโมโนคลอนอลแอนติบอดีลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองคำได้ โดยผ่านการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของลิแกนด์ และหมู่เอมีนของโมโนคลอนอลแอนติบอดี และพบว่าปริมาณโมโนคลอนอลแอนติบอดีที่ถูกตรึงบนอนุภาคนาโนทองคำ ขึ้นอยู่กับสภาวะการเหนี่ยวนำให้กรดอะมิโนแตกตัวที่ค่าพีเอชต่างกัน และจากผลการวิเคราะห์อินฟราเรดสเปกตรัมสามารถสรุปได้ว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรึงโมโนคลอนอลแอนติบอดีที่ถูก

ตรึงบนอนุภาคนาโนทองได้ ซึ่งในหัวข้อถัดไปผู้วิจัยจะศึกษาความเสถียรของอนุภาคหลังจากตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สภาวะต่างๆ อาทิ เช่น ในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ในสารละลายพีเอชต่างๆ และในน้ำนม เพื่อสำหรับการนำไปทดสอบกับแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบนำส่งที่มีความเสถียรสูง สามารถนำมาพรีซแห้ง ทำให้สามารถเก็บแบบผง สะดวกต่อการขนส่ง นอกจากนี้ ลิแกนด์ที่ออกแบบขึ้นยังสามารถสร้างพันธะกับแอนติบอดีได้ และสามารถนำไปตรวจวัดแบคทีเรียได้ ซึ่งการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารนั้นมีความสำคัญอย่างมาก ต่อการส่งออกอาหารของไทย ถ้าเราสามารถพัฒนาการตรวจวัดแบคทีเรียที่สะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ราคาแพง จะส่งผลให้อุตสาหกรรมการส่งออกอาหารของไทยดีขึ้นในอนาคต

เพื่อให้ได้ระบบการตรวจวัดที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญคือการควบคุมตำแหน่ง และทิศทางของการติดแอนติบอดีเข้ากับทอง ซึ่งจะส่งผลอย่างยิ่งยวดต่อความไวในการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งการศึกษากลไกอันตรกิริยาระหว่างวัสดุไฮบริดกับพื้นผิวของแบคทีเรีย

ผลผลิตของงานวิจัย

1. Sawinee Ngermpimai, Theerapong Puangmali, Atcha Kopwittaya, Patcharaporn Tipayawat, Apichart Suksamrarn and Apiwat Chompoosor* High Stability of Gold Nanoparticles Modified with Carboxylic Terminate Ligand upon freeze-drying based-biosensing application In prep. For submission to RSC Advances

เอกสารอ้างอิง

- 1) Langer, R. Drug delivery and targeting *Nature* **1998**, 392, 5-10.
- 2) อรุณศรี ปรีเปรม, อีระศักดิ์ ดารงรุ่งเรือง, ปราโมทย์ มหคุณากร. นานโนเทคโนโลยีกับสุขภาพ. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2555.
- 3) Liggins RT., Burt HM. Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2002; 54:191-202.
- 4) Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Mueller RH, Verbavatz JM, Langer R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews** 1995; 16:215-233.
- 5) Harashima H, Sakata K, K Funato, Kiwada H. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. **Pharmaceutical Research** 1994; 11: 402-406.
- 6) Moghimi SM, Hedeman H, Muir IS, L Illum, Davis SS. An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen. **Biochimica et Biophysica Acta** 1993; 1157:233-240.
- 7) Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials** 2006; 27: 4356-4373.
- 8) Dunn SE, Brindley A, Davis SS, Davies MC, Illum L. Polystyrene-poly (ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the in vitro cell interaction and in vivo biodistribution. **Pharmaceutical Research** 1994; 11: 1016-1022.
- 9) Jones MC, Leroux JC. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 1999; 48(2): 101-111.
- 10) Kim SY, Shin IG, Lee YM, Cho CS, Sung YK. Methoxy poly(ethylene glycol) and epsilon-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviours. **Journal of Controlled Release** 1998; 51: 13-22.
- 11) Nagavarma BVN, Yadav Hemant KS, Ayaz A, Vasudha LS, Shivakumar HG. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research** 2012; 5: 16-23.

- 12) Nyakas C, Mäder K, Neubert R, Parak JW. Polyelectrolyte nanocapsules as modern drug delivery system for lipophilic drug candidates. Dissertation Faculty of Science, The Martin Luther University of Halle-Wittenberg 2012 3:4-8208.
- 13) Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 2007; 65: 259–269.
- 14) Yang XC, Samanta B, Agasti SS, Jeong Y, Zhu ZJ, Rana S, Miranda OR, Rotello VM. Drug Delivery using Nanoparticle-Stabilized Nanocapsules. **Angewandte Chemie International Edition** 2011; 50(2): 477–481.
- 15) Jiang B, Hu L, Gao C, Shen J. Crosslinked polysaccharide nanocapsules: Preparation and drug release properties. **Acta Biomaterialia** 2005; 2: 9–18.
- 16) Tomar A, Garg G. Short Review on Application of Gold Nanoparticles. **Global Journal of Pharmacology** 2013; 7 (1): 34-38.
- 17) Trivedi N, Patel N, Upadhyay UM, Shah Viral. Gold nanoparticulate drug delivery system: A review. *Pharmacie Globale (IJCP)* 2012; 6(01).
- 18) Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. Synthesis of Gold Nanoparticles. **Discussions of the Faraday Society** 1951; 11: 55-75.
- 19) Sau TK, Pal A, Jana NR, Wang ZL, Pal T. Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles. **Journal of Nanoparticle Research** 2001; 3: 257-261.
- 20) Chen Y. **Photo-cross-linked Surfactant Shells Improve Stability and Bioconjugate Chemistry of Nanoparticle Bioconjugates**. [Ph.D. Thesis in Chemistry]. Minnesota University; 2007.
- 21) Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of Thiol-derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications** 1994; 7: 801-802.
- 22) Torchilin, V. F. **Nat. Rev. Drug Discovery** 2005, 4, 145-160.
- 23) Cavalieri, F.; Postma, A.; Lee, L.; Caruso, F. **ACS Nano**, 2009, 3, 234–240.
- 24) Mak, W. C.; Bai, J.; Chang, X. Y.; Trau, D. **Langmuir** 2009, 25, 769-775.
- 25) Muller, R. H.; Mader, K.; Gohla, S. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 2000, 50, 161-177.
- 26) Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. **Nano Lett.** 2006, 6, 662- 668.
- 27) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2002, 54, 631-651.

- 28) Jang, S. H.; Wientjes, M. G.; Lu, D.; Au, J. L. S. **Pharm. Res.** 2003, 20, 1337-1350.
- 29) De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. **Adv. Mater.** 2008, 20, 4225-4241.
- 30) Daniel, M. C.; Astruc, D. **Chem. Rev.** 2004, 104, 293-346.
- 31) Templeton, A. C.; Wuelfing, M. P.; Murray, R. W. **Accounts Chem. Res.** 2000, 33, 27-36.
- 32) Tsoli, M.; Kuhn, H.; Brandau, W.; Esche, H.; Schmid, G. **Small** 2005, 1, 841-844.
- 33) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. **Nat. Nanotechnol.** 2007, 2, 751-760.
- 34) Park, H.; Yang, J.; Seo, S.; Kim, K.; Suh, J.; Kim, D.; Haam, S.; Yoo, K. H. **Small**. 2008, 4, 192-196.
- 35) McCoy, C. P.; Rooney, C.; Edwards, C. R.; Jones, D. S.; Gorman, S. P. **J. Am. Chem. Soc.** 2007, 129, 9572-9573.
- 36) Han, G.; You, C. C.; Kim, B. J.; Turingan, R. S.; Forbes, N. S.; Martin, C. T.; Rotello, V. M. **Angew. Chem. Int. Edit.** 2006, 45, 3165-3169.
- 37) Agasti, S. S.; Chompoosor, A.; You, C. C.; Ghosh, P.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. **J. Am. Chem. Soc.** 2009, 131, 5728-5729.
- 38) Desai, M.P.; Labhasetwar, V.; Walter, E.; Levy, R.J.; Amidon, G.L. **Pharm. Res.** 1997, 14, 1568-1573.

High Stability of Gold Nanoparticles Modified with Carboxylic Terminate Ligand upon freeze-drying based-biosensing application

Sawinee Ngernpimai,¹ Theerapong Puangmali,¹ Atcha Kopwitthaya,² Patcharaporn Tippayawat,^{3,4} Apichart Suksamrarn⁵ and Apiwat Chompoosor^{5*}

¹*Materials Science and Nanotechnology Program and Department of Physics, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*

²*National Electronics and Computer Technology center, 112 Thailand Science Park, Pathumthani, 12120, Thailand*

³*Division of Clinical Microbiology/Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*

⁴*The Center for Research & Development of Medical Diagnostic Laboratories/Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

⁵*Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, 10240, Thailand*

*Corresponding author's email: apiwat@ru.ac.th

ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNP) with their good optical and chemical properties have promoted several applications. However, they have easy to aggregate and non-redisperse with inducing of various stresses. In many application, the long term stability of AuNPs in various stress and their bioconjugates in common biological buffers or practical sample are seriously recommended. In this article, we present the designed ligand for modification AuNPs to improve their stable and functional. We observed the effect buffers pH, ion strength, freeze-drying stress and protein absorption on the colloidal stability of AuNPs modified our ligand designed (Au-CTL) using UV-vis absorption spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). We found that the Au-CTL were high stable in buffer pH range 5-10 and against aggregated in high concentration electrolytes. The lyophilize product of Au-CTL is easy redispersed in DI water and biological buffers. In addition, the designed ligand was effectively prevented the nonselective binding of BSA and any proteins in practical sample and supported of long-period storage on dried powder form. Finally, we conjugated Au-CTL with monoclonal antibody to *Listeria monocytogenese* (mAb-anti *L. monocytogenese*) and successfully used this conjugate as sensing probe for *Listeria monocytogenese* (*L. monocytogenese*) detection.

Keywords: Gold nanoparticles, Stability, freeze-drying, surface modification, functionalization.