



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์คอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์และการทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน
Synthesis of composites of alumina and iron oxide nanoparticles and study of their vaccine adjuvant properties

ชื่อนิสิต นางสาวกาญจนาภา ด้วงนคร

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์คอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์และการ
ทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน

Synthesis of composites of alumina and iron oxide nanoparticles
and study of their vaccine adjuvant properties

โดย

นางสาวกาญจนาภา ต้วงนคร

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

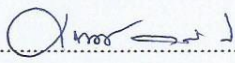
ปีการศึกษา 2560

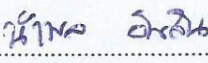
โครงการ การสังเคราะห์คอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์และการทดสอบความเป็นสาร
เสริมฤทธิ์วัคซิ้น

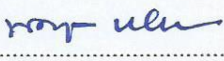
โดย นางสาวกาญจนาภา ด้วงนคร

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

 ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กณศ วงษ์ระวี)

 อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.นำพล อินสิน)

 กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

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

วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์คอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์และการทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวกาญจนาภา ด้วงนคร เลขประจำตัว 5733058023

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.นำพล อินสิน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

ปัจจุบันระบบนำส่งวัคซีนรูปแบบอนุภาคนาโนเริ่มเป็นที่สนใจในการนำมาใช้ในการพัฒนาวัคซีนมากขึ้น เนื่องจากสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนได้หรือมีสมบัติเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน งานวิจัยนี้จึงได้ทำการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาซึ่งมีสมบัติเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนและอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สามารถแสดงปรากฏการณ์ superparamagnetic หรือสามารถถูกเหนี่ยวนำโดยสนามแม่เหล็กภายนอกไปยังบริเวณเป้าหมายได้โดยยังมีความเสถียรทางคอลลอยด์ โดยทำการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตทั้งหมด 2 แบบด้วยกัน คือ แบบ core-shell ที่มีอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์เป็นส่วน core และอะลูมินาเป็นส่วน shell และแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา พบว่านาโนคอมพอสิตแบบ core-shell มีขนาด 20 นาโนเมตร และแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนอนุภาคนาโนอะลูมินามีขนาดประมาณ 200 และ 400 นาโนเมตร ซึ่งนาโนคอมพอสิตทั้ง 2 แบบสามารถแสดงปรากฏการณ์ superparamagnetic ได้ จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเดนไดรติกเซลล์ พบว่าที่ความเข้มข้น 10 และ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ นาโนคอมพอสิตทั้ง 2 แบบนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และจากการทดสอบหาปริมาณ Cytokine ที่เซลล์ผลิต (IL-12, IFN- γ) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันกำจัดสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย พบว่านาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนอนุภาคนาโนอะลูมินาขนาด 200 นาโนเมตร มีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุ้น IL-12 ได้ และขนาด 400 นาโนเมตรมีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุ้น IFN- γ ได้ แต่จำเป็นต้องมีการทดลองซ้ำและเพิ่มเติมเพื่อหาข้อสรุปสมบัติการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ชัดเจน

คำสำคัญ: นาโนคอมพอสิต, เหล็กออกไซด์, อะลูมินา, ระบบนำส่งวัคซีน, สารเสริมฤทธิ์วัคซีน

Project Title Synthesis of composites of alumina and iron oxide nanoparticles and study of their vaccine adjuvant properties

Student Name Miss Kanjanapa Duangnakorn Student ID 5733058023

Advisor Name Numpon Insin, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

Nowadays, nanoparticle-based vaccine carriers become interesting materials to be used in vaccine development because they can enhance vaccine efficacy as they can act as vaccine adjuvants. In this work, nanocomposites of alumina nanoparticle, which has been reported as a vaccine adjuvant, and iron oxide nanoparticles, which exhibit superparamagnetic behavior or able to be induced by an external magnetic field to the targeted area, were synthesized in two approaches. The first approach is a core-shell particle that has iron oxide nanoparticle as its core and alumina as its shell. The second one is iron oxide nanoparticle-decorated alumina nanoparticle. It was found that the core-shell particles were in the size of 20 nm, and the iron oxide nanoparticle-decorated particles were in the size of around 200 and 400 nm. Both types of nanocomposites can exhibit superparamagnetic behavior. From cytotoxicity study on dendritic cells, at the concentration of 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$, both types of the nanocomposites showed low cytotoxicity. Moreover, from the quantitative analysis of cytokine (IL-12, IFN- γ) that the cells produced to activate immune cells to eliminate any foreign matter in the body, it was found that iron oxide nanoparticle-decorated composites with the size of 200 nm showed a tendency to stimulate IL-12 production, and with the size of 400 nm showed some signals of IFN- γ stimulation, but further and repeated studies have to be done to make a conclusion on their immune stimulation properties.

Keywords: Nanocomposites, iron oxide, alumina, vaccine carrier, adjuvant

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและรายงานฉบับนี้จะไม่สำเร็จได้เลยหากไม่ได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ อาจารย์ ดร.นำพล อินสิน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทนตแพทย์หญิง ดร.พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย อีกทั้งสละเวลาในการให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ มาโดยตลอดเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการ NI ทุกคนที่ให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคต่าง ๆ การดูแลรักษาเครื่องมือ และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็น รวมถึงให้กำลังใจและเป็นห่วงเสมอมา

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณกำลังใจ ความห่วงใยและความช่วยเหลือจากครอบครัว เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ผู้วิจัยระลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่มีได้เอื้อนามมา ณ ที่นี้

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 ทฤษฎีที่สำคัญ	2
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย	5
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 2 การทดลอง	10
2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์	10
2.1.1 เครื่องมือที่ใช้	10
2.1.2 สารเคมีที่ใช้	10
2.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้	10
2.1.4 วิธีการทดลอง	11
2.2 การสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell	12
2.2.1 เครื่องมือที่ใช้	12
2.2.2 สารเคมีที่ใช้	12
2.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้	12
2.2.4 วิธีการทดลอง	13
2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนอะลูมินา	13
2.3.1 เครื่องมือที่ใช้	13
2.3.2 สารเคมีที่ใช้	13
2.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้	14
2.3.4 วิธีการทดลอง	14
2.4 การสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา	14
2.4.1 เครื่องมือที่ใช้	14

2.4.2 สารเคมีที่ใช้	15
2.4.3 อุปกรณ์ที่ใช้	15
2.4.4 วิธีการทดลอง	15
2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเดนไดรติกเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay	16
2.5.1 เครื่องมือที่ใช้	16
2.5.2 สารเคมีที่ใช้	16
2.5.3 อุปกรณ์ที่ใช้	17
2.5.4 วิธีการทดลอง	17
2.6 การหาปริมาณ Cytokine ที่เซลล์ผลิตด้วยเทคนิค ELISA	17
2.6.1 เครื่องมือที่ใช้	17
2.6.2 สารเคมีที่ใช้	17
2.6.3 อุปกรณ์ที่ใช้	17
2.6.4 วิธีการทดลอง	18
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	19
3.1 อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์	19
3.1.1 X-ray Powder Diffraction (XRD)	19
3.1.2 Transmission Electron Microscopy (TEM)	20
3.1.3 ปรากฏการณ์ superparamagnetic	21
3.2 นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell	22
3.2.1 X-ray Powder Diffraction (XRD)	22
3.2.2 Transmission Electron Microscopy (TEM)	23
3.2.3 Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDX)	24
3.2.4 ปรากฏการณ์ superparamagnetic	26
3.3 อนุภาคนาโนอะลูมินา	26
3.3.1 X-ray Powder Diffraction (XRD)	26
3.3.2 Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM)	27
3.4 นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา	30
3.4.1 X-ray Powder Diffraction (XRD)	30
3.4.2 Transmission Electron Microscopy (TEM)	31
3.4.3 Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectroscopy	32

(SEM/EDX)

3.4.4 ปฏิกิริยาการจับ superparamagnetic

35

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay

36

3.6 การหาปริมาณ Cytokine ที่เซลล์ผลิตด้วยเทคนิค ELISA

38

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

40

เอกสารอ้างอิง

41

ประวัติผู้วิจัย

44



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลการเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซินโรคโปลิโอของ γ - Al_2O_3	8
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณธาตุองค์ประกอบของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้	25
ตารางที่ 3 ตารางสรุปผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ ที่ $R=0.4$ และ 0.6	30
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณธาตุองค์ประกอบของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาขนาด 200 นาโนเมตร ($R=0.4$) ที่สังเคราะห์ได้	34
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณธาตุองค์ประกอบของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาขนาด 400 นาโนเมตร ($R=0.6$) ที่สังเคราะห์ได้	34

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 แสดงการจัดเรียงตัวของ magnetic dipoles ของ (a) ferromagnetism (b) antiferromagnetism และ (c) ferrimagnetism	3
รูปที่ 1.2 แสดงพฤติกรรมของสารที่มีสภาวะแม่เหล็กแบบต่างๆ ภายใต้สนามแม่เหล็ก (a) สาร Diamagnetic (b) สาร Paramagnetic (c) สาร Ferromagnetic (d) สารที่แสดงปรากฏการณ์ superparamagnetic	3
รูปที่ 1.3 แสดงขั้นตอนการทดสอบ Sandwich ELISA	4
รูปที่ 1.4 (a) รูป FE-SEM ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ (b) รูป TEM ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้	5
รูปที่ 1.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์หลังจากทำการบ่มอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ (แท่งสีขาว) และอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ - Ovalbumin ความเข้มข้นต่างๆ (แท่งสีน้ำเงิน) กับเซลล์ COS-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	6
รูปที่ 1.6 รูป TEM ของนาโนคอมพอสิตขนาด (a) 24.86 ± 4.38 nm (PPS-20), (b) 45.24 ± 5.00 nm (PPS-40), (c) 98.10 ± 8.88 nm (PPS-100) (d) 202.22 ± 6.70 nm (PPS-200).	7
รูปที่ 1.7 แสดงความเป็นแม่เหล็กภายใต้สนามแม่เหล็กของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ (M) และนาโนคอมพอสิตต่างๆ	7
รูปที่ 1.8 (A) แสดงโครงสร้างของ Hapten ที่ใช้ในการทดลอง (B) แสดงผลของขนาดอนุภาคอะลูมินาจากการทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีในน้ำเหลืองของหนู โดยแสดงเป็นค่าการดูดกลืนแสง (* - มีการใส่ Freund's adjuvant)	8
รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์	11
รูปที่ 2.2 แสดงการตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของเครื่องควบคุมอุณหภูมิในขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์	12
รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell	13
รูปที่ 2.4 แผนภาพการสังเคราะห์อนุภาคนาโนอะลูมินา	14
รูปที่ 2.5 แผนภาพการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา	16
รูปที่ 2.6 แสดงการตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของเครื่องควบคุมอุณหภูมิในขั้นตอนการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา	16

รูปที่ 3.1 แสดง X-ray Diffraction pattern ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ (สีน้ำเงิน) และ magnetite (Fe_3O_4) มาตรฐาน (PDF #19-0629) (สีส้ม)	20
รูปที่ 3.2 แสดงรูป TEM ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้	20
รูปที่ 3.3 แสดงการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้	21
รูปที่ 3.4 แสดงการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ ก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (ซ้าย) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (ขวา)	21
รูปที่ 3.5 แสดง X-ray Diffraction pattern ของนาโนคอมพอสิตแบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ (สีน้ำเงิน) magnetite (Fe_3O_4) มาตรฐาน (PDF #19-0629) (สีแดง) และ $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ มาตรฐาน (PDF#46-1212) (สีเขียว)	22
รูปที่ 3.6 แสดง X-ray Diffraction pattern ของนาโนคอมพอสิตแบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ (สีน้ำเงิน) magnetite (Fe_3O_4) มาตรฐาน (PDF #19-0629) (สีแดง) และ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ มาตรฐาน (PDF#50-0741) (สีเขียว)	23
รูปที่ 3.7 แสดงรูป TEM ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้	24
รูปที่ 3.8 แสดงการกระจายตัวของขนาดของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้	24
รูปที่ 3.9 แสดงผลการทำ Mapping โดยใช้เทคนิค SEM/EDX ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ (A) ภาพตัวอย่างของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ (B) ตำแหน่งของเหล็ก (C) ตำแหน่งของอะลูมิเนียม และ (D) ตำแหน่งของออกซิเจน	25
รูปที่ 3.10 แสดงการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ (ซ้าย) ก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (ขวา) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก	26
รูปที่ 3.11 แสดง X-ray Diffraction pattern ของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.4 (สีน้ำเงิน) อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.6 (สีแดง) และ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ มาตรฐาน (PDF#50-0741) (สีเขียว)	27
รูปที่ 3.12 แสดงรูป FESEM ของอนุภาคนาโนอะลูมินา R=0.4 ที่สังเคราะห์ได้	28
รูปที่ 3.13 แสดงการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคนาโนอะลูมินา R=0.4 ที่สังเคราะห์ได้	28
รูปที่ 3.14 แสดงรูป FESEM ของอนุภาคนาโนอะลูมินา R=0.6 ที่สังเคราะห์ได้	29
รูปที่ 3.15 แสดงการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคนาโนอะลูมินา R=0.6 ที่สังเคราะห์ได้	29
รูปที่ 3.16 แสดง X-ray Diffraction pattern ของนาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.4 (สีน้ำเงิน) นาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.6 (สีแดง)	31

γ -Al ₂ O ₃ มาตรฐาน (PDF#50-0741) (สีเขียว) และ magnetite (Fe ₃ O ₄) มาตรฐาน (PDF #19-0629) (สีม่วง)	
รูปที่ 3.17 แสดงรูป TEM ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.4	32
รูปที่ 3.18 แสดงรูป TEM ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.6	32
รูปที่ 3.19 แสดงผลการทำ Mapping โดยใช้เทคนิค SEM/EDX ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ R=0.4 ที่สังเคราะห์ได้ (A) ภาพตัวอย่างของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ (B) ตำแหน่งของอะลูมิเนียม (C) ตำแหน่งของออกซิเจน และ (D) ตำแหน่งของเหล็ก	33
รูปที่ 3.20 แสดงผลการทำ Mapping โดยใช้เทคนิค SEM/EDX ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ R=0.6 ที่สังเคราะห์ได้ (A) ภาพตัวอย่างของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ (B) ตำแหน่งของอะลูมิเนียม (C) ตำแหน่งของออกซิเจน และ (D) ตำแหน่งของเหล็ก	33
รูปที่ 3.21 แสดงการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของ (A) อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (B) อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (C) นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (D) นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก	35
รูปที่ 3.22 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเดนไดรติกเซลล์ เมื่อทดสอบกับอนุภาคนาโนชนิดต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ 3 การทดลอง	37
รูปที่ 3.23 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเดนไดรติกเซลล์ เมื่อทดสอบกับอนุภาคนาโนชนิดต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ 3 การทดลอง	37
รูปที่ 3.24 แสดงปริมาณ IL-12 ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ของเดนไดรติกเซลล์กับอนุภาคนาโนชนิดต่างๆที่สังเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นต่างๆ	38
รูปที่ 3.25 แสดงปริมาณ IFN- γ ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ของเดนไดรติกเซลล์กับอนุภาคนาโนชนิดต่างๆที่สังเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นต่างๆ	39

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

การให้วัคซีนเป็นวิธีการหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับว่าประสบความสำเร็จในการใช้ป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส โดยทั่วไปวัคซีนจะประกอบด้วยส่วนประกอบของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคหรือที่เรียกว่า แอนติเจน ที่ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ลงหรือตาย [1] เมื่อร่างกายได้รับวัคซีน แอนติเจนจะถูกกินโดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจน (Antigen presenting cell) เช่น เดนไดรติคเซลล์ (Dendritic cell) เซลล์มาโครฟาจ (Macrophage) เป็นต้น ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะนำเสนอแอนติเจนให้แก่เซลล์ทีลิมโฟไซท์ (T lymphocyte) เพื่อกระตุ้นการเกิดภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไป [2] ดังนั้นการนำส่งแอนติเจนไปที่เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจน จึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะต้องคำนึงถึงเมื่อทำการพัฒนาวัคซีน [3] วัคซีนจะมีประสิทธิภาพดีขึ้นหากมีการใช้สารเสริมฤทธิ์วัคซีน (Adjuvant) ที่ช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันร่วมด้วย โดยสารเสริมฤทธิ์วัคซีนนั้นจะอยู่ในรูปของสารประกอบหรือระบบนำส่ง [4] แต่ในปัจจุบันโรคบางโรคนั้นยังมีวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันที่ยังไม่มีประสิทธิภาพพอ

ระบบนำส่งวัคซีนเริ่มเข้ามามีบทบาทในการพัฒนาวัคซีนมากขึ้นเนื่องจากสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในการสร้างภูมิคุ้มกันได้ โดยป้องกันการสลายตัวของแอนติเจนจากสภาวะแวดล้อมในร่างกาย ทำให้แอนติเจนอยู่ได้นานขึ้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งสมบัติทางชีวภาพและความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มการนำส่งแอนติเจนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ควบคุมการปลดปล่อยแอนติเจนได้อย่างต่อเนื่อง และสามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนได้ อนุภาคนาโนนิยมนำมาใช้เป็นระบบนำส่งเนื่องจากสามารถออกแบบองค์ประกอบ ขนาด รูปร่าง และพื้นผิวได้ และด้วยขนาดที่ใกล้เคียงกับองค์ประกอบภายในเซลล์จึงทำให้สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย [5,6]

อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์นับว่าเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีน เนื่องจากสามารถเข้ากั้ระบบทางชีวภาพได้ดี สามารถปรับแต่งพื้นผิวได้หลากหลาย และที่สำคัญคือ สามารถเกิดปรากฏการณ์ superparamagnetic หรือความสามารถในการถูกเหนี่ยวนำโดยสนามแม่เหล็กภายนอก ซึ่งปรากฏการณ์นี้สามารถนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ไปยังเซลล์เป้าหมายได้ [7]

สารเสริมฤทธิ์วัคซีนที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ อนุพันธ์ของอะลูมิเนียม เช่น อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ $Al(OH)_3$ อะลูมิเนียมฟอสเฟต $AlPO_4$ [8] เนื่องจากอะลูมิเนียมออกไซด์ Al_2O_3 หรืออะลูมินา มีองค์ประกอบคล้ายกับอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ จึงทำให้ได้รับความสนใจว่าจะสามารถเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนได้เช่นกัน และจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานว่าอนุภาคนาโนของอะลูมินานั้นสามารถเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนได้ [9]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์เพื่อนำมาใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีนและทำการทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนของอนุภาคดังกล่าว

1.2 ทฤษฎีที่สำคัญ

อนุภาคนาโน (Nanoparticle)

อนุภาคนาโน คือ อนุภาคที่มีขนาดต่ำกว่า 100 นาโนเมตร อย่างน้อยใน 1 มิติ อนุภาคนาโนมีสมบัติแตกต่างจากวัสดุที่มีขนาดใหญ่และมักขึ้นอยู่กับขนาด เช่น สมบัติทางแสง สมบัติแม่เหล็ก สมบัติทางกายภาพ เป็นต้น อนุภาคนาโนมีพื้นที่ผิวสูงมากเมื่อเทียบกับวัสดุขนาดใหญ่ [10,11]

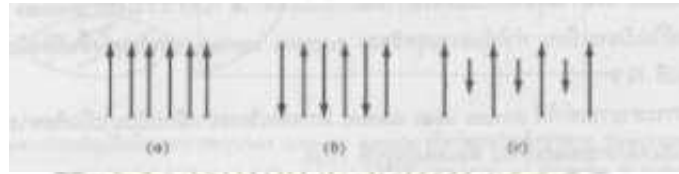
คอมพอสิต (Composite)

คอมพอสิต คือ วัสดุที่ประกอบด้วยวัสดุ 2 ประเภทขึ้นไป โดยที่องค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันและจะต้องไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน อาจเกิดจากการผสมหรือการสร้างพันธะ ซึ่งสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของคอมพอสิตจะขึ้นอยู่กับรูปร่างและลักษณะทางกายภาพของวัสดุองค์ประกอบ [12,13]

สมบัติแม่เหล็กและปรากฏการณ์ superparamagnetic

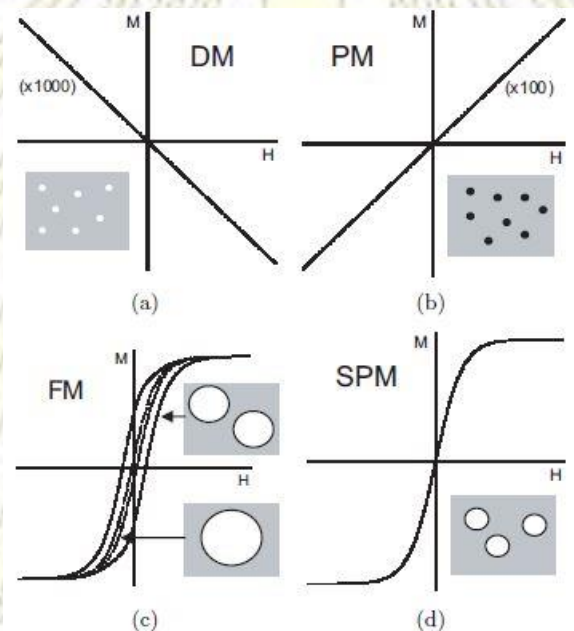
สมบัติแม่เหล็กของสารโดยทั่วไปสามารถแบ่งออกได้หลายลักษณะ ได้แก่

1. **Paramagnetism** - เป็นสภาวะแม่เหล็กที่มีค่าสภาพรับไว้ได้ทางแม่เหล็ก (magnetic susceptibility) เล็กน้อยและมีค่าเป็นบวกเมื่ออยู่ในสนามแม่เหล็ก และจะหายไปเมื่อวัสดุนั้นถูกนำออกจากสนามแม่เหล็ก โดยความเป็นแม่เหล็กนั้นจะไปในทิศทางเดียวกันกับสนามแม่เหล็ก ดังรูปที่ 1.2 (b)
2. **Diamagnetism** - เป็นสภาวะแม่เหล็กที่มีค่า magnetic susceptibility เล็กน้อยและมีค่าเป็นลบเมื่ออยู่ในสนามแม่เหล็ก และจะหายไปเมื่อวัสดุนั้นถูกนำออกจากสนามแม่เหล็ก โดยความเป็นแม่เหล็กนั้นจะไปในทิศทางตรงข้ามกับสนามแม่เหล็ก ดังรูปที่ 1.2 (a)
3. **Ferromagnetism** - เป็นสภาวะแม่เหล็กที่มีค่า magnetic susceptibility สูง ถึงแม้จะไม่มีผลของสนามแม่เหล็กภายนอก (มีความจำแม่เหล็ก - magnetic memory) ดังรูปที่ 1.2 (c) โดยสภาพแม่เหล็กนั้นเกิดจากการที่อิเล็กตรอนจัดเรียงไปในทิศทางเดียวกันทั้งหมด ดังรูปที่ 1.1 (a) โดยความเป็นแม่เหล็กของสาร Ferromagnetic จะสูงกว่าสาร Ferrimagnetic
4. **Antiferromagnetism** - เป็นสภาวะแม่เหล็กอีกชนิดหนึ่งที่มีค่า magnetic susceptibility ต่ำ ถึงแม้จะมีอิเล็กตรอนเดี่ยวที่มีการจัดเรียงตัวกัน แต่อิเล็กตรอนจัดเรียงตัวในทิศทางตรงกันข้ามสลับกันไป ดังรูปที่ 1.1 (b) ทำให้ความเป็นแม่เหล็กนั้นหักล้างกันหมด
5. **Ferrimagnetism** - เป็นสภาวะแม่เหล็กอีกชนิดหนึ่งที่มีค่า magnetic susceptibility สูง มีความจำแม่เหล็กเช่นกัน อิเล็กตรอนจัดเรียงตัวในทิศทางตรงกันข้ามสลับกันไปแต่หักล้างกันไม่หมด ดังรูปที่ 1.1 (c) ทำให้ยังคงมีความเป็นแม่เหล็กไปในทิศทางสุทธิทิศทางหนึ่ง [14,15]



รูปที่ 1.1 แสดงการจัดเรียงตัวของ magnetic dipoles ของ (a) ferromagnetism (b) antiferromagnetism และ (c) ferrimagnetism [14]

โดยปรากฏการณ์ superparamagnetic เป็นสภาวะทางแม่เหล็กที่จะเกิดขึ้นในอนุภาคนาโนขนาดเล็กของสารประเภท Ferromagnetic หรือ Ferrimagnetic เท่านั้น โดยสนามแม่เหล็กภายนอกต้องนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำทำให้เกิดความเป็นแม่เหล็กแก่อนุภาคนาโนเช่นเดียวกับสารประเภท Paramagnetic แต่ค่า magnetic susceptibility นั้นจะสูงกว่าของสารประเภท Paramagnetic มาก และไม่แสดงความจำทางแม่เหล็ก ดังรูปที่ 1.2 (d) [16]



รูปที่ 1.2 แสดงพฤติกรรมของสารที่มีสภาวะแม่เหล็กแบบต่างๆ ภายใต้สนามแม่เหล็ก (a) สาร Diamagnetic (b) สาร Paramagnetic (c) สาร Ferromagnetic (d) สารที่แสดงปรากฏการณ์ superparamagnetic [15]

วัคซีน (Vaccine)

วัคซีน คือ ชีววัตถุที่ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัส วัคซีนมักประกอบด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค (แอนติเจน) ที่ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ลงหรือตายซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้รับรู้ว่าเป็นแอนติเจนดังกล่าวคือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันจะทำลายและจดจำแอนติเจนนั้น เมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนดังกล่าวอีกภายหลัง ระบบภูมิคุ้มกันจะสามารถรับรู้และทำลายได้ง่ายขึ้น [17]

สารเสริมฤทธิ์วัคซีน (Adjuvant)

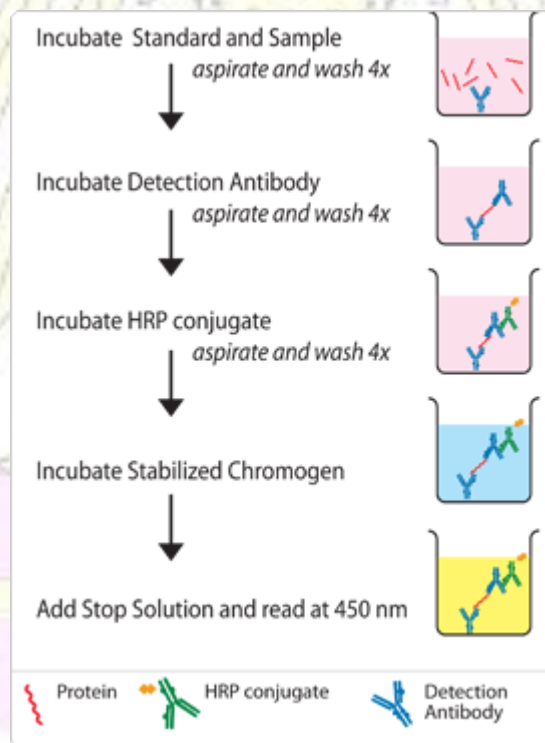
สารเสริมฤทธิ์วัคซีน คือ สารประกอบหรือระบบนำส่งที่มีคุณสมบัติในการช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน จึงมักมีการผสมลงไปในวัคซีนเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดปริมาณแอนติเจนที่ต้องใช้ในการผลิต [4]

อะลูมินา (Alumina)

อะลูมินา หรือ อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3) เป็นสารประกอบของอะลูมิเนียมและออกซิเจน สามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติซึ่งส่วนมากจะอยู่ในรูปของแร่คอร์ันดัม ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) ซึ่งมีโครงสร้างผลึกแบบ trigonal อะลูมินามีโครงสร้างผลึกหลายแบบ เช่น แบบ cubic ($\gamma, \eta\text{-Al}_2\text{O}_3$) แบบ monoclinic ($\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$) เป็นต้น ซึ่งอะลูมินาที่มีโครงสร้างผลึกต่างกันจะมีสมบัติต่างกัน [18]

การทดสอบ Sandwich ELISA

การทดสอบ Sandwich ELISA เป็นการทดสอบที่นิยมใช้สำหรับวัดปริมาณ cytokines หรือ โปรตีนที่สร้างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อก่อให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบต่าง ๆ โดยมีหลักการทดสอบคร่าว ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 แสดงขั้นตอนการทดสอบ Sandwich ELISA [19]

- cytokines ที่เซลล์ผลิตจะเข้าจับกับ capture antibody ที่จำเพาะต่อ cytokines ประเภทนั้น

- detection antibody จะเข้าจับกับ cytokines ที่จับอยู่กับ capture antibody ในขั้นตอนก่อนหน้า โดยจะประกบกัน ลักษณะคล้ายกับแซนด์วิช
- secondary antibody จะเข้าจับกับ detection antibody หลังจากนั้น substrate solution จะถูกใส่เข้าไปเพื่อก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณ cytokines ได้ และทำการใส่ stop buffer เพื่อหยุดการเปลี่ยนแปลงสีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยปริมาณ cytokines ที่เซลล์ผลิตนั้นจะแปรผันตรงกับความเข้มสีของสาร

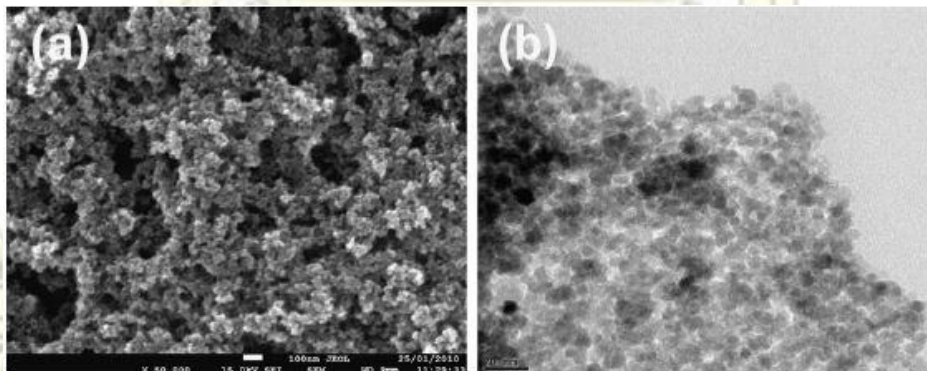
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

- 1) สังเคราะห์คอมพอสิตของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์
- 2) ทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้

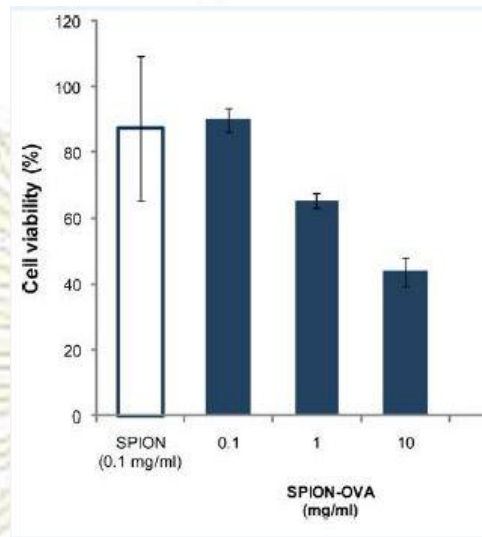
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ว่าอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีน จึงได้มีงานวิจัยจำนวนหนึ่งรายงานผลการนำส่งวัคซีน ดังนี้

Ho และคณะ [7] ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ด้วยวิธี Co-precipitate โดยใช้ FeCl_2 และ FeCl_3 เป็นแหล่งของเหล็ก และใช้ trisodium citrate เป็นตัวรักษาความเสถียร เพื่อนำมาใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีน โดยใช้ Ovalbumin เป็น model antigen อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้นั้นมีขนาด 15 ± 3 นาโนเมตร (รูปที่ 1.4) สามารถเกิดปรากฏการณ์ superparamagnetic ได้ทั้งก่อนและหลังการปรับแต่งพื้นผิวด้วย Ovalbumin และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (รูปที่ 1.5) แต่งานวิจัยนี้ยังไม่มีผลการนำอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน



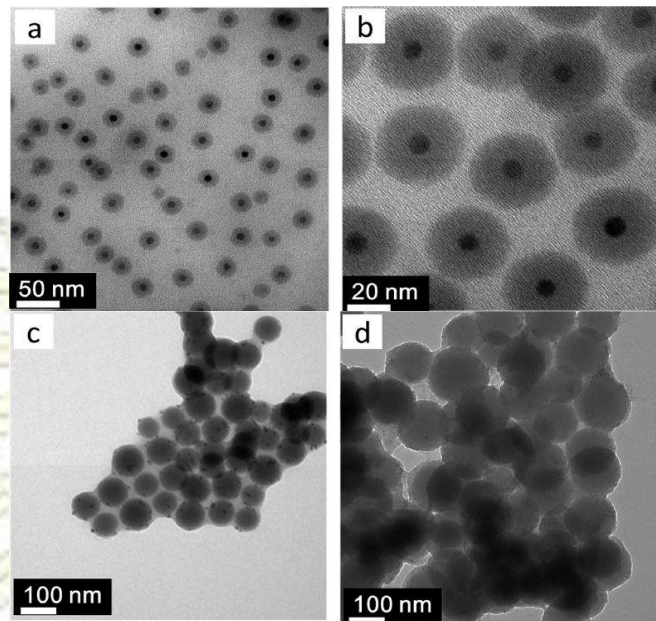
รูปที่ 1.4 (a) รูป FE-SEM ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ (b) รูป TEM ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ [7]



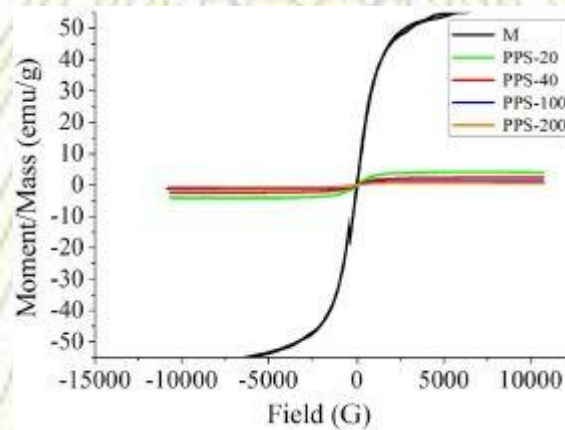
รูปที่ 1.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์หลังจากทำการบ่มอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ (แท่งสีขาว) และอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ – Ovalbumin ความเข้มข้นต่างๆ (แท่งสีน้ำเงิน) กับเซลล์ COS-7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง [7]

Injumba และคณะ [20] ทำการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ ซิลิกา และโพลีเอทิลีน ไกลคอล (PEG) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางชีวภาพ อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ถูกสังเคราะห์โดยใช้เทคนิค thermal decomposition โดยใช้ $\text{Fe}(\text{oleate})_3$ เป็นสารตั้งต้น ทางผู้วิจัยได้สังเคราะห์นาโนคอมพอสิต 2 แบบ คือ แบบ core-shell ที่มีอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์เป็นส่วน core และถูกล้อมรอบด้วยซิลิกาเป็นส่วน shell ขนาด 20 และ 40 นาโนเมตร และอนุภาคนาโนซิลิกาที่ตกแต่งพื้นผิวด้วยอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ ขนาด 100 และ 200 นาโนเมตร (รูปที่ 1.6) แล้วทำการปกคลุมพื้นผิวนาโนคอมพอสิตด้วย PEG จากผลที่ได้พบว่า ความสามารถในการเกิดปรากฏการณ์ superparamagnetic ยังคงอยู่แต่ความแรงของความเป็นแม่เหล็กจะขึ้นอยู่กับปริมาณของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ภายในนาโนคอมพอสิตนั้น ๆ (รูปที่ 1.7) และนาโนคอมพอสิตที่มีขนาดต่ำกว่า 100 นาโนเมตร และมีความเข้มข้นต่ำกว่า $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์และก่อให้เกิดการอักเสบของเซลล์ต่ำ

จากการศึกษางานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้เลือกรูปแบบการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตทั้ง 2 แบบมาใช้ เนื่องจากนาโนคอมพอสิตทั้ง 2 แบบให้ขนาดอนุภาคที่มีความแตกต่างกัน และนาโนคอมพอสิตทั้ง 2 แบบสามารถเกิดปรากฏการณ์ superparamagnetic ได้



รูปที่ 1.6 รูป TEM ของนาโนคอมพอสิตขนาด (a) 24.86 ± 4.38 nm (PPS-20), (b) 45.24 ± 5.00 nm (PPS-40), (c) 98.10 ± 8.88 nm (PPS-100) (d) 202.22 ± 6.70 nm (PPS-200). [20]

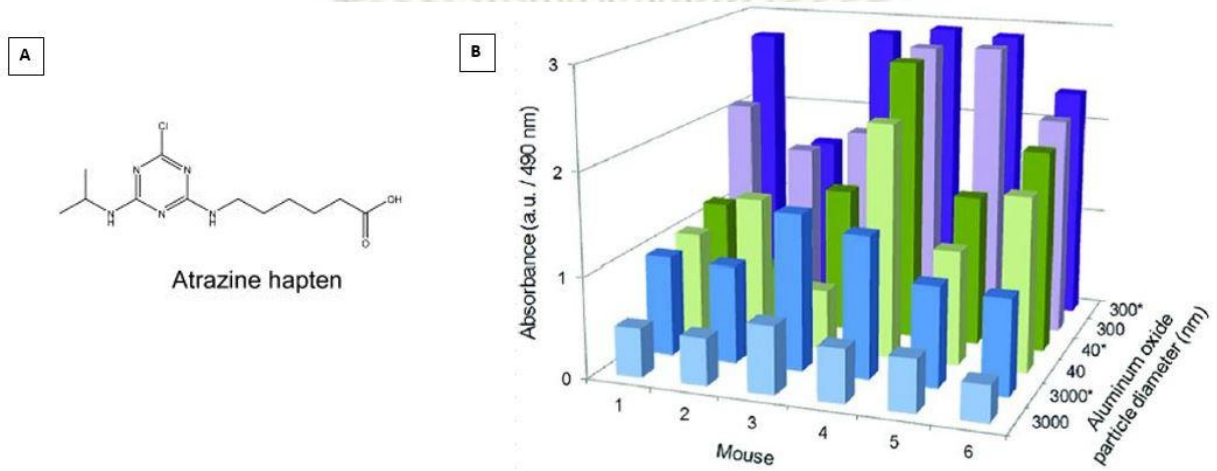


รูปที่ 1.7 แสดงความเป็นแม่เหล็กภายใต้สนามแม่เหล็กของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ (M) และนาโนคอมพอสิตต่างๆ [20]

สำหรับอนุภาคอะลูมินานั้น งานวิจัยที่ผ่านมาที่ยืนยันความสามารถในการเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนของอะลูมินา มีดังนี้

Maquieira และคณะ [21] ได้ทำการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาด้วยสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ (Hapten) โครงสร้างดังรูปที่ 1.8 (A) โดยอนุภาคนาโนอะลูมินาทำหน้าที่เป็นตัวพาและสารเสริมฤทธิ์ อนุภาคนาโนอะลูมินาที่ใช้มีขนาด 40 และ 3000 นาโนเมตรซึ่งอยู่ในรูป amorphous และขนาด 300 นาโนเมตรที่มีความเป็นผลึก (crystalline) โดยอะลูมินาที่ใช้มีเฟสเป็น $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ จากผลที่ได้พบว่า การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเกี่ยวข้องกับขนาดของอนุภาคและความเป็นผลึก ซึ่งอนุภาคที่ให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันสูงสุดคือ อนุภาคขนาด 300 นาโนเมตร (crystalline) และ

การใช้พันธะโควาเลนต์ในการยึดติดโมเลกุลกับอนุภาคนาโนอะลูมินานั้นสามารถทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น เมื่อเทียบกับการที่ระบบภูมิคุ้มกันไม่มีการตอบสนองจากการใส่ Hapten เพียงอย่างเดียวหรือ การผสม Hapten กับอนุภาคนาโนอะลูมินา (รูปที่ 1.8 (B))



รูปที่ 1.8 (A) แสดงโครงสร้างของ Hapten ที่ใช้ในการทดลอง (B) แสดงผลของขนาดอนุภาคอะลูมินาจากการทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีในน้ำเหลืองของหนู โดยแสดงเป็นค่าการดูดกลืนแสง (* - มีการใส่ Freund's adjuvant) [21]

Drescher และคณะ [22] ได้ทำการทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์ของ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ สำหรับวัคซีนโรคโปลิโอ โดยทำการผสม $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ที่สังเคราะห์ได้กับวัคซีนโรคโปลิโอแล้วทำการฉีดให้หนูตะเภา 2 ครั้ง จากผลที่ได้ (ตารางที่ 1) พบว่า การฉีดวัคซีนที่มีการผสม $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 2 ครั้งหรือการฉีดครั้งแรกด้วยวัคซีนที่ผสม $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ แล้วตามด้วยวัคซีนที่ไม่มีการผสม สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้สูงกว่าการฉีดวัคซีนปกติ 2 ครั้งมาก คณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ สามารถเป็นสารเสริมฤทธิ์ให้แก่วัคซีนโรคโปลิโอได้ แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเก่า จึงยังไม่มีผลการทดลองควบคุมขนาดของอนุภาค $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$

Vaccine no.	E 1 (adsorbed)			E 2 (unadsorbed)		
	Mg Al_2O_3 /ml	16.6			0	
Relative virus concentration %	83.3			100		
Titer against type	1	2	3	1	2	3
Geometric mean titer 1st to 2nd vaccination	8†	16	8	<4	4	16
Geometric mean titer after 2nd vaccination‡	128	512	128	4	8	16
Ratio§	32	64	8	1	1	1

* Groups of 10 guinea pigs received 2 vaccinations (1 ml) in 28-day time interval.

† Geometric mean of reciprocal titers.

‡ Twenty-ninth to 38th day after secondary vaccination.

§ Ratio of titers after secondary vaccination in experiment E 1 and E 2.

ตารางที่ 1 แสดงผลการเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนโรคโปลิโอของ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ [22]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์ ทั้งหมด 2 ประเภทด้วยกัน คือ core-shell และการใช้อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งลงบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา โดยให้มีขนาดอยู่ในช่วง 100 – 500 นาโนเมตร โดยอ้างอิงจากงานของ Maquieira และคณะ ที่รายงานไว้ว่าขนาดของอนุภาคอะลูมินาที่ให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันสูงสุด คือ อนุภาคขนาด 300 นาโนเมตร และนำอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบกับเดนไดรติกเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการนำเสนอ แอนติเจน (Antigen presenting cell) ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อศึกษาว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้นั้นสามารถ กระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและนำมาใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีนได้หรือไม่



บทที่ 2

การทดลอง

2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์

2.1.1 เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องชั่งดิจิตอล
2. เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot plate)
3. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
4. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller)
5. ปัมสุญญากาศ (Vacuum pump)
6. เต้าให้ความร้อน (Heating mantle)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง
8. เครื่อง X-ray Diffractometer (XRD) รุ่น DMAX2200/Ultima+ (Rigaku)
9. เครื่อง Transmission Electron Microscope (TEM) รุ่น JEM-2100 (JOEL)

2.1.2 สารเคมีที่ใช้

1. Sodium hydroxide (NaOH)
2. Iron (III) chloride (FeCl_3)
3. Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
4. Hexane (C_6H_{14})
5. Oleic acid ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$)
6. 1-Octadecene ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}$)

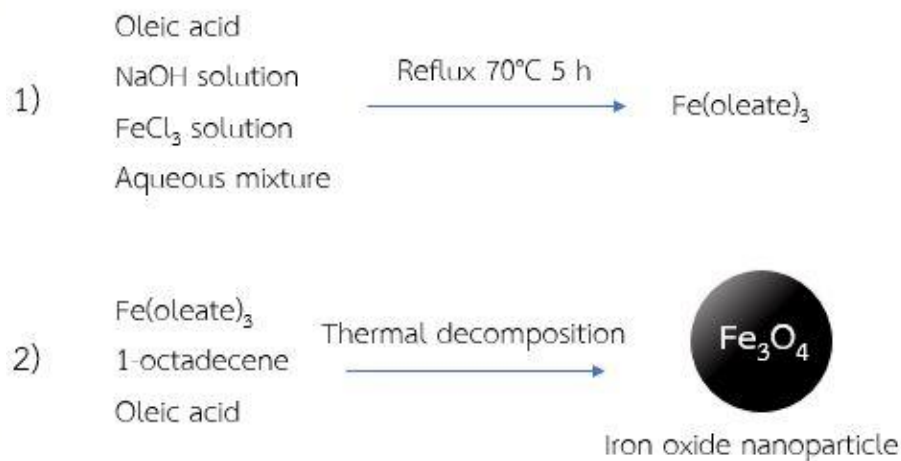
2.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้

1. ปีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
3. ซ้อนตักสาร
4. กระจบอทดวง
5. หลอดหยด
6. ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร
7. ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
8. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
9. กรวยแยก
10. ขวด 3 คอ
11. หลอดเซนติฟิวขนาด 50 มิลลิลิตร

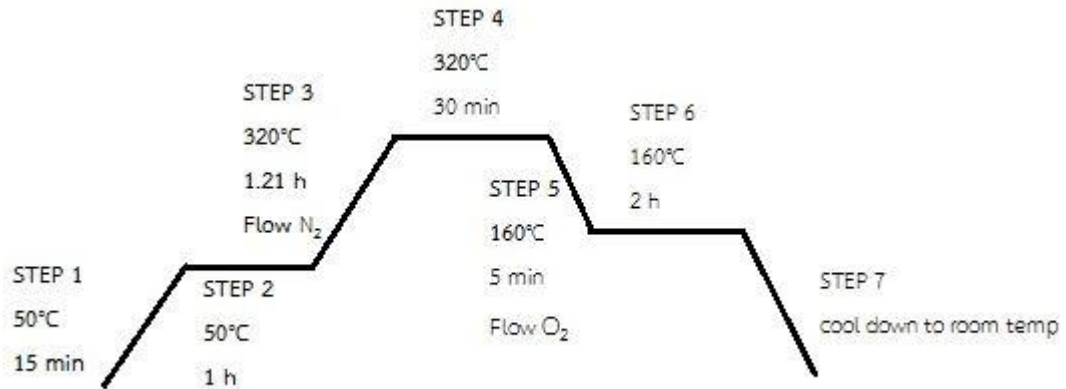
2.1.4 วิธีการทดลอง

ละลาย NaOH 0.96 กรัม (24 mmol) ด้วยน้ำ DI 10 มิลลิลิตร และละลาย FeCl₃ 1.29 กรัม (8 mmol) ด้วยน้ำ DI 10 มิลลิลิตร ซึ่ง oleic acid 6.764 กรัม (24 mmol) ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย NaOH และสารละลาย FeCl₃ ลงไป ตามลำดับ เติมน้ำละลายผสมของ เอทานอล:น้ำ DI:ไซโคลเฮกเซน อัตราส่วน 16:12:28 โดยปริมาตร(มิลลิลิตร) ลงไป หลังจากนั้นเอาไป reflux ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยใช้แท่งแม่เหล็กในการคนสาร เมื่อสารที่ได้เย็นลงแล้ว นำไปสกัดด้วยน้ำ DI 3 ครั้ง ครั้งละ 6 มิลลิลิตรโดยใช้กรวยแยก เก็บชั้น organic (ชั้นบน) ไว้ในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร นำสารชั้น organic ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator จนสารเหนียว จะได้ Fe(oleate)₃ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์

ซึ่ง oleic acid: Fe(oleate)₃: 1-octadecene อัตราส่วน 1:6:38 โดยโมล ในขวด 3 คอ จากนั้นค่อยๆให้ความร้อนแก่สารด้วย heating mantle จนมีอุณหภูมิ 320°C ที่ความเร็ว 3.3°C ต่อนาทีโดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิเป็นตัวควบคุม ทำภายใต้สุญญากาศ ค้างที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 30 นาทีภายใต้แก๊ส N₂ จากนั้นลดอุณหภูมิลงไปที่ 160°C ภายใต้บรรยากาศปกติ ใช้แท่งแม่เหล็กในการคนสารตลอดกระบวนการ นำสารที่ได้ไปล้างหลายๆครั้งด้วย เฮกเซน:เอทานอล อัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตรโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (4,000 rpm 5 นาที) จะได้อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ เก็บอนุภาคที่ได้ในไซโคลเฮกเซน



รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์



รูปที่ 2.2 แสดงการตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของเครื่องควบคุมอุณหภูมิในขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์

2.2 การสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell

2.2.1 เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องซังดิจิตอล
2. Sonicator
3. เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง
5. เครื่อง X-ray Diffractometer (XRD) รุ่น DMAX2200/Ultima+ (Rigaku)
6. เครื่อง Transmission Electron Microscope (TEM) รุ่น JEM-2100 (JOEL)
7. เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) รุ่น JSM-54 10LV (JOEL)

2.2.2 สารเคมีที่ใช้

1. Cyclohexane (C₆H₁₂)
2. Polyoxyethylene (5) nonylphenylether (Igepal CO-520)
3. Ammonia solution 25% (NH₄OH)
4. Ethanol (C₂H₅OH)
5. Aluminum isopropoxide (Al[OCH(CH₃)₂]₃)

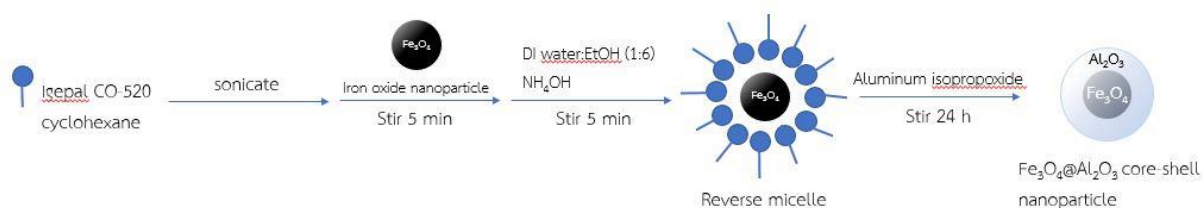
2.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. กระบอกตวง
3. หลอดหยด
4. ปีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
5. ปีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร
6. ไมโครปิเปต 100 – 1000 ไมโครลิตร

7. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
8. ซ้อนตักสาร
9. หลอดเซนติฟิวขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2.4 วิธีการทดลอง

ชั่ง Igepal CO-520 9.8 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมไซโคลเฮกเซน 84 มิลลิลิตร ลงไป นำไป sonicate จนได้ของเหลวใสเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้แท่งแม่เหล็กคนสารตลอดการสังเคราะห์ ใส่อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ในไซโคลเฮกเซน ความเข้มข้น 60 mg/mL 600 μ L ลงไปที่ละหยด ทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลายผสม น้ำ DI:เอทานอล อัตราส่วน 1:6 โดยปริมาตร 1 มิลลิลิตรและ NH_4OH 0.5 มิลลิลิตร ซ้ำๆ ทิ้งไว้ 5 นาที ชั่ง aluminum isopropoxide 0.03 กรัม ละลายในเอทานอล 9 มิลลิลิตร นำไป sonicate เพื่อช่วยให้ละลายได้ดีขึ้น เติม aluminum isopropoxide ที่เตรียมลงไป 1.5 มิลลิลิตร (5 mg) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำสารที่ได้มาล้างด้วยเอทานอล 3 ครั้งโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง จะได้นาโนคอมพอสิตแบบ core-shell ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์และอะลูมินา เก็บอนุภาคได้ในเอทานอล



รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell

2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนอะลูมินา

2.3.1 เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องชั่งดิจิตอล
2. เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot plate)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง
4. ตู้อบ
5. เต้าเผา
6. เครื่อง X-ray Diffractometer (XRD) รุ่น DMAX2200/Ultima+ (Rigaku)
7. เครื่อง Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) รุ่น JSM7610F (JEOL)

2.3.2 สารเคมีที่ใช้

1. Aluminum sulfate hydrate ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)
2. Aluminum nitrate nonahydrate ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)

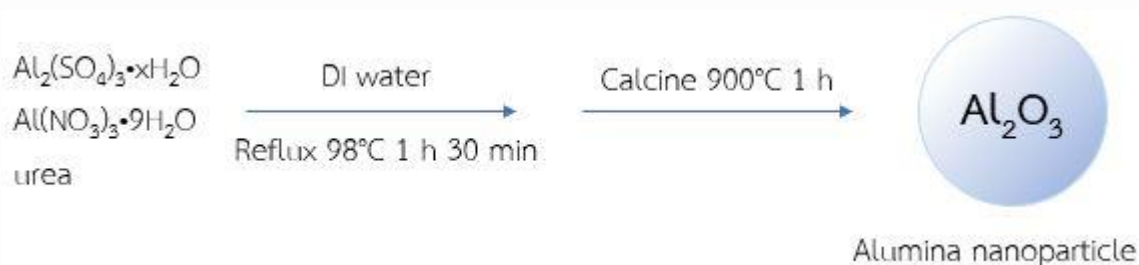
3. Urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)

2.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้

1. ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร
2. คอนเดนเซอร์
3. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
4. หลอดเซนต์ปีฟวขนาด 50 มิลลิลิตร
5. บีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
6. อะลูมินาครุซีเปิล
7. ซ้อนตักสาร

2.3.4 วิธีการทดลอง

ซึ่ง $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ตามอัตราส่วนที่ต้องการ ($R =$ อัตราส่วนความเข้มข้นของ $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O} : \text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ เนื่องจากการเปลี่ยน R จะทำให้ขนาดของอนุภาคนาโนอะลูมินาเปลี่ยน แต่ความเข้มข้นทั้งหมดของ Al^{3+} ต้องเท่ากับ 0.01 M) ในงานวิจัยนี้ใช้ $R=0.4$ ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O} = 0.0761$ กรัม $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} = 0.2086$ กรัม) และ 0.6 ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O} = 0.0934$ กรัม $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} = 0.1707$ กรัม) และยูเรีย 0.6006 กรัมลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ DI 100 มิลลิลิตร reflux ที่ 98°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง ล้างสารที่ได้ด้วยน้ำ DI 3 ครั้งโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง อบสารให้แห้ง แล้วนำไปเผาที่ 900°C ในเตาเผาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง



รูปที่ 2.4 แผนภาพการสังเคราะห์อนุภาคนาโนอะลูมินา

2.4 การสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา

2.4.1 เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องชั่งดิจิตอล
2. Sonicator
3. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller)
4. ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
5. เตาให้ความร้อน (Heating mantle)

6. เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง
8. เครื่อง X-ray Diffractometer (XRD) รุ่น DMAX2200/Ultima+ (Rigaku)
9. เครื่อง Transmission Electron Microscope (TEM) รุ่น JEM-2100 (JOEL)
10. เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) รุ่น JSM-54 10LV (JOEL)

2.4.2 สารเคมีที่ใช้

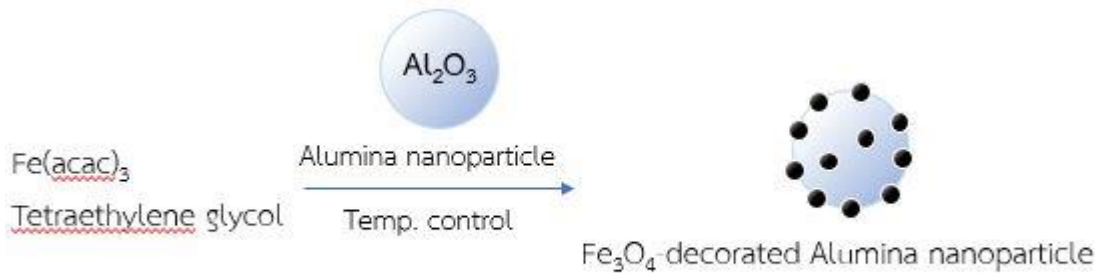
1. Iron(III) acetylacetonate ($\text{Fe}(\text{acac})_3$)
2. Tetraethylene glycol ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}_5$)
3. Acetone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)

2.4.3 อุปกรณ์ที่ใช้

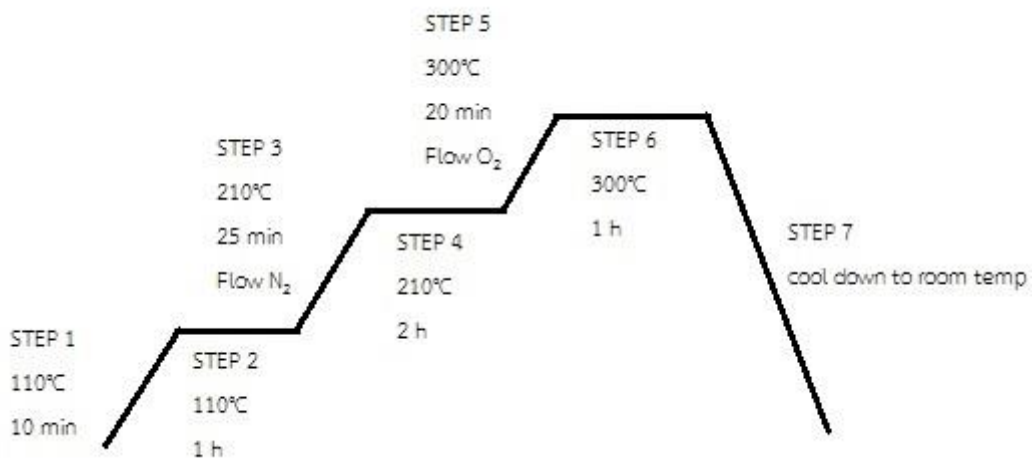
1. ปีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. ซ้อนตักสาร
3. หลอดหยด
4. ขวด 3 คอ
5. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
6. หลอดเซนต์ปีฟวขนาด 50 มิลลิลิตร

2.4.4 วิธีการทดลอง

ชั่งอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ 100 มิลลิกรัม ใส่ DI 1 มิลลิลิตร เอาไป sonicate จนสารไม่เป็นก้อน ชั่ง $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 20 มิลลิกรัม และ tetraethylene glycol 10 กรัมในขวด 3 คอ ใส่อนุภาคนาโนอะลูมินาที่เตรียมไว้ลงไป ค่อยๆให้อุณหภูมิแก่สารโดยใช้ heating mantle จนถึงอุณหภูมิ 210°C โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิเป็นตัวควบคุม ทำภายใต้สุญญากาศ ค้างที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงภายใต้แก๊ส N_2 จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปจนถึง 300°C ภายใต้บรรยากาศปกติ ใช้แท่งแม่เหล็กในการคนสารตลอดกระบวนการ นำสารที่ได้ไปล้างด้วยอะซิโตนจนของเหลวใสหรือมีสีเหลืองอ่อนโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง อบสารให้แห้ง จะได้นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา



รูปที่ 2.5 แผนภาพการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา



รูปที่ 2.6 แสดงการตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของเครื่องควบคุมอุณหภูมิในขั้นตอนการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา

2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเดนไดรติกเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay

2.5.1 เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง
2. เครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader)
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

2.5.2 สารเคมีที่ใช้

1. RPMI media
2. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
3. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
5. Steriled water

6. Lipopolysaccharides (LPS)

2.5.3 อุปกรณ์ที่ใช้

1. 96-well plate
2. ไมโครปิเปต 20 – 200 μL
3. ไมโครปิเปต 100 – 1000 μL
4. หลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.5.4 วิธีการทดลอง

ใส่เดนไดรติกเซลล์ที่อยู่ใน RPMI media 200 μL ลงในแต่ละ well (ประมาณ 100,000 เซลล์) บ่มที่ 37°C 18 ชั่วโมง ทำการกระตุ้นเซลล์ด้วยอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้น 10 30 100 300 1000 $\mu\text{g/mL}$ well ละ 20 μL บ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง เก็บของเหลวแต่ละ well 150 μL ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำการทดลองต่อ เติม RPMI media ลงไป 150 μL ใส่สารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL 20 μL ลงในแต่ละ well บ่ม 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง ทำการล้างโดยการดูดของเหลวทิ้ง 100 μL เติม PBS pH 7.4 100 μL นำไปปั่นเหวี่ยง ทำการล้างทั้งหมด 2 รอบ หลังจากนั้นดูดของเหลวทิ้ง 150 μL แล้วเติม DMSO 150 μL ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda=570 \text{ nm}$ ด้วยเครื่อง plate reader

2.6 การหาปริมาณ Cytokine ที่เซลล์ผลิตด้วยเทคนิค ELISA

2.6.1 เครื่องมือที่ใช้

1. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
2. เครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader)

2.6.2 สารเคมีที่ใช้

1. Coating buffer pH 9.5 (0.42 g NaHCO_3 + 0.178 g Na_2CO_3 + 50 mL DI water)
2. Washing buffer (0.05% Tween 20 in PBS pH 7.4)
3. Assay diluent (1% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS pH 7.4)
4. Standard IL-12, IFN- γ
5. Detection antibody
6. Avidin
7. Substrate A, B
8. Stop buffer (1 M H_2SO_4)

2.6.3 อุปกรณ์ที่ใช้

1. 96-well plate
2. ไมโครปิเปต 20 – 200 μL
3. ไมโครปิเปต 100 – 1000 μL

2.6.4 วิธีการทดลอง

ทำการ coat plate ด้วย capture antibody ของ IL-12 และ IFN- γ เก็บไว้ในที่มืด 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้าง 4 ครั้งด้วย washing buffer 200 μ L เติม assay diluent 200 μ L ลงในแต่ละ well บ่ม 37°C 30 นาที ล้าง 4 ครั้งด้วย washing buffer 200 μ L เติม standard IL-12, IFN- γ และของเหลวที่เก็บจากการทดลองก่อนหน้านี้ 100 μ L ลงใน well ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงในที่มืด ล้าง 4 ครั้งด้วย washing buffer 200 μ L เติม detection antibody 100 μ L ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้าง 4 ครั้งด้วย washing buffer 200 μ L เติม avidin 50 μ L ทิ้งไว้ 30 นาที ล้าง 2 ครั้งด้วย washing buffer 200 μ L เติม substrate A+B 50 μ L รอจนได้สีที่ต้องการแล้วจึงเติม stop buffer เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda=450$ nm ด้วยเครื่อง plate reader



บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทำโดยใช้เทคนิค thermal decomposition จากขั้นตอนการสังเคราะห์ที่แสดงไว้ในหัวข้อ 2.1.4 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์นั้นต้องมีการสังเคราะห์สารตั้งต้นที่ใช้ก่อน ซึ่งก็คือ Fe(oleate)_3 ซึ่งสามารถเขียนปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ดังนี้



จากนั้น ผู้วิจัยนำอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD) เพื่อหาโครงสร้างของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ เทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM) เพื่อหาขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ และทำการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้

3.1.1 X-ray Powder Diffraction (XRD)

จากผลการวิเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD) โดยใช้สภาวะ $\text{Cu K}\alpha$ radiation (1.5418 Å source 40 kV, 30 mA) วัดที่อุณหภูมิ 25 °C ครึ่งละ 0.02° ในช่วง 2-theta ระหว่าง 20°-80° รูปที่ 3.1 พบว่าอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้มี XRD pattern ตรงกับ PDF#19-0629 ซึ่งเป็นไฟล์มาตรฐานของ magnetite (Fe_3O_4) แต่ค่าสัญญาณที่ได้ค่อนข้างต่ำและมีพีคค่อนข้างกว้าง ซึ่งแสดงถึงความเป็นผลึกต่ำและอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็ก ซึ่งสอดคล้องกับ Scherrer Equation [23] ดังแสดง

$$B(2\theta) = \frac{K\lambda}{L \cos \theta}$$

โดย B คือ ความกว้างของพีค

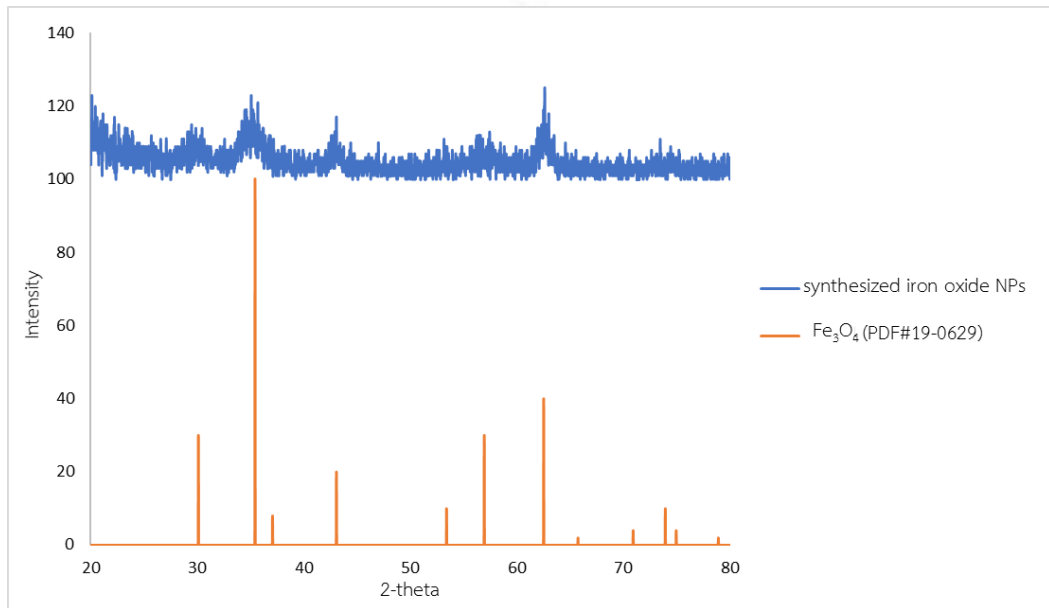
K คือ Scherrer constant

λ คือ ความยาวคลื่นของ X-ray ที่ใช้ในการวิเคราะห์

L คือ ขนาดของอนุภาค

และ θ คือ ½ diffraction angle

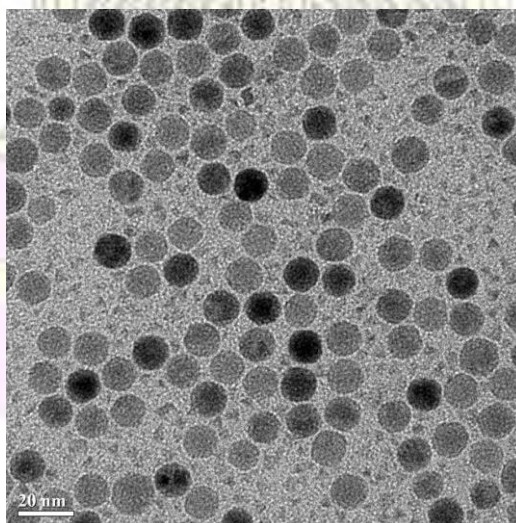
จากสูตรจะเห็นได้ว่าความกว้างของพีค (B) นั้นจะแปรผกผันกับขนาดของอนุภาค (L) ดังนั้นหากพีคนี้กว้าง อนุภาคนั้นก็มีขนาดเล็ก จึงสามารถบอกได้ว่าอนุภาคนาโนที่ผู้วิจัยสังเคราะห์ได้นั้นเป็นอนุภาคนาโนของเหล็กออกไซด์จริง



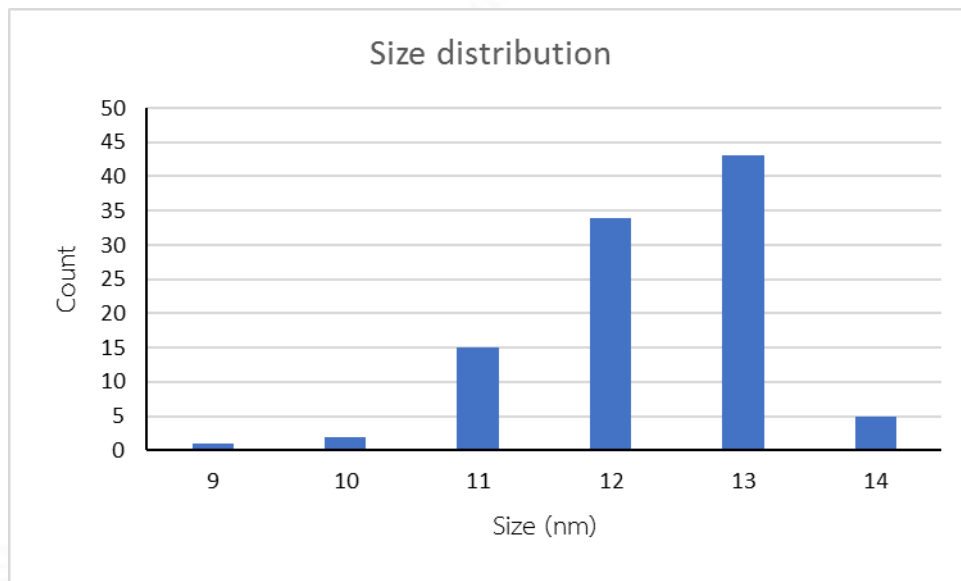
รูปที่ 3.1 แสดง X-ray Diffraction pattern ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ (สีน้ำเงิน) และ magnetite (Fe_3O_4) มาตรฐาน (PDF #19-0629) (สีส้ม)

3.1.2 Transmission Electron Microscopy (TEM)

จากผลการวิเคราะห์อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM) ในรูปที่ 3.2 พบว่า อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้นั้นมีลักษณะเป็นทรงกลมกระจายตัวได้ดี แต่จะมีอนุภาคนาโนขนาดเล็กกระจายตัวอยู่ด้วย ซึ่งอาจจะเป็นอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์เช่นกันแต่เกิดการก่อตัวซ้ำกว่าจึงทำให้มีขนาดเล็กกว่า เมื่อนำภาพไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อหาขนาดของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ โดยวัดจากอนุภาคจำนวน 100 อนุภาค จากผลในรูปที่ 3.3 พบว่าอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 12 ± 1 นาโนเมตร



รูปที่ 3.2 แสดงรูป TEM ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 3.3 แสดงการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้

3.1.3 ปรากฏการณ์ superparamagnetic

นำอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic โดยการนำแม่เหล็ก (สนามแม่เหล็กภายนอก) มาเหนี่ยวนำ พบว่า เมื่อนำแม่เหล็กมาเหนี่ยวนำอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีความเป็นแม่เหล็กเกิดขึ้นหรือสามารถถูกแม่เหล็กดึงดูดได้ แต่เมื่อนำแม่เหล็กออก อนุภาคที่สังเคราะห์ได้ไม่แสดงความจำทางแม่เหล็ก ดังรูปที่ 3.4 จึงบ่งชี้ได้ว่าอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้นั้นสามารถเกิดปรากฏการณ์ superparamagnetic ได้ซึ่งเป็นไปตามที่ผู้วิจัยต้องการ



รูปที่ 3.4 แสดงการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ ก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (ซ้าย) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (ขวา)

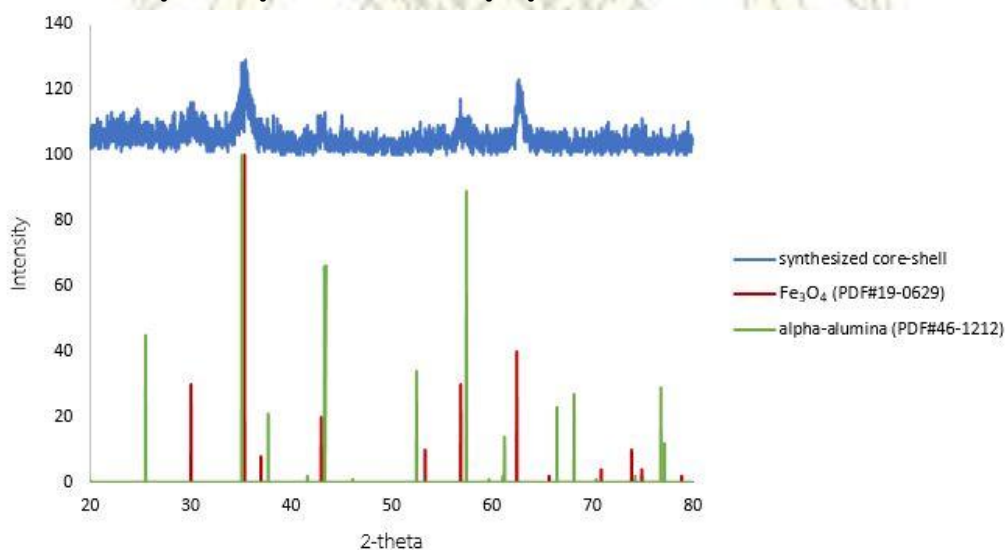
3.2 นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell

จากขั้นตอนการสังเคราะห์ที่แสดงไว้ในหัวข้อ 2.2.4 การสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทำโดยใช้เทคนิค reverse micelle โดยมี Igepal CO-520 เป็นสารลดแรงตึงผิว และมี aluminum isopropoxide เป็นแหล่งของอะลูมิเนียม

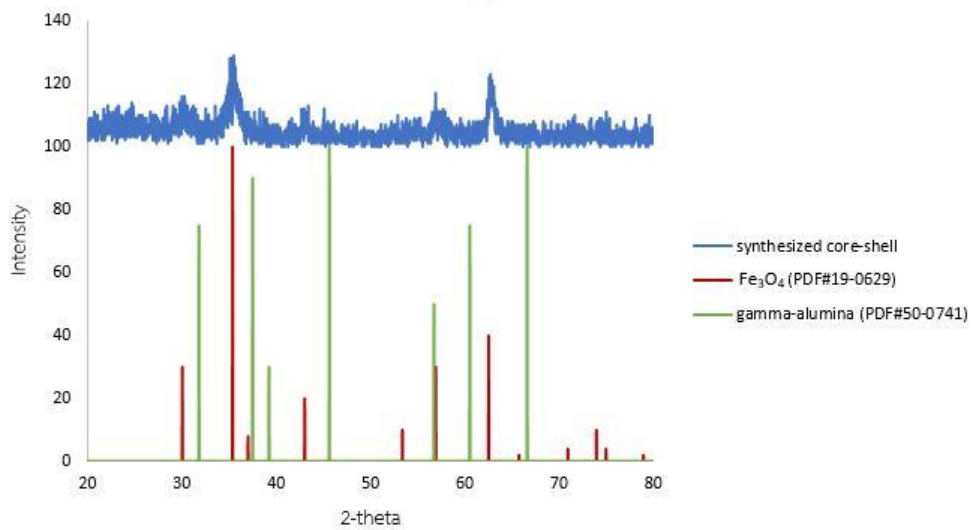
นำนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD) เพื่อยืนยันโครงสร้างของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ เทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM) เพื่อหาขนาดและรูปร่างของนาโนคอมพอสิต เทคนิค Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDX) เพื่อยืนยันตำแหน่งของธาตุองค์ประกอบ และทำการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของนาโนคอมพอสิต

3.2.1 X-ray Powder Diffraction (XRD)

จากผลการวิเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD) โดยใช้สภาวะ Cu K α radiation (1.5418 Å source 40 kV, 30 mA) วัดที่อุณหภูมิ 25°C ครึ่งละ 0.02° ในช่วง 2-theta ระหว่าง 20°-80° รูปที่ 3.5 และ 3.6 พบว่านาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้มี XRD pattern ตรงกับ PDF#19-0629 ซึ่งเป็นไฟล์มาตรฐานของ magnetite (Fe₃O₄) แต่เมื่อนำมาเทียบกับไฟล์มาตรฐานของ α -Al₂O₃ (PDF#46-1212) และ γ -Al₂O₃ (PDF#50-0741) ซึ่งเป็นเฟสพื้นฐานของอะลูมินาที่เป็นผลึก [24] พบว่าไม่สามารถระบุสัญญาณได้อย่างชัดเจน สาเหตุอาจมาจากการที่มีปริมาณอะลูมินาในส่วน shell น้อยหรืออะลูมินาที่อยู่ในส่วน shell นั้นอยู่ในรูป amorphous



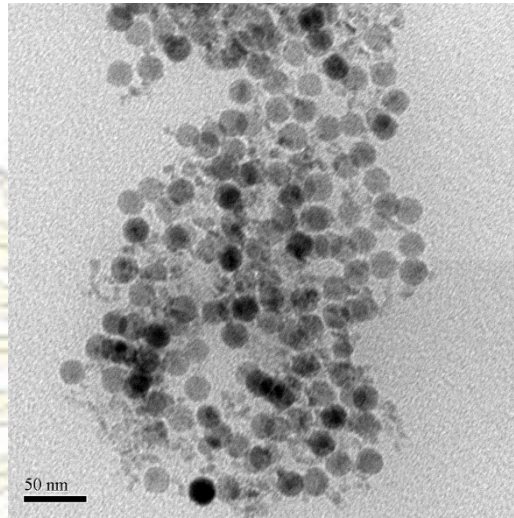
รูปที่ 3.5 แสดง X-ray Diffraction pattern ของนาโนคอมพอสิตแบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ (สีน้ำเงิน) magnetite (Fe₃O₄) มาตรฐาน (PDF #19-0629) (สีแดง) และ α -Al₂O₃ มาตรฐาน (PDF#46-1212) (สีเขียว)



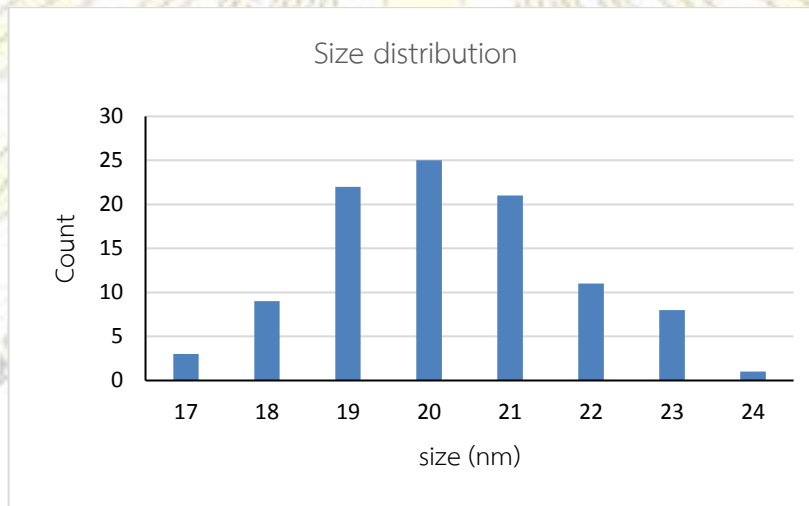
รูปที่ 3.6 แสดง X-ray Diffraction pattern ของนาโนคอมพอสิตแบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ (สีน้ำเงิน) magnetite (Fe_3O_4) มาตรฐาน (PDF #19-0629) (สีแดง) และ γ - Al_2O_3 มาตรฐาน (PDF#50-0741) (สีเขียว)

3.2.2 Transmission Electron Microscopy (TEM)

จากผลการวิเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM) รูปที่ 3.7 พบว่า นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้นั้นมีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวได้ แต่ไม่เห็นความแตกต่างของสีในส่วนของ core และ shell เช่นรูปที่ 1.5 จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ได้ เมื่อนำภาพไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อหาขนาดของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ โดยวัดจากอนุภาคจำนวน 100 อนุภาค จากผลในรูปที่ 3.8 พบว่านาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 20 ± 2 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์เพียงอย่างเดียวซึ่งมีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 12 ± 1 นาโนเมตร ดังรูปที่ 3.2 จึงเป็นข้อบ่งชี้ว่าสามารถสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ได้



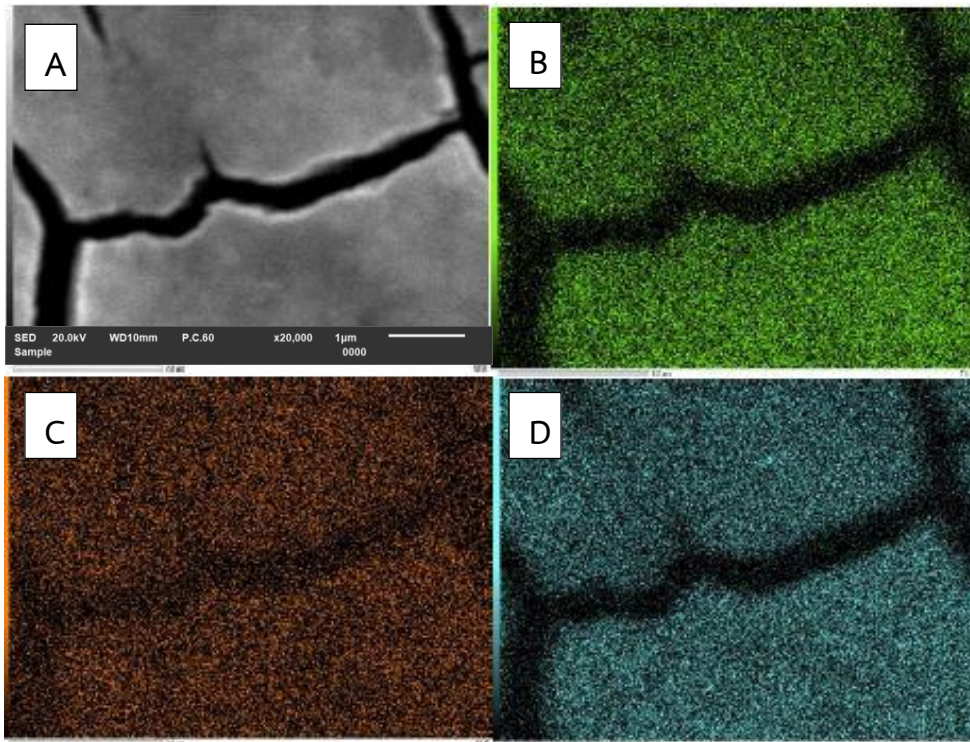
รูปที่ 3.7 แสดงรูป TEM ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 3.8 แสดงการกระจายตัวของขนาดของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้

3.2.3 Scanning Electron Microscopy/ Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDX)

จากผลการวิเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDX) โดยใช้โหมด Mapping เพื่อทำการยืนยันตำแหน่งของธาตุองค์ประกอบ รูปที่ 3.9 พบว่า มีอะลูมิเนียมปรากฏอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันกับเหล็กและออกซิเจน จึงสามารถช่วยสนับสนุนได้ว่าสามารถสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ได้จริง แต่ความละเอียดของการวิเคราะห์นั้นไม่สามารถที่จะทำการตรวจวัดอนุภาคนาโนเพียง 1 อนุภาคได้ เนื่องจาก resolution ของกล้องไม่เพียงพอ



รูปที่ 3.9 แสดงผลการทำ Mapping โดยใช้เทคนิค SEM/EDX ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ (A) ภาพตัวอย่างของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ (B) ตำแหน่งของเหล็ก (C) ตำแหน่งของอะลูมิเนียม และ (D) ตำแหน่งของออกซิเจน

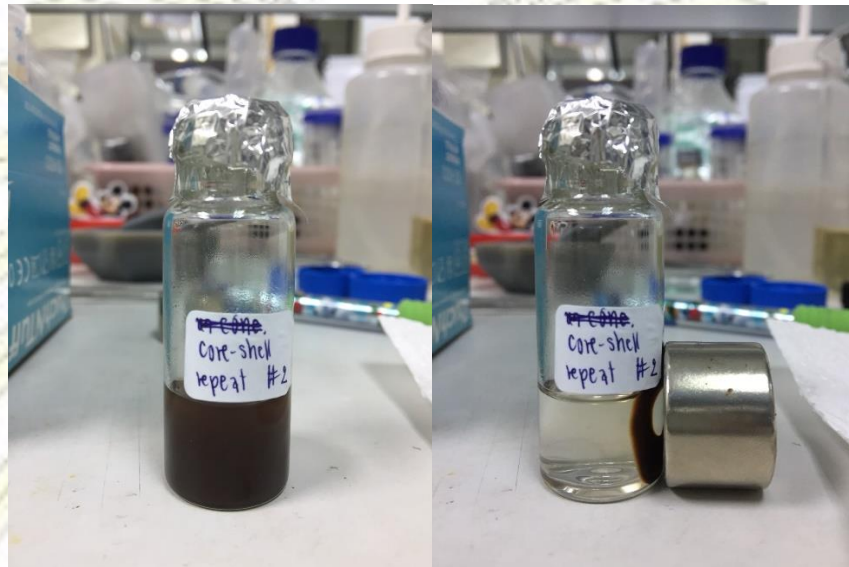
นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณธาตุองค์ประกอบของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ ให้ผลดังตารางที่ 2 เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างทำโดยการหยดสารลงบนแผ่นซิลิกอนเวเฟอร์ที่ติดลงบนเทปคาร์บอน จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ตรวจพบปริมาณธาตุ Si และ C ด้วย

Formula	mass%	Atom%	Sigma	Net	K ratio	Line
C	19.07	32.59	0.02	52880	0.0086635	K
O	24.56	31.51	0.04	296967	0.1652298	K
Al	1.22	0.93	0.01	89005	0.0158936	K
Si	40.47	29.58	0.04	3176401	0.6349280	K
Fe	14.68	5.40	0.03	373694	0.2662832	K
Total	100.00	100.00				

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณธาตุองค์ประกอบของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้

3.2.4 ปรากฏการณ์ superparamagnetic

นำนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ที่ได้มา ทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic โดยการนำแม่เหล็ก (สนามแม่เหล็กภายนอก) มาเหนี่ยวนำ พบว่า สามารถเกิดปรากฏการณ์ superparamagnetic ได้ถึงแม้ว่าจะมีการปรับแต่งพื้นผิวด้วยอะลูมินาแล้ว ดังรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 แสดงการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้ (ซ้าย) ก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (ขวา) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก

3.3 อนุภาคนาโนอะลูมินา

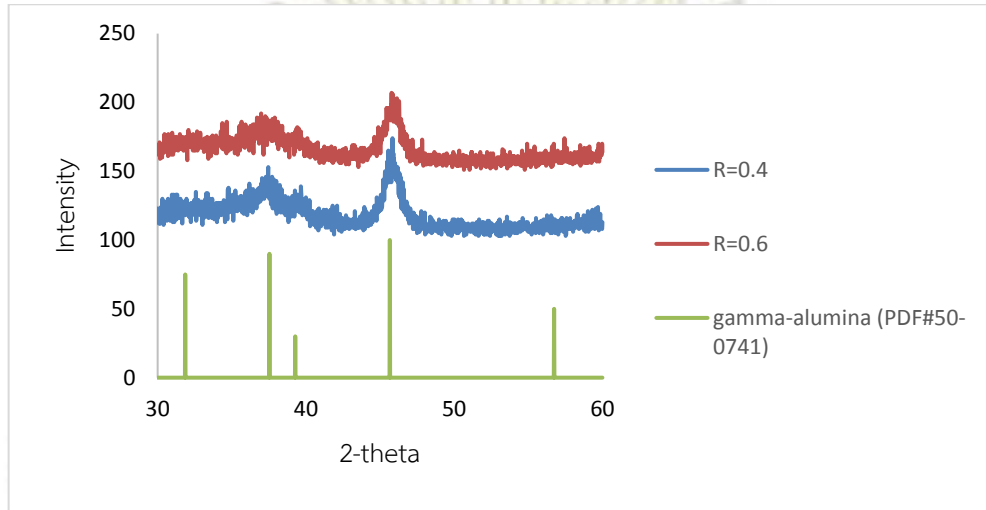
จากขั้นตอนการสังเคราะห์ที่แสดงไว้ในหัวข้อ 2.3.4 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนอะลูมินาที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทำโดยใช้เทคนิค forced hydrolysis โดยมี urea เป็นสารที่ใช้ในการตกตะกอน การเปลี่ยนอัตราส่วนความเข้มข้นของ $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$: $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (R) ที่ใช้ในการสังเคราะห์จะทำให้ขนาดของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนไป

นำอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD) เพื่อหาโครงสร้างของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ และเทคนิค Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) เพื่อหาขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนอะลูมินา

3.3.1 X-ray Powder Diffraction (XRD)

จากผลการวิเคราะห์อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD) โดยใช้สภาวะ $\text{Cu K}\alpha$ radiation (1.5418 \AA source 40 kV, 30 mA) วัดที่อุณหภูมิ 25°C ครึ่งละ 0.02° ในช่วง 2-theta ระหว่าง 30° - 60° รูปที่ 3.11 พบว่า อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 2 อัตรา-

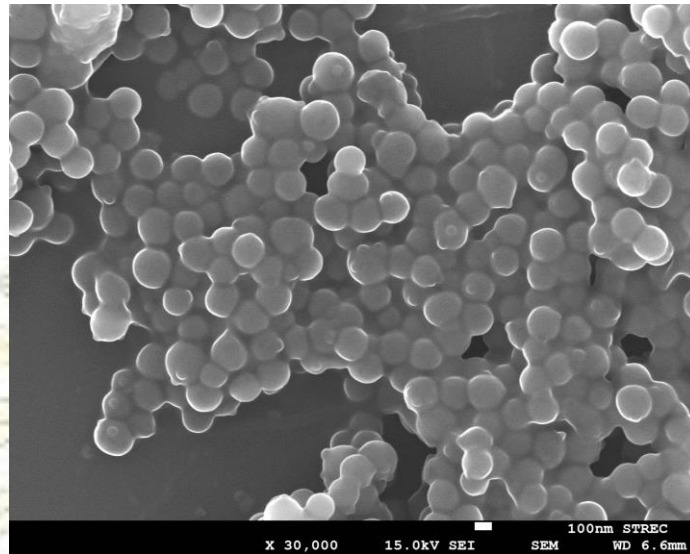
ส่วน (R= 0.4, 0.6) มี XRD pattern ตรงกับ PDF#50-0741 ซึ่งเป็นไฟล์มาตรฐานของ γ -Al₂O₃ จึงสามารถบอกได้ว่าอนุภาคนาโนที่ผู้วิจัยสังเคราะห์ได้นั้นเป็นอนุภาคนาโนของอะลูมินาจริง



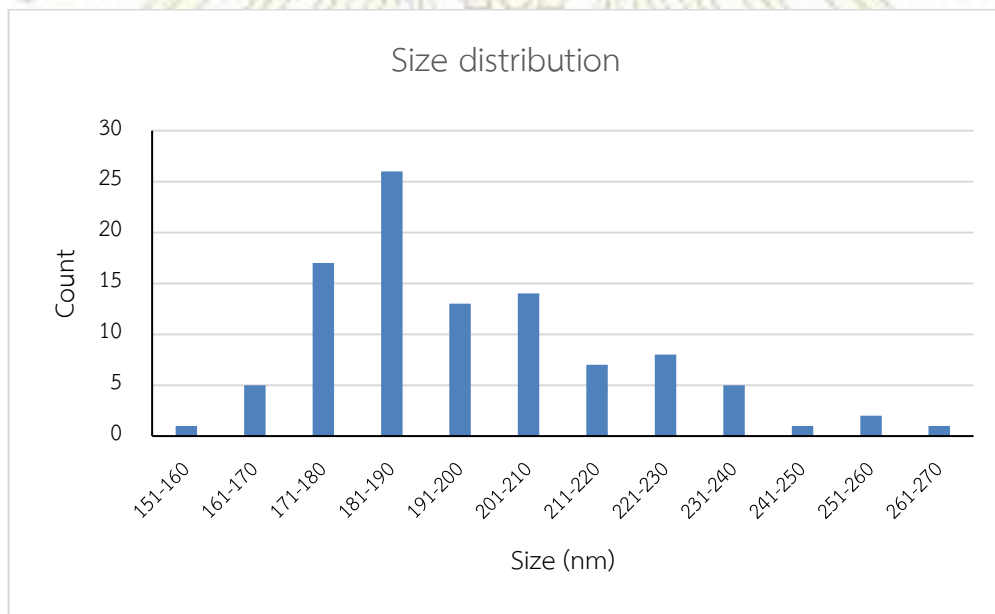
รูปที่ 3.11 แสดง X-ray Diffraction pattern ของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.4 (สีน้ำเงิน) อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.6 (สีแดง) และ γ -Al₂O₃ มาตรฐาน (PDF#50-0741) (สีเขียว)

3.3.2 Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM)

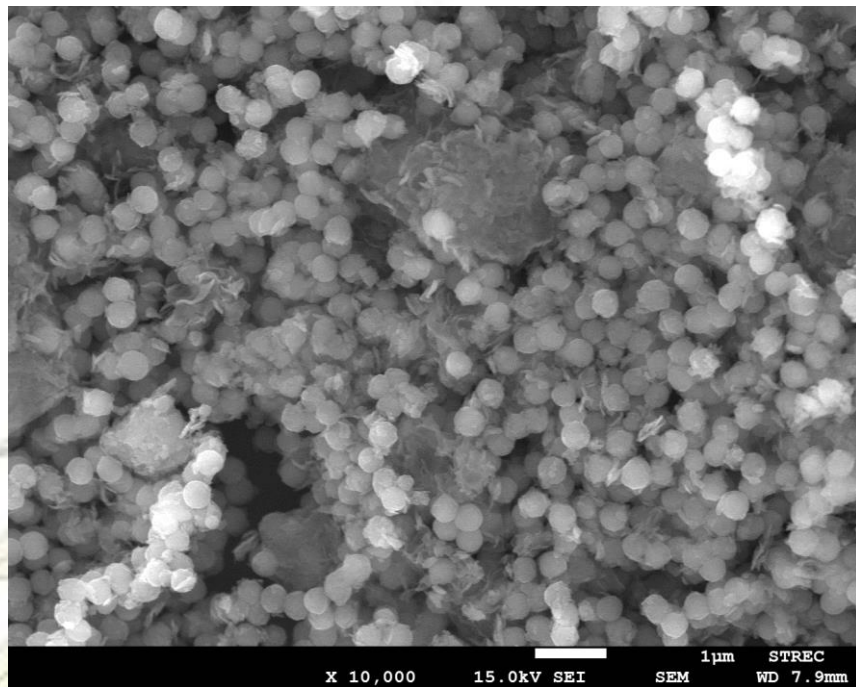
จากผลการวิเคราะห์อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) รูปที่ 3.12 และ 3.14 พบว่า อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ทั้งที่ R=0.4, 0.6 มีลักษณะเป็นทรงกลม เมื่อนำภาพไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อหาขนาดของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ โดยวัดจากอนุภาคจำนวน 100 อนุภาค จากผลในรูป 3.13 และ 3.15 พบว่าที่ R=0.4 อนุภาคมีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 197 ± 22 นาโนเมตร และที่ R=0.6 อนุภาคมีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 389 ± 28 นาโนเมตร โดยเมื่อ R (อัตราส่วนความเข้มข้นของ Al₂(SO₄)₃•xH₂O: Al(NO₃)₃•9H₂O) มีค่าเพิ่มขึ้น ขนาดของอนุภาคนาโนอะลูมินาจะเพิ่มขึ้น เนื่องจาก SO₄²⁻ มีความสามารถในการเชื่อม polymeric hydroxylated aluminum complexes ได้ดีกว่า NO₃⁻ จึงทำให้สามารถเกิดอนุภาคนาโนอะลูมินาที่มีขนาดใหญ่กว่า เมื่อมีปริมาณ SO₄²⁻ มาก [25]



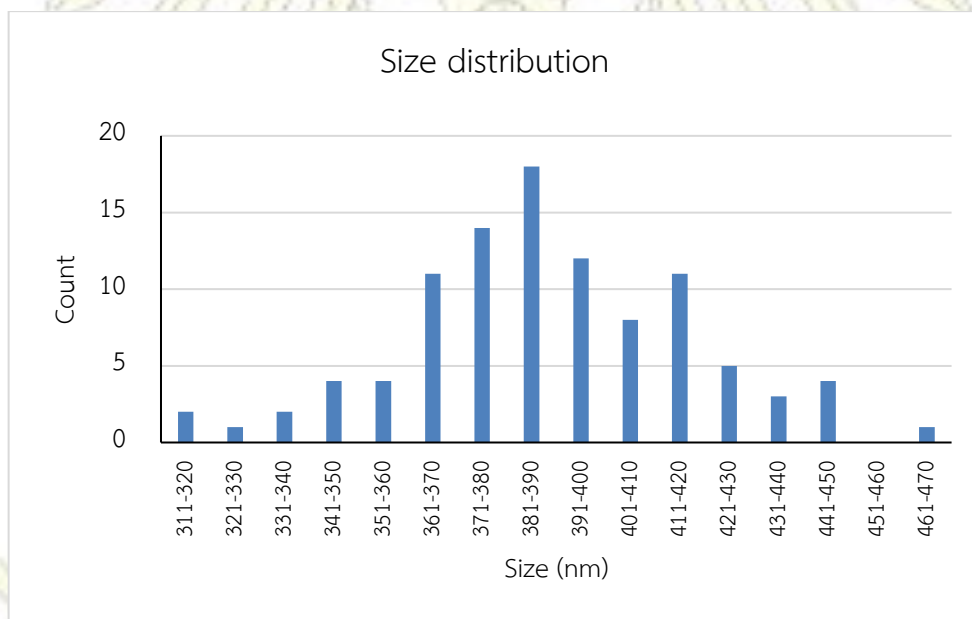
รูปที่ 3.12 แสดงรูป FESEM ของอนุภาคนาโนอะลูมินา R=0.4 ที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 3.13 แสดงการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคนาโนอะลูมินา R=0.4 ที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 3.14 แสดงรูป FESEM ของอนุภาคนาโนอะลูมินา R=0.6 ที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 3.15 แสดงการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคนาโนอะลูมินา R=0.6 ที่สังเคราะห์ได้

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคต่างๆ ของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 2 อัตราส่วน สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3

R	โครงสร้าง	รูปร่าง	ขนาด
0.4	γ -Al ₂ O ₃	กลม	197 ± 22 นาโนเมตร
0.6	γ -Al ₂ O ₃	กลม	389 ± 28 นาโนเมตร

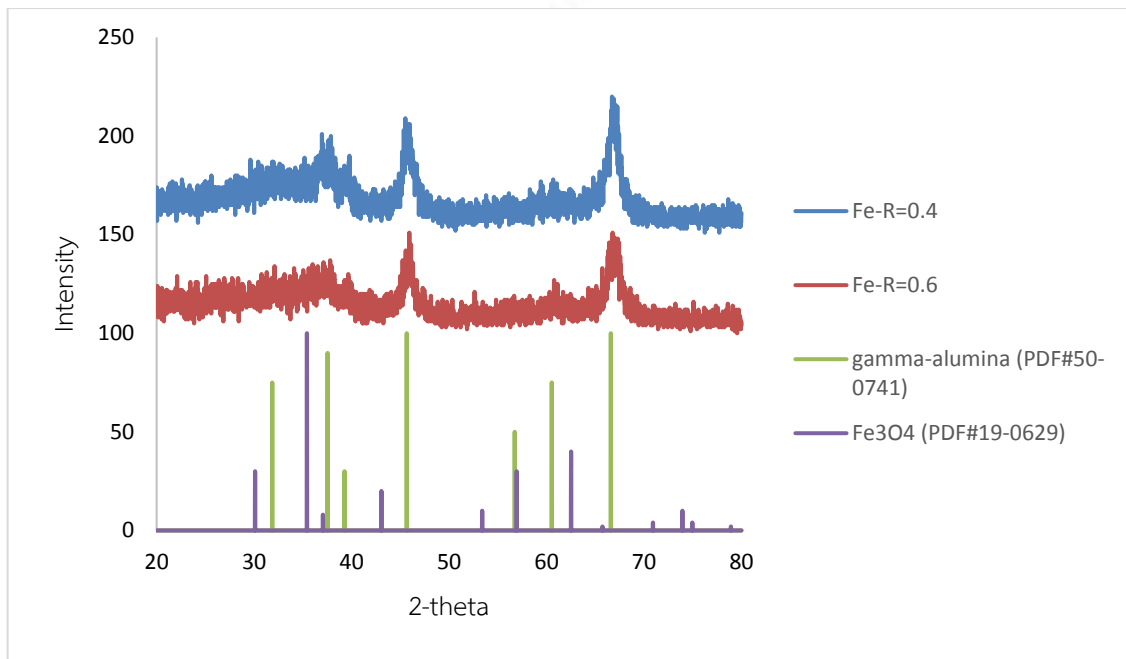
ตารางที่ 3 ตารางสรุปผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ ที่ R=0.4 และ 0.6

3.4 นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา

นำนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD) เพื่อยืนยันโครงสร้างของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ เทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM) เพื่อยืนยันการตกแต่งอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ลงบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาและหารูปร่างของนาโนคอมพอสิต เทคนิค Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDX) เพื่อยืนยันตำแหน่งของธาตุองค์ประกอบ และทำการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของนาโนคอมพอสิต

3.4.1 X-ray Powder Diffraction (XRD)

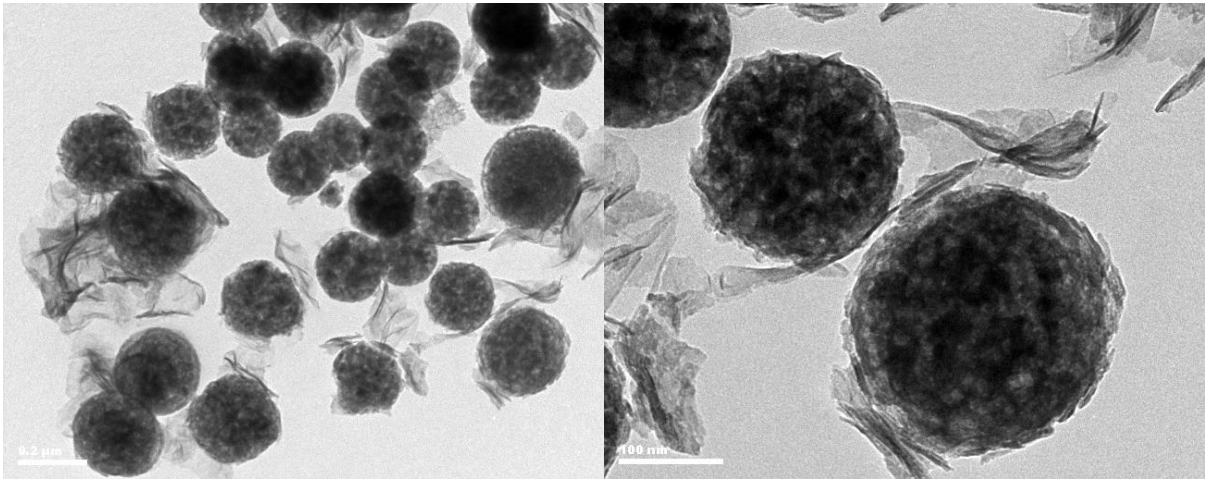
จากผลการวิเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD) โดยใช้สภาวะ Cu K α radiation (1.5418 Å source 40 kV, 30 mA) วัดที่อุณหภูมิ 25 °C ครึ่งละ 0.02° ในช่วง 2-theta ระหว่าง 20°-80° รูปที่ 3.16 พบว่า นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ R=0.4, 0.6 ที่สังเคราะห์ได้มี XRD pattern ตรงกับ PDF#50-0741 ซึ่งเป็นไฟล์มาตรฐานของ γ -Al₂O₃ แต่เมื่อนำมาเทียบกับไฟล์มาตรฐานของ magnetite (Fe₃O₄) (PDF#19-0629) พบว่าไม่สามารถระบุสัญญาณได้อย่างชัดเจนสาเหตุอาจมาจากการที่มีปริมาณเหล็กออกไซด์บนผิวน้อย



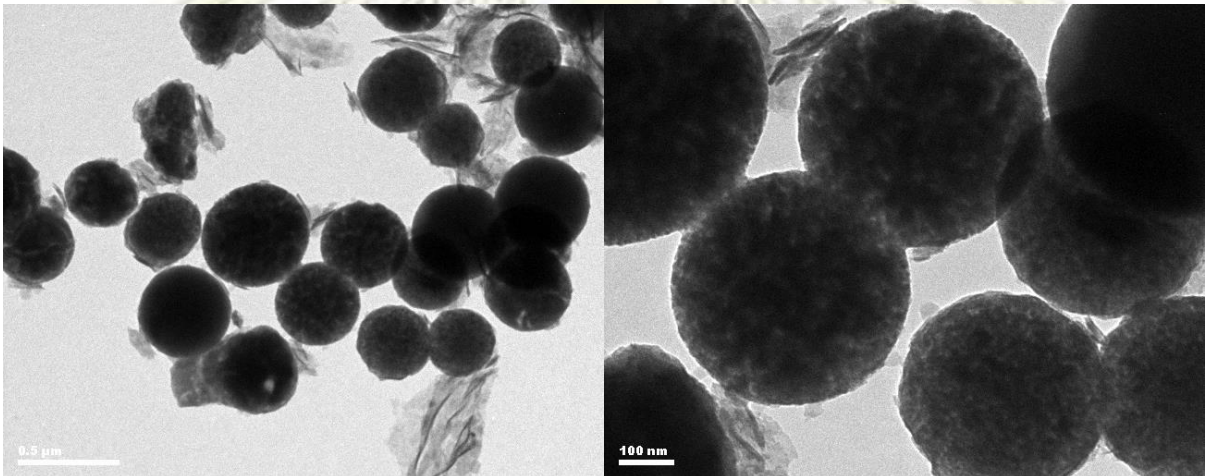
รูปที่ 3.16 แสดง X-ray Diffraction pattern ของนาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.4 (สีน้ำเงิน) นาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ R=0.6 (สีแดง) γ - Al_2O_3 มาตรฐาน (PDF#50-0741) (สีเขียว) และ magnetite (Fe_3O_4) มาตรฐาน (PDF #19-0629) (สีม่วง)

3.4.2 Transmission Electron Microscopy (TEM)

จากผลการวิเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM) รูปที่ 3.17 และ 3.18 พบว่า นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ทั้งที่ R= 0.4 และ 0.6 นั้นมีลักษณะเป็นทรงกลม ปรากฏสีอ่อนและเข้มต่างกันภายในอนุภาค ผู้วิจัยจึงคาดว่าบริเวณที่มีสีเข้มคือบริเวณที่มีอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ติดอยู่



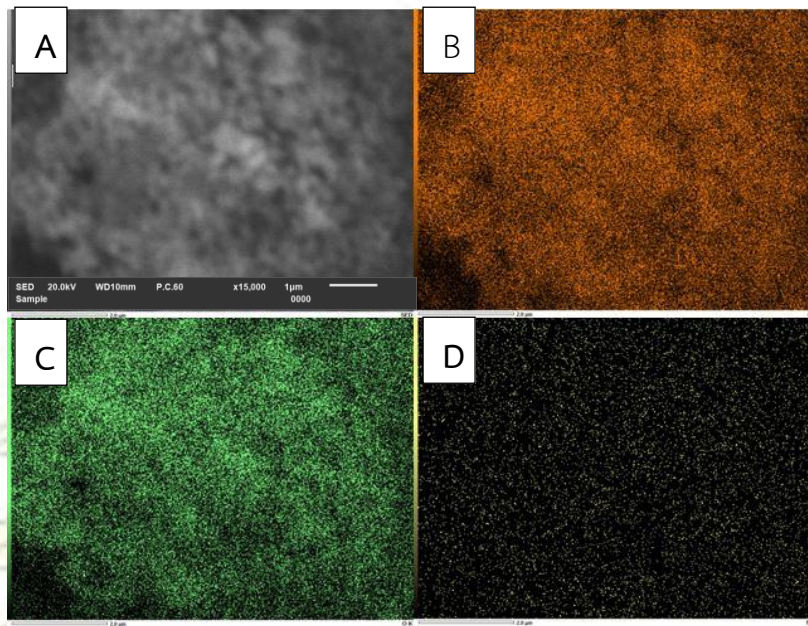
รูปที่ 3.17 แสดงรูป TEM ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ $R=0.4$



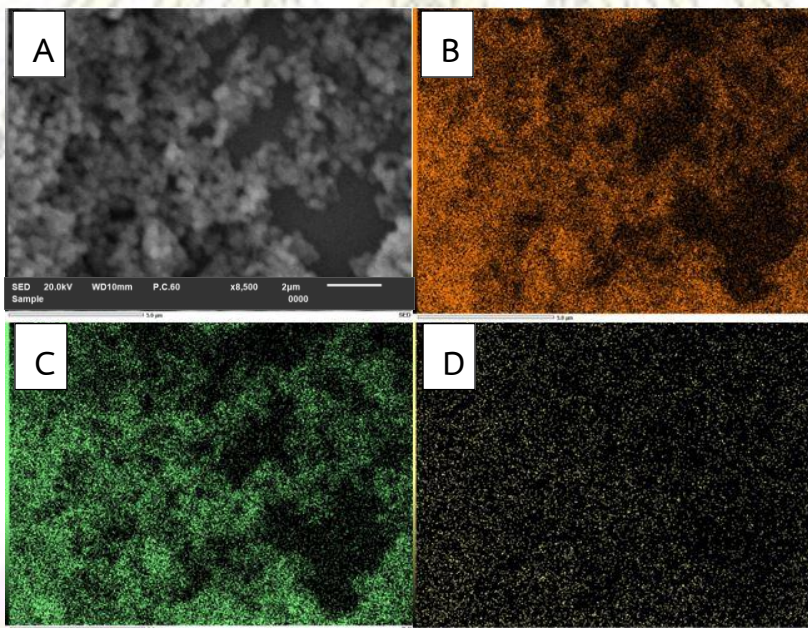
รูปที่ 3.18 แสดงรูป TEM ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ที่ $R=0.6$

3.4.3 Scanning Electron Microscopy/ Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDX)

จากผลการวิเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDX) โดยใช้โหมด Mapping เพื่อทำการยืนยันตำแหน่งของธาตุองค์ประกอบ รูปที่ 3.19 และ 3.20 พบว่า มีเหล็กปรากฏอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับอะลูมิเนียมและออกซิเจน จึงสามารถช่วยยืนยันได้ว่าสามารถสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาได้จริง แต่ความละเอียดของการวิเคราะห์นั้นไม่สามารถที่จะทำการตรวจวัดอนุภาคนาโนเพียง 1 อนุภาคได้ เนื่องจาก resolution ของกล้องไม่เพียงพอ



รูปที่ 3.19 แสดงผลการทำ Mapping โดยใช้เทคนิค SEM/EDX ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ $R=0.4$ ที่สังเคราะห์ได้ (A) ภาพตัวอย่างของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ (B) ตำแหน่งของอะลูมิเนียม (C) ตำแหน่งของออกซิเจน และ (D) ตำแหน่งของเหล็ก



รูปที่ 3.20 แสดงผลการทำ Mapping โดยใช้เทคนิค SEM/EDX ของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ $R=0.6$ ที่สังเคราะห์ได้ (A) ภาพตัวอย่างของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ (B) ตำแหน่งของอะลูมิเนียม (C) ตำแหน่งของออกซิเจน และ (D) ตำแหน่งของเหล็ก

และได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณธาตุองค์ประกอบของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาสังเคราะห์ได้ ให้ผลดังตารางที่ 4 และ 5 เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างทำโดยการหยดสารลงบนซิลิกอนเวเฟอร์ที่ติดลงบนเทปคาร์บอน จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ตรวจพบปริมาณธาตุ Si และ C ด้วย และสำหรับธาตุ S ที่พบ อาจมาจากการปนเปื้อนสารอื่นขณะทำการเตรียมตัวอย่าง

Formula	mass%	Atom%	Sigma	Net	K ratio	Line
C	11.61	19.01	0.02	22516	0.0036782	K
O	36.06	44.33	0.04	414970	0.2302264	K
Al	15.32	11.16	0.03	1047325	0.1864869	K
Si	35.27	24.69	0.04	2518466	0.5019763	K
S	0.74	0.45	0.01	32790	0.0078868	K
Fe	1.00	0.35	0.01	21085	0.0149814	K
Total	100.00	100.00				

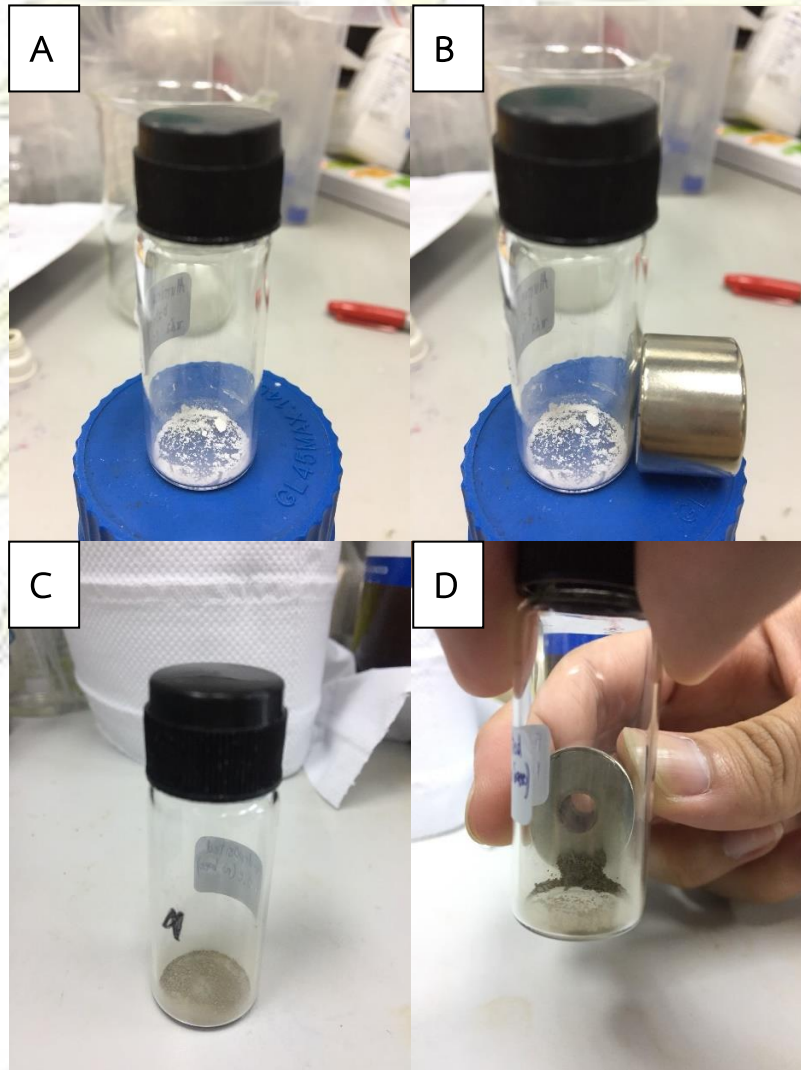
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณธาตุองค์ประกอบของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาขนาด 200 นาโนเมตร (R=0.4) ที่สังเคราะห์ได้

Formula	mass%	Atom%	Sigma	Net	K ratio	Line
C	22.09	35.08	0.02	42650	0.0069822	K
O	24.02	28.63	0.04	213690	0.1188080	K
Al	6.81	4.81	0.02	503872	0.0899106	K
Si	45.65	30.99	0.04	3493096	0.6977206	K
Fe	1.43	0.49	0.01	31233	0.0222394	K
Total	100.00	100.00				

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณธาตุองค์ประกอบของนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาขนาด 400 นาโนเมตร (R=0.6) ที่สังเคราะห์ได้

3.4.4 ปรากฏการณ์ superparamagnetic

นำนาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic โดยการนำแม่เหล็ก (สนามแม่เหล็กภายนอก) มาเหนี่ยวนำ พบว่า สามารถเกิดปรากฏการณ์ superparamagnetic ได้ ดังรูปที่ 3.21 จึงสามารถยืนยันได้ว่าสามารถสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาได้จริง



รูปที่ 3.21 แสดงการทดสอบปรากฏการณ์ superparamagnetic ของ (A) อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (B) อนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (C) นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้ก่อนการถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก (D) นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์แบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก

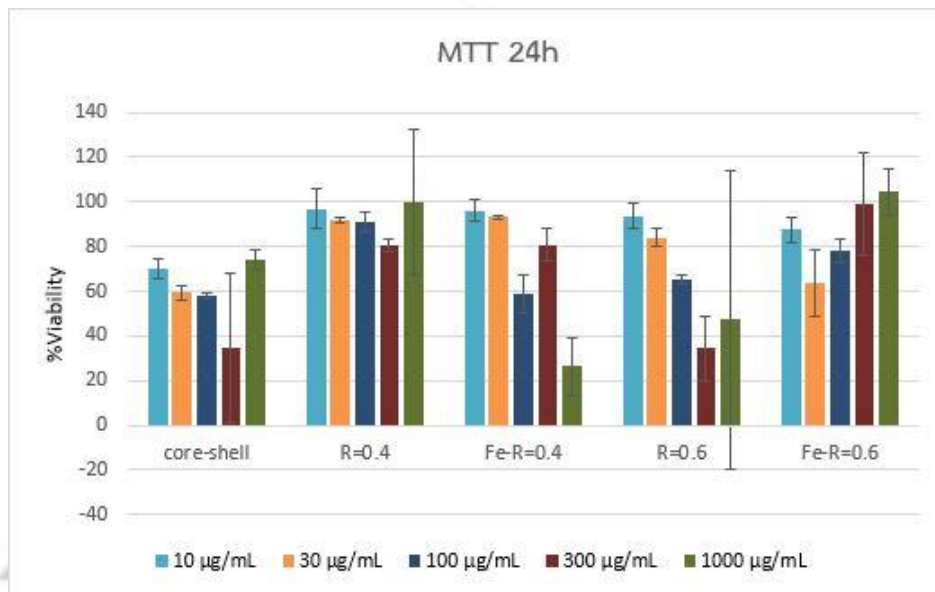
3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเดนไดรติกเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay

จากขั้นตอนการทดสอบที่แสดงไว้ในหัวข้อ 2.5.4 เมื่อนำอนุภาคนาโนชนิดต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้ ได้แก่ นาโนคอมพอสิตแบบ core-shell อนุภาคนาโนอะลูมินาที่ $R=0.4, 0.6$ และนาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ $R=0.4, 0.6$ ความเข้มข้น 10 30 100 300 และ 1000 $\mu\text{g/mL}$ มาทดสอบความเป็นพิษต่อเดนไดรติกเซลล์ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ หากเซลล์อยู่รอดมากกว่า 80% บ่งชี้ว่าอนุภาคนาโนที่ทำการทดสอบนั้นสามารถเข้ากันได้กับระบบทางชีวภาพได้หรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ จากผลการวิเคราะห์ พบว่า

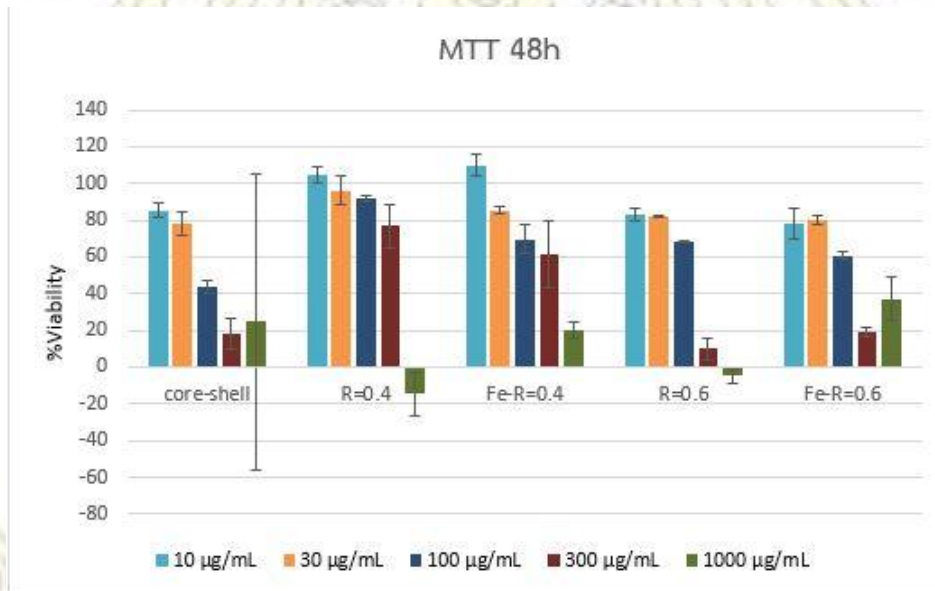
รูปที่ 3.22 ที่เวลา 24 ชั่วโมง นาโนคอมพอสิตแบบ core-shell ทุกความเข้มข้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่นาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ $R=0.4$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่ความเข้มข้น 10 30 และ 300 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนนาโนคอมพอสิตที่ $R=0.6$ นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่ 10 300 และ 1000 $\mu\text{g/mL}$ และเมื่อเปรียบเทียบก่อนและหลังการตกแต่งอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ลงบนผิวอนุภาคนาโนอะลูมินา พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการตกแต่งอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ลงบนผิว

รูปที่ 3.23 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนาโนคอมพอสิตแบบ core-shell และแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ $R=0.4, 0.6$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่ความเข้มข้น 10 และ 30 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบก่อนและหลังการตกแต่งอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ลงบนผิวอนุภาคนาโนอะลูมินา พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการตกแต่งอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ลงบนผิว เช่นเดียวกันกับผลที่ 24 ชั่วโมง

โดยปกติแล้วเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์นั้นจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารที่ใช้และเวลาที่ใช้ในการทดสอบเพิ่มขึ้น แต่เมื่อมาพิจารณาผลการทดลองที่ได้ พบว่า เมื่อเวลาที่ใช้ในการทดสอบเพิ่มขึ้น (24 และ 48 ชั่วโมง) เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์นั้นมีแนวโน้มที่จะลดลง แต่เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น มีเพียงผลการทดสอบที่ 48 ชั่วโมงที่เป็นไปตามแนวโน้ม โดยเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่สารความเข้มข้นสูง (300 และ 1000 $\mu\text{g/mL}$) จะเป็นส่วนที่ทำให้แนวโน้มผิดไปและค่อนข้างมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง สาเหตุอาจมาจากการที่มีอนุภาคนาโนหลงเหลืออยู่หลังขั้นตอนการล้างหรืออาจมีอนุภาคบางส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ ทำให้สีของอนุภาคส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ควรจะวัดได้จริง เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของเวลาในการทำการทดลองและความชำนาญของผู้วิจัยจึงทำให้ยังไม่สามารถทำการทดลองซ้ำได้



รูปที่ 3.22 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเดนไดรติคเซลล์ เมื่อทดสอบกับอนุภาคนาโนชนิดต่างๆที่สังเคราะห์ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ 3 การทดลอง

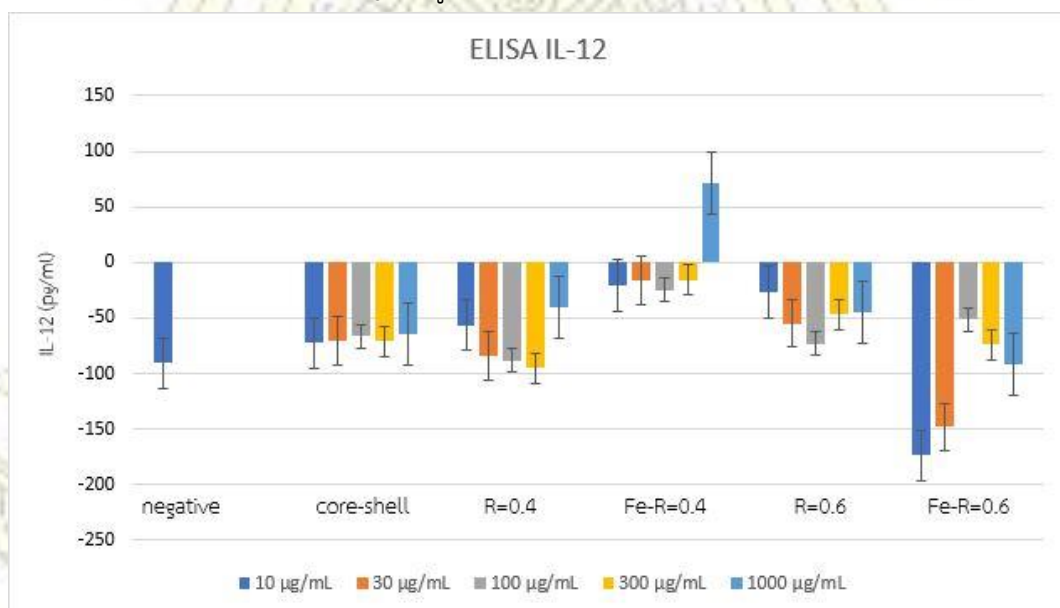


รูปที่ 3.23 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเดนไดรติคเซลล์ เมื่อทดสอบกับอนุภาคนาโนชนิดต่างๆที่สังเคราะห์ได้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ 3 การทดลอง

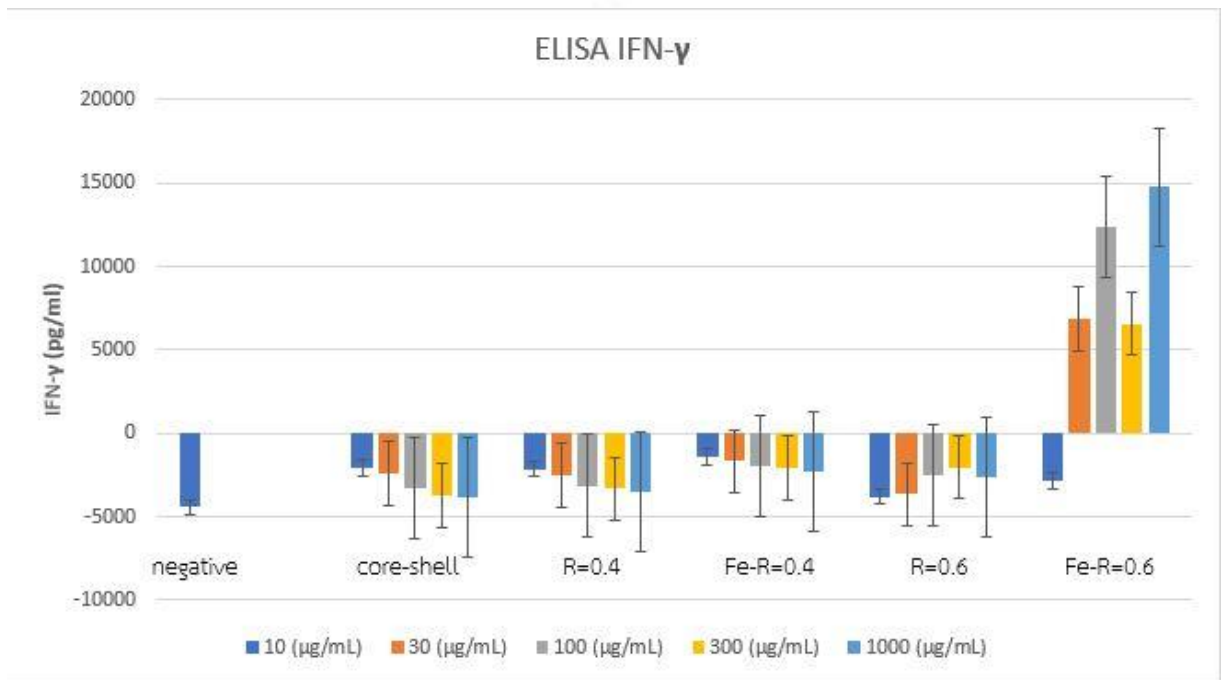
3.6 การหาปริมาณ Cytokine ที่เซลล์ผลิตด้วยเทคนิค ELISA

จากขั้นตอนการทดสอบที่แสดงไว้ในหัวข้อ 2.6.4 นำของเหลวที่เก็บไว้จากการทดสอบ MTT ของอนุภาคนาโนชนิดต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้ โดยในการทดลองนี้จะใช้ของเหลวที่เก็บจากการทดลองที่ 48 ชั่วโมง เนื่องจากให้ผลที่มีความแม่นยำมากกว่า มาทำการหาปริมาณ cytokine หรือ โปรตีนที่สร้างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อก่อให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบต่างๆ [26] โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบนี้จะทำการหาทั้งหมด 2 ชนิด คือ Interleukin-12 (IL-12) ซึ่งมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้าง TNF- γ และกระตุ้น Natural Killer cell และ cytotoxic T lymphocyte ให้ไปกำจัดสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย [27,28] และ Interferon gamma (IFN- γ) ซึ่งมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมโครฟาจให้เกิดการทำลายเชื้อโรคที่อาศัยอยู่ในเซลล์ และช่วยให้เกิดการสร้างแอนติบอดีบางชนิด [29]

จากผลการวิเคราะห์ รูปที่ 3.24 และ 3.25 พบว่า นาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ ตกแต่งบนอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ R=0.4 ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-12 ได้ และนาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนอนุภาคนาโนอะลูมินาที่ R=0.6 ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ขึ้นไปสามารถกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ได้ แต่ปริมาณ cytokine ทั้ง 2 ประเภทที่ได้จากการทดลองส่วนใหญ่มีค่าติดลบซึ่งเป็นไปไม่ได้และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง จึงทำให้การทดลองไม่น่าเชื่อถือ โดยสาเหตุอาจมาจากการที่ตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนสีไม่พร้อมกัน (ตัวอย่างบางตัวเกิดสีเข้มมาก แต่บางตัวมีสีอ่อนอยู่) ทำให้ต้องมีการใส่ Stop buffer เพื่อหยุดปฏิกิริยาเร็วเกินไปสำหรับบางตัวอย่าง ซึ่งอาจเกิดกับ standard ด้วยจึงทำให้ปริมาณ cytokine ของสารตัวอย่างที่คำนวณได้มีความผิดพลาดเกิดขึ้น เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของเวลาในการทำการทดลองและความชำนาญของผู้วิจัยจึงทำให้ยังไม่สามารถทำการทดลองซ้ำได้



รูปที่ 3.24 แสดงปริมาณ IL-12 ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ของเดนไดรติกเซลล์กับอนุภาคนาโนชนิดต่างๆที่สังเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.25 แสดงปริมาณ IFN- γ ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ของเดนไดรติกเซลล์กับอนุภาคนาโนชนิดต่างๆที่สังเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดสอบทางชีววิทยาของนาโนคอมพอสิตทั้ง 2 ประเภท พบว่า ที่เวลาทำการทดลอง 48 ชั่วโมง นาโนคอมพอสิตทั้ง 2 ประเภทนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่ความเข้มข้น 10 และ 30 $\mu\text{g/mL}$ และนาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวอนุภาคนาโนอะลูมินาขนาด 200 นาโนเมตร มีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุ้นการผลิต IL-12 ได้ และขนาด 400 นาโนเมตรมีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุ้นการผลิต IFN- γ ได้ แต่ยังมีคามจำเป็นที่จะต้องทำการทดลองซ้ำและเพิ่มเติมเพื่อหาข้อสรุปสมบัติการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ชัดเจนของนาโนคอมพอสิต

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์ 2 แบบ คือ แบบ core-shell และแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินา เพื่อนำมาใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีน พบว่า นาโนคอมพอสิตแบบ core-shell ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาด 20 นาโนเมตร และนาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาดประมาณ 200 และ 400 นาโนเมตร ซึ่งนาโนคอมพอสิตทั้ง 2 แบบนั้นสามารถเกิดปรากฏการณ์ superparamagnetic ได้ หลังจากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเดนไดรติคเซลล์ของนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ พบว่า ที่เวลาทำการทดลอง 48 ชั่วโมง นาโนคอมพอสิตทั้ง 2 แบบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่ความเข้มข้น 10 และ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และเมื่อนำของเหลวจากการทดลองที่ 48 ชั่วโมงมาทำการหาปริมาณ IL-12 และ IFN- γ ที่เซลล์ผลิต พบว่า นาโนคอมพอสิตแบบอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ตกแต่งบนผิวของอนุภาคนาโนอะลูมินาขนาด 200 นาโนเมตร ($R=0.4$) มีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุ้นการผลิต IL-12 ได้ และขนาด 400 นาโนเมตร ($R=0.6$) มีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุ้นการผลิต IFN- γ ได้ แต่ยังคงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการทดลองซ้ำและเพิ่มเติมเพื่อหาข้อสรุปสมบัติการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ชัดเจนของนาโนคอมพอสิต

แนวทางการพัฒนางานวิจัย

- ปรับแต่งพื้นผิวของนาโนคอมพอสิตด้วยแอนติเจนและทำการทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน
- ปรับแต่งพื้นผิวของนาโนคอมพอสิตด้วยวัสดุที่ช่วยเพิ่มสมบัติต่าง ๆ เช่น วัสดุที่ช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน หรือวัสดุที่ทำให้สามารถตรวจพบ ติดตามการนำส่งวัคซีนได้ เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้นาโนคอมพอสิตของอนุภาคนาโนอะลูมินาและเหล็กออกไซด์ที่สามารถเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนและมีแนวโน้มพัฒนาเป็นระบบนำส่งวัคซีนได้

เอกสารอ้างอิง

1. Amanna I.; Slifka M.K. Public fear of vaccination: separating fact from fiction *Viral Immunol.* **2005**, *18*, 307–315
2. Zhang M.; Hong Y.; Chen W.; Wang C. Polymers for DNA Vaccine Delivery *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2016**, *3*(2), 108-125
3. Steinman R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future *Annu Rev Immunol.* **2012**, *30*, 1-22
4. อีระพงษ์ ตันทวีเชียร. สารเสริมฤทธิ์. วัคซีน. Available at:
<http://pidst.or.th>
Accessed April 21, 2018
5. อังคณา ตันติธวานนท์ ระบบนำส่งวัคซีน *J Health Res* **2008**, *22*(3), 151-159
6. Zhao L.; Seth A.; Wibowo N.; Zhao C.; Mitter N.; Yu C.; Middelberg A. Nanoparticle vaccines *Vaccine.* **2014**, *32*, 327-337
7. Ho J.; Nawwab Al-Deen F.M.; Al-Abboodi A.; Selomulya C.; Xiang S.D.; Plebanski M.; Forde G.M. N,N-Carbonyldiimidazole-mediated functionalization of superparamagnetic nanoparticles as vaccine carrier *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *83*, 83-90
8. Djuricic S.; Jakobsen JC.; Petersen SB.; Kenfelt M.; Gluud C. Aluminium adjuvants used in vaccines versus placebo or no intervention *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2017**, *9*, 1-24
9. Ren H.; Zhang Q.; Qie L.; Baker G.L. The Adjuvant Effect of Emerging Nanomaterials: A Double-Edged Sword *ACS Symposium Series* **2013**, 4-21
10. Nanoparticle Applications and Uses. Available at:
<http://www.understandingnano.com/nanoparticles.html>
Accessed April 22, 2018
11. Nanoparticle. Available at:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Nanoparticle>
Accessed April 22, 2018
12. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC). วัสดุที่เรียกว่า "คอมโพสิต (composites)" คือวัสดุประเภทใด Available at:
<https://www.mtec.or.th>
Accessed April 22, 2018

13. Springer Nature. Nanocomposites. Available at:
<https://www.nature.com/subjects/nanocomposites>
Accessed April 22, 2018
14. ชนิดของสภาวะแม่เหล็ก. Available at:
<http://elec.chandra.ac.th/courses/ELEC2101/termwork/magnetic/timesaving2.html>
Accessed April 22, 2018
15. Manuel Benz. Superparamagnetism : Theory and Applications. December 14, 2012.
16. Superparamagnetism. Available at:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Superparamagnetism>
Accessed April 22, 2018
17. World Health Organization. Vaccines. Available at:
<http://www.who.int/topics/vaccines/en/>
Accessed April 30, 2018
18. Aluminium oxide. Available at:
https://en.wikipedia.org/wiki/Aluminium_oxide#Structure
Accessed April 30, 2018
19. Thermo Fisher Scientific. General Sandwich ELISA Protocol. Available at:
<https://www.thermofisher.com/th/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/general-elisa-protocol.html>
Accessed May 24, 2018
20. Injumba W.; Ritprajak P.; Insin N. Size-dependent cytotoxicity and inflammatory responses of PEGylated silica-iron oxide nanocomposite size series *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2017**, 427, 60-66
21. Maquieira A.; Brun E.; Garcia M.; Puchades R. Aluminum Oxide Nanoparticles as Carriers and Adjuvants for Eliciting Antibodies from Non-immunogenic Haptens *Analytical Chemistry*. **2012**, 84, 9340-9348
22. Drescher J.; Grutzner L. γ -Aluminum oxide as an adjuvant for inactivated Poliovirus vaccines *Am.J.Hyg* **1962**, 75, 147-157
23. Scott A Speakman, Ph.D. Estimating Crystallite Size Using XRD Available at:
<http://prism.mit.edu/xray>
Accessed May 24, 2018

24. Xie Y.; Kocaefe D.; Kocaefe Y.; Cheng J.; Liu W. The Effect of Novel Synthetic Methods and Parameters Control on Morphology of Nano-alumina Particles *Nanoscale Research Letters*. **2016**, *11*:259
25. Roh H.; Choi G.; An J.; Cho C.; Kim D.; Park I.; Noh T.; Kim D.; Hong K. Size-controlled synthesis of monodispersed mesoporous α -Alumina spheres by a template-free forced hydrolysis method *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6901-6905
26. ความรู้เบื้องต้นของระบบภูมิคุ้มกัน Available at:
<http://www.4lifedd.com/immune.html>
Accessed April 29, 2018
27. บ้านจอมยุทธ. Cytokines. Available at:
https://www.baanjomyut.com/library_2/extension-1/cytokines/index.html
Accessed April 29, 2018
28. ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system). Available at:
<http://www.transferfactor-therapy.com>
Accessed April 29, 2018
29. พงศกร เชื่อมไมตรี. เซลล์หน่วยความจำและภูมิคุ้มกันของร่างกาย. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร* **2556**, *11(1)*, 87-104

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวกาญจนาภา ด้วงนคร เกิดเมื่อวันที่ 6 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเซนต์ฟรังซิสเซเวียร์ จังหวัดนนทบุรี เมื่อปีการศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 100/883 ตำบลบางพูด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี รหัสไปรษณีย์ 11120 อีเมล negimachan_wa@hotmail.com

