



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซาน โดยใช้ยางจากเถา
เอ็นอ่อน

Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles using
Cryptolepis buchanani latex

ชื่อนิสิต นางสาวภาวิดา ปิยะชาติ

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซาน โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน

Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles using *Cryptolepis buchanani* latex

โดย

นางสาวภาวิดา ปิยะชาติ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

โครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยโคโตซาน โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน
โดย นางสาวภาวิดา ปิยะชาติ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

จรัสชัย ศักดิ์เกษม ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.จรัสชัย ตันตุลานี)

นงนุช เหมืองสิน อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน)

ดร.ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์)

นาคยา งามโรจนวณิชย์ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นาคยา งามโรจนวณิชย์)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานฉบับนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซาน โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวภาวิดา ปิยะชาติ เลขประจำตัว 563 31281 23
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธีทางชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญ เนื่องจากไม่มีการใช้ตัวทำละลายและตัวรีดิวซ์ที่เป็นอันตราย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งสามารถทำการทดลองได้อย่างรวดเร็วและใช้สารตั้งต้นที่หาได้ง่าย โดยใช้สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนเป็นตัวรีดิวซ์และสารละลายไคโตซานเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคนาโนทองคำ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์จึงทำการปรับตัวแปรที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายกรดคลอโรอริก สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน สารละลายไคโตซาน และโซเดียมไฮดรอกไซด์ พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Vis) จะพบพีคของเซอ์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ (SPR) ดูกลิ้นแสงที่ความยาวคลื่น 539 นาโนเมตร ซึ่งเป็นพีคเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนทองคำและเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR) นอกจากนี้นำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

คำสำคัญ: อนุภาคนาโนทองคำ, สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน, ไคโตซาน, เซอ์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์

Project Title Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles using *Cryptolepis buchanani* latex

Student Name Ms. Pawida Piyachat Student ID 563 31281 23

Advisor Name Associate Professor Dr. Nongnuj Muangsin

Co-advisor Name Associate Professor Dr. Narong Praphairaksit

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

Abstract

The synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using eco-friendly natural reagent is of particular interest as this can essentially eliminate the use of excessive solvents and potentially harmful reducing agents. In this work, we aimed to develop an eco-friendly, rapid and simple procedure for the synthesis of AuNPs using aqueous extract of *Cryptolepis buchanani* latex as a reducing agent and modified chitosan to enhance their stability. Reaction parameters including concentration of chloroauric acid, latex extract, NaOH and chitosan were optimized for maximum yield of AuNPs. The synthesized AuNPs were characterized by FT-IR and UV-Vis spectroscopy which showed the surface plasmon resonance (SPR) band at 539 nm. In addition, in vitro antioxidant assays demonstrated that the synthesized AuNPs possess antioxidant properties. Moreover, the cytotoxicity test on normal cell line showed excellent viability of AuNPs stabilized by chitosan.

Keywords: gold nanoparticles, aqueous extract *Cryptolepis buchanani* latex, chitosan, surface plasmon resonance

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ ผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน และ รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่คอยให้คำปรึกษา และข้อมูลด้านความรู้ที่เป็นประโยชน์ รวมถึงแนวคิดและประสบการณ์ในด้านต่าง ๆ ตลอดการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ต้นทุลานี และรองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ ที่กรุณาสละเวลาให้เกียรติมาเป็นกรรมการประเมินโครงการวิจัย

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของฝ่ายวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาเคมีที่ได้สนับสนุนและให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ นิสิตปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คอยแนะนำ และแบ่งปันประสบการณ์ต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาดำเนินการวิจัย

และที่สำคัญขอขอบคุณครอบครัว เพื่อน พี่ น้องในภาคเคมีรวมถึงทุก ๆ คนที่คอยให้กำลังใจ คอยรับฟัง และให้คำแนะนำต่าง ๆ

สุดท้ายนี้ นิสิตผู้จัดทำโครงการคาดหวังว่าความรู้ที่ได้รับจากโครงการวิจัยฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง	2
1.2.1 นาโนเทคโนโลยี	2
1.2.2 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนทองคำ	2
1.2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ	4
1.2.4 การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนทองคำ	6
1.2.5 การเพิ่มความเสถียรให้อนุภาคนาโนทองคำ	7
1.2.6 ไคโตซาน	8
1.2.7 ต้นเถาเอ็นอ่อน	11
1.2.8 การต่อต้านอนุมูลอิสระ (DPPH Radical-Scavenging Activity Assay)	12
1.2.8 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT assay)	13
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	17
1.5 วัตถุประสงค์	17
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	17

บทที่ 2 การทดลอง	18
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์	18
2.2 รายการสารเคมี	18
2.3 วิธีการทดลอง	19
2.3.1 เตรียมสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์	19
2.3.2 เตรียมสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน	19
2.3.3 หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนด้วยวิธีลาวรี	19
2.3.4 เตรียมสารละลายโคโคซาน	21
2.3.4 สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยยางจากเถาเอ็นอ่อน	21
2.3.5 ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH Radical-Scavenging Activity Assay)	21
2.3.6 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT assay)	22
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	23
3.1 การหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดยางจากต้นเถาเอ็นอ่อนด้วยวิธีลาวรี (Lowry method)	23
3.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยใช้สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)	25
3.2.1 การปรับปริมาณ HAuCl_4	25
3.2.2 การปรับปริมาณ HAuCl_4 และสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน	26
3.2.3 การปรับปริมาณ NaOH	27
3.2.4 การศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน	27
3.2.5 การเพิ่มความเสถียรด้วยโคโคซาน	28
3.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยใช้สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน (ยางที่เก็บครั้งที่ 2)	30
3.3.1 การปรับปริมาณสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่แตกต่างกัน	30
3.3.2 การปรับปริมาณโคโคซานที่แตกต่างกัน	31
3.3.3 เปรียบเทียบอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมและเติมโคโคซานและเติมพุลลูแลน	33
3.3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค FT-IR	34
3.4 ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH Radical Scavenging Activity)	36

3.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT assay)	37
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	42
ประวัติผู้วิจัย	49



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin ความเข้มข้นต่าง ๆ	20
ตารางที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin และสารสกัดจากยางของต้นเถาเอ็นอ่อน (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)	23
ตารางที่ 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin และสารสกัดจากยางของต้นเถาเอ็นอ่อน (ยางที่เก็บครั้งที่ 2)	24




สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 กลไกการเกิด เซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์	3
รูปที่ 1.2 ขนาดของอนุภาคนาโนทองคำขึ้นอยู่กับเซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์	3
รูปที่ 1.3 สีของอนุภาคนาโนที่มีขนาดแตกต่างกัน	3
รูปที่ 1.4 การสังเคราะห์แบบบนล่างและแบบล่างสู่บน	4
รูปที่ 1.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยวิธีต่าง ๆ	5
รูปที่ 1.6 การเพิ่มความเสถียรและหมู่ฟังก์ชันอนุภาคนาโนทองคำ	7
รูปที่ 1.7 โครงสร้างของโคโตซาน	8
รูปที่ 1.8 ซิเตรทบนพื้นผิวอนุภาคนาโนทองคำ	8
รูปที่ 1.9 แรงระหว่างโมเลกุลของโคโตซานกับอนุภาคนาโนทองคำ	9
รูปที่ 1.10 กลไกการเกิด AuNPs จากโคโตซาน	10
รูปที่ 1.11 โคออดิเนชันระหว่างกลูโคซามีนกับ Au^{3+}	10
รูปที่ 1.12 ต้นเถาเอ็นอ่อน	11
รูปที่ 1.13 โครงสร้างของกรดอะมิโน (a) ทรีปโตแฟน (b) ไทโรซีน (c) ซีสเทอีน	12
รูปที่ 1.14 หลักการของ DPPH Radical-Scavenging Activity Assay	13
รูปที่ 1.15 หลักการของ MTT assay	13
รูปที่ 1.16 องค์ประกอบหลักของชีวโมเลกุลในพืชที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะ	14
รูปที่ 1.17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะ โดยใช้พืช	15
รูปที่ 1.18 ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของ Tannins และ Flavonoid ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ	16
รูปที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin pH 7.0 ที่ 750 nm (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)	23
รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin pH 7.0 ที่ 750 nm (ยางที่เก็บครั้งที่ 2)	24
รูปที่ 3.3 อนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากการปรับปริมาณ $HAuCl_4$ (μL) เมื่อใช้สารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน 50 μL	25
รูปที่ 3.4 อนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากการปรับปริมาณ $HAuCl_4$ (μL):สารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน	26
รูปที่ 3.5 อนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากปริมาณ 3% NaOH ที่แตกต่างกัน	27

รูปที่ 3.6 อนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่แตกต่างกัน (1) 10 วัน (2) 13 วัน (3) 1 เดือน 17 วัน	28
รูปที่ 3.7 อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซานปริมาณแตกต่างกัน	28
รูปที่ 3.8 SEM ของอนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซานปริมาณที่ต่างกัน	29
รูปที่ 3.9 อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนปริมาณที่ต่างกัน	30
รูปที่ 3.10 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนปริมาณที่ต่างกัน	31
รูปที่ 3.11 อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ที่เสถียรด้วยไคโตซานปริมาณที่ต่างกัน	32
รูปที่ 3.12 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซานปริมาณที่ต่างกัน	32
รูปที่ 3.13 อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้	33
รูปที่ 3.14 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมและเติมไคโตซาน และเติมพุลลูแลน	34
รูปที่ 3.15 FT-IR spectra ของ (a) latex extracr (b) chitosan (c) AuNPs (d) AuNPs-CS	35
รูปที่ 3.16 ประสิทธิภาพในการทำลายหรือยับยั้งอนุمولอิสระที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากยางจากเถาเอ็นอ่อน ที่ไม่เติมและเติมไคโตซาน	36
รูปที่ 3.17 ผลความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากยางจากเถาเอ็นอ่อน ที่ไม่เติมและเติมไคโตซาน ต่อเซลล์ปกติของเนื้อเยื่อไตฉิวหนิงของหนู L929 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (μM) ของอนุภาคนาโนทองคำ	37
รูปที่ 3.18 ผลความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากยางจากเถาเอ็นอ่อน ที่ไม่เติมและเติมไคโตซาน ต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก KB ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (μM) ของอนุภาคนาโนทองคำ	38

สัญลักษณ์และคำย่อ



AuNPs	= Gold nanoparticles
AuNPs-CS	= Gold nanoparticle stabilized by chitosan
SPR	= Surface plasmon resonance
FT-IR	= Fourier transform infrared spectroscopy
UV-Vis	= Ultraviolet-Visible spectroscopy
SEM	= Scanning Electron Microscope
$\mu\text{g/mL}$	= microgram per microliter
% (w/v)	= percentage mass by volume
% (v/v)	= percentage volume by volume
μl	= microliters
nm	= nanometre
$^{\circ}\text{C}$	= degree Celsius

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

อนุภาคนาโนทองคำ (AuNPs) มีความสำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในการในเชิงชีววิทยาและชีวการแพทย์ เช่น การรักษาโรคมะเร็ง การนำส่งยา การนำไปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น เซ็นเซอร์ จากข้อดีของอนุภาคนาโนทองคำจำเป็นต้องมีความเสถียรและมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร ทำให้อนุภาคนาโนทองคำมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างไปจากทองปกติ เช่น มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไฟฟ้าได้ดี และมีสีที่เปลี่ยนแปลงตามขนาดของอนุภาค โดยคุณสมบัติเชิงแสงที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว การสังเคราะห์ AuNPs ให้มีขนาดเล็กและมีความเสถียรสูง มีการใช้สารเคมีที่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งในปัจจุบันได้นำวัสดุจากธรรมชาติมาบ่มบทบาทในการสังเคราะห์ ได้แก่ ยางของต้นไม้, โพรตีน, สารพฤษเคมีต่าง ๆ เป็นต้น เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและได้ประสิทธิภาพที่ดี โดยจำเป็นจะต้องมีบทบาทเป็นตัวรีดิวซ์และทำให้เสถียรได้ ไคโตซานเป็นโพลีเมอร์ทางธรรมชาติ ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีธาตุไนโตรเจนติดอยู่ด้วย จึงมีหมู่อะมิโนและหมู่ไฮดรอกซิล สามารถละลายน้ำได้ที่สภาวะกรดอ่อน จึงทำให้มีคุณสมบัติที่โดดเด่นและหลากหลาย มีประสิทธิภาพสูงในกิจกรรมชีวภาพ และยังสามารถสลายได้ตามธรรมชาติ จึงสามารถนำไคโตซานมาเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคนาโนทองคำได้อีกด้วย

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchmanii* Roem. & Schult.) เป็นพืชสมุนไพรจำพวกเถา มีเปลือกเถาเรียบสีน้ำตาลแกมดำ เมื่อแก่เปลือกจะหลุดออกมาเป็นแผ่น และทุกส่วนของต้นเถาเอ็นอ่อนนั้นจะมีน้ำยางสีขาวอยู่ ส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืชมีสรรพคุณใช้บ่มเป็นยาสมุนไพรเพื่อสุขภาพ เนื่องจากสามารถรักษาอาการอักเสบ เช่น โรคข้ออักเสบ บรรเทาอาการปวดเมื่อยต่าง ๆ ตามร่างกาย และยังมีสรรพคุณในการต่อต้านเชื้อราหรือแบคทีเรีย แก้อาการท้องร่วง รักษาแผลเปื่อยหรือเป็นหนอง และในน้ำยางพบเอ็นไซม์คริปโตเลเพน (*Cryptolepain*) ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ทริปโตแฟน ไทโรซีน ซีสเทอีน ซึ่งต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ จึงสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ AuNPs ได้ ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจที่จะสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำจากยางของเถาเอ็นอ่อน โดยใช้ไคโตซานเพิ่มความเสถียร

1.2 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง

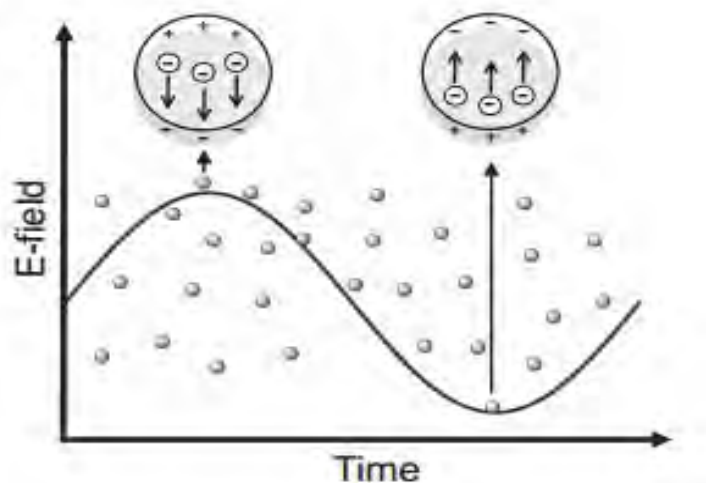
1.2.1 นาโนเทคโนโลยี

นาโนเทคโนโลยี คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับวัตถุที่มีขนาดเล็ก ในระดับโมเลกุล โดยจัดเป็นระบบ 3 มิติ ซึ่งโดยทั่วไปจะมีขนาดอยู่ระหว่าง 1-100 นาโนเมตร ซึ่งอนุภาคนาโนของโลหะจะมีคุณสมบัติทั้งทางเคมีและกายภาพที่เปลี่ยนไปจากโลหะก้อน เช่น จุดหลอมเหลวที่ต่ำลง มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูงขึ้น มีคุณสมบัติเชิงแสงที่เฉพาะตัว เป็นต้น จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางทั้งในด้านกายภาพ และชีวภาพ

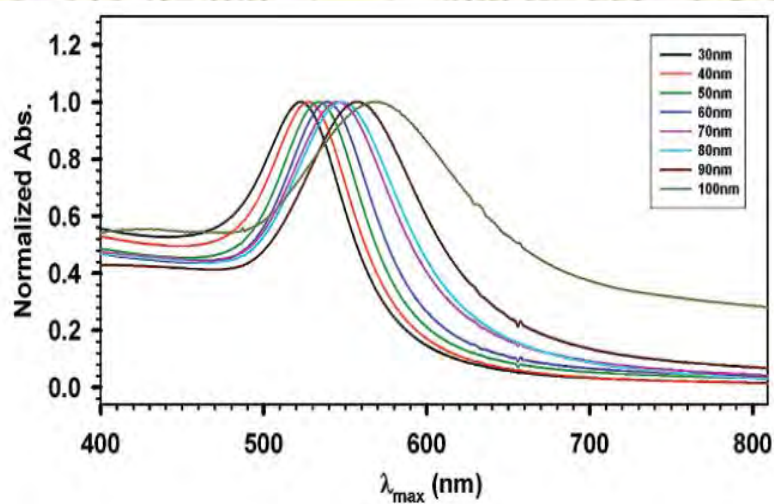
คุณสมบัติที่โดดเด่นของอนุภาคระดับนาโนเมตรของโลหะ คือ คุณสมบัติเชิงแสงซึ่งจะแสดงถึงเอกลักษณ์ของโลหะต่าง ๆ เช่น อนุภาคนาโนทองคำขนาด 20 นาโนเมตร มีสีแดง อนุภาคนาโนของเงินมีสีเหลือง อนุภาคนาโนของแพลทินัม มีสีดำ เป็นต้น [1]

1.2.2 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนทองคำ

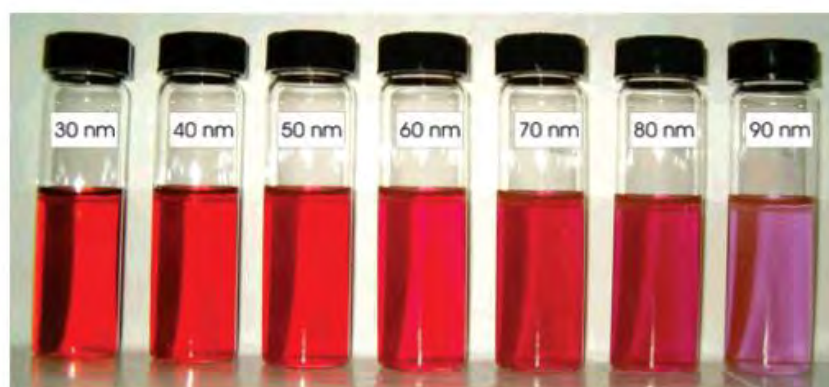
ทองคำเป็นธาตุที่รู้จักกันโดยทั่วไป โดยมีลักษณะสมบัติที่เป็นธาตุเฉื่อย มักไม่ทำปฏิกิริยา มีความปลอดภัย สามารถนำมาใช้กันมาทางการแพทย์ในการเป็นสารป้องกันการอักเสบของเนื้อเยื่อในการรักษาโรค ซึ่งโดยทั่วไปทองคำจะมีลักษณะเป็นสีเหลือง แต่เมื่อทองคำอยู่ในระดับนาโนเมตร จะส่งผลให้อนุภาคของทองคำนั้นมีขนาดเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่มากกระทบมาก จึงทำให้เกิดปรากฏการณ์เชิงแสงที่เรียกว่า เซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) พลาสมอน คือ การเกิดการสั่นรวม (collective oscillation) ของประจุในโลหะ แสดงออกมาในรูปคลื่น โดยประจุบวกจะอยู่กับที่และประจุลบจะเคลื่อนที่รอบ ๆ โลหะ เมื่อมีสนามแม่เหล็กภายนอก เช่น แสงของแสง เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอิเล็กตรอนอิสระที่ผิวของโลหะเกิดการสั่นรวม ทำให้พลาสมอนที่พื้นผิวเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากอิเล็กตรอนในอนุภาคมีประจุไฟฟ้า ดังนั้นเมื่อเกิดการสั่นจะทำให้เกิดสนามแม่เหล็กสอดคล้องกับสนามแม่เหล็กภายนอก ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า เซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ โดยจะเกิดที่ผิวของอนุภาคโลหะดังรูปที่ 1.1 แต่อย่างไรก็ตามขนาดอนุภาคของโลหะจะเล็กกว่าความยาวคลื่นของแสงจากภายนอกที่มากกระทบ ซึ่งความยาวคลื่นที่สอดคล้องกับ SPR จะขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะ รูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนของโลหะ ดังรูปที่ 1.2 โดยอนุภาคนาโนทองคำมีพีคของ SPR ขึ้นที่ 520-550 นาโนเมตร โดยจะเกิดการดูดกลืนที่แสงสีเขียว ทำให้เห็นเป็นแดงหรือม่วงดังรูปที่ 1.3 [1-2]



รูปที่ 1.1 กลไกการเกิด เซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ [1]



รูปที่ 1.2 เซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคนาโนทองคำ [2]



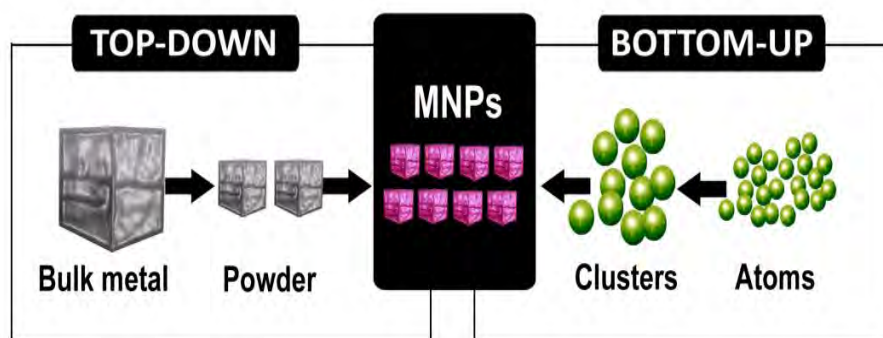
รูปที่ 1.3 สีของอนุภาคนาโนที่มีขนาดแตกต่างกัน [2]

1.2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ

โดยทั่วไปการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำมี 2 แบบ [3] ดังรูปที่ 1.4 คือ

แบบที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์แบบใหญ่ไปเล็ก (top-down) เป็นการสร้างจากขนาดใหญ่ให้เป็นขนาดเล็ก โดยการตัดแบ่งวัสดุขนาดใหญ่ให้เล็กลงจนถึงระดับนาโนเมตรด้วยแรงภายนอก โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น การยิงด้วยเลเซอร์ (laser ablation) หรือการฉายรังสีไอออน (ion irradiation) แต่พบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดคือควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคได้ยาก [4] ซึ่งเทคนิคต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นทางกายภาพหรือเคมี มีการใช้สารเคมีที่ทำให้เกิดอันตรายอย่างมาก

แบบที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์แบบเล็กไปใหญ่ (bottom-up) เป็นการสังเคราะห์โดยเริ่มต้นจากการเรียงอะตอมแต่ละอะตอมประกอบขึ้นเป็นอนุภาคจนมีขนาดนาโนเมตร โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชันของสารเคมี (chemical reduction) หรือวิธีทางชีวภาพ (biological method) เช่น พืชหรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมขนาดของอนุภาคได้โดยปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นกรดคลอโรอริก ตัวรีดิวซ์ อุณหภูมิ และสารลดแรงตึงผิว ในปัจจุบันการสังเคราะห์แบบเล็กไปใหญ่นิยมใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำมากกว่าแบบใหญ่ไปเล็ก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคได้ง่าย [3]

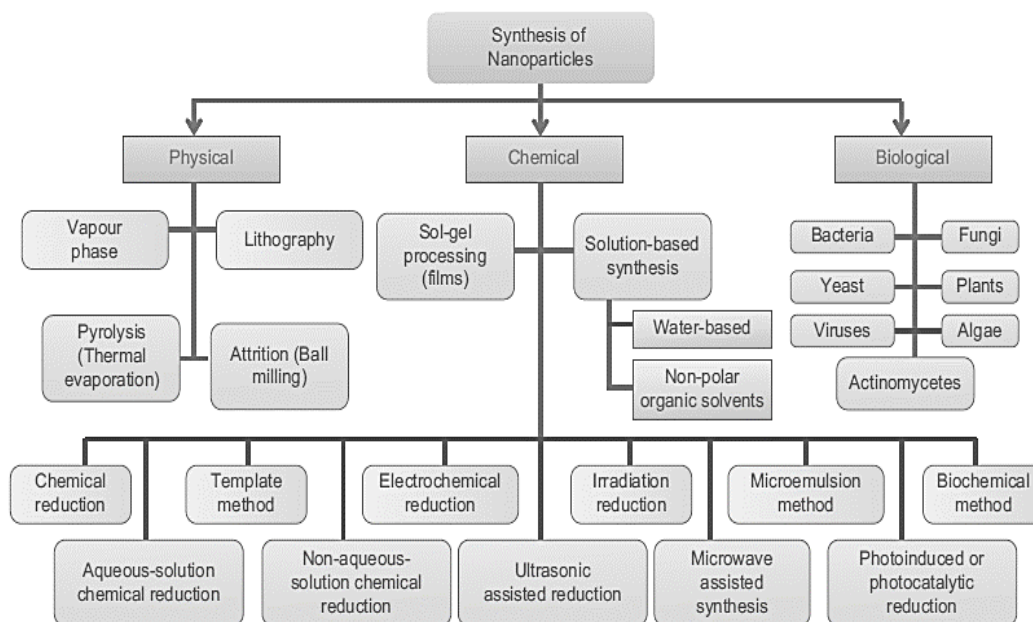


รูปที่ 1.4 การสังเคราะห์แบบบนล่างและแบบล่างสู่บน [5]

การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายกรดคลอโรอริก (HAuCl_4) โดยใช้ตัวรีดิวซ์ เช่น โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) หรือ โซเดียมซิเตรท ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) [6] เพื่อเปลี่ยนไอออนของทอง (Au^{3+}) เป็นอะตอมของทอง (Au^0) จากนั้นอะตอมทองรวมตัวกันหลายๆ อะตอมจนกลายเป็นอนุภาคนาโนทองคำที่มีขนาดระดับนาโนเมตร ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ที่มีของแข็งขนาดนาโนเมตรแขวนลอยอยู่ในสารละลาย ส่วนวิธีทางชีวภาพ (biological method) เป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งได้รับความนิยมนสูงมาก เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย สามารถเกิดอนุภาคนาโนของโลหะได้รวดเร็ว โดยใช้เนื้อเยื่อ

ต่าง ๆ ของพีชมาใช้ในการสังเคราะห์ เช่น ใบ ลำต้น เปลือก หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย ฟังไจ ยีสต์ [3]

ดังนั้นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยวิธีต่าง ๆ สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 1.5 โดยแบ่งเป็น 3 วิธี คือ การสังเคราะห์ทางกายภาพ การสังเคราะห์ทางเคมี และการสังเคราะห์ทางชีวภาพ ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี ข้อเสียที่แตกต่างกัน [7]



รูปที่ 1.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยวิธีต่าง ๆ [7]

- (1) การสังเคราะห์ทางกายภาพ (physical method) มีข้อเสียในการใช้ต้นทุนในการสังเคราะห์สูง ไม่มีประสิทธิภาพในด้านวัสดุและพลังงานที่ใช้ในการควบคุมขนาดอนุภาค
- (2) การสังเคราะห์ทางเคมี (chemical method) มีข้อดีในการทำให้ได้อนุภาคที่มีการกระจายตัวสูงอย่างสม่ำเสมอ แต่มีข้อเสียเนื่องจากสารเคมีและพลังงานที่ใช้มีราคาแพง และยังเป็นสารเคมีที่เป็นอันตราย ทำให้ไม่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม
- (3) การสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biological method) มีข้อดีในการทำให้ได้อนุภาคที่มีการกระจายตัวสูงอย่างสม่ำเสมอ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

1.2.4 การประยุกต์ใช้อุณหภูมิกำโนทองคำ

ในปัจจุบันมีการนำอนุภาคนำทองคำไปใช้กันอย่างกว้างขวาง [8] ประกอบด้วย

(1) ระบบอิเล็กทรอนิกส์ อนุภาคนำทองคำได้รับการออกแบบเพื่อใช้เป็นตัวนำจากหมึกพิมพ์ ที่ในปัจจุบันนี้อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์มีขนาดเล็กลง อนุภาคนำทองคำจึงเป็นองค์ประกอบสำคัญในการ ออกแบบชิป และมีการใช้ในการเชื่อมต่อตัวต้านทาน ตัวนำและองค์ประกอบอื่น ๆ ของชิป อิเล็กทรอนิกส์

(2) การรักษาโดยใช้แสงกระตุ้น อนุภาคนำทองคำที่ดูดกลืนช่วงใกล้รังสีอินฟราเรด (รวมทั้ง เปลือกนำทองคำและแท่งนำทองคำ) สามารถผลิตความร้อนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงในช่วงความยาวคลื่น 700-800 นาโนเมตร ซึ่งจะช่วยให้อนุภาคนำทองคำเหล่านี้กำจัดเนื้องอก เมื่อแสงถูกนำไปใช้ในเนื้องอกที่มี อนุภาคนำทองคำอนุภาคอยู่ อนุภาคจะร้อนขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้เซลล์มะเร็งถูกกำจัด โดยเรียกกันว่า การรักษาด้วยความร้อน (hyperthermia therapy)

(3) การนำส่งสารโดยใช้โมเลกุลต่าง ๆ เคลือบบนพื้นผิวของอนุภาคนำทองคำ เนื่องจากมี อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ทำให้สามารถเคลือบด้วยโมเลกุลได้มาก เช่น การนำส่งยา รักษาโรค

(4) เซนเซอร์ อนุภาคนำทองคำถูกนำมาใช้เป็นเซนเซอร์อย่างแพร่หลาย เช่น การตรวจวัด จากสี โดยสามารถระบุได้ว่าอาหารมีความเหมาะสมต่อการบริโภค สามารถนำมาใช้ในการตรวจหา โปรตีน สารมลพิษ และโมเลกุลอื่น ๆ

(5) การตรวจสอบ อนุภาคนำทองคำสามารถกระจายแสง ทำให้เห็นเป็นสีต่าง ๆ ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ โดยสามารถนำไปใช้ในการถ่ายภาพทางชีวภาพ ซึ่งอนุภาคนำทองคำที่ดีจะต้องมี ความหนาแน่นมาก จึงจะทำให้มีประโยชน์ในการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์มากขึ้น

(6) วินิจฉัยและรักษาโรค อนุภาคนำทองคำสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อ รักษาโรคหัวใจ โรคมะเร็ง รักษาการติดเชื้อ และใช้ในครัวเรือนทั่วไป เช่น การทดสอบการตั้งครรภ์ด้วย ตนเอง

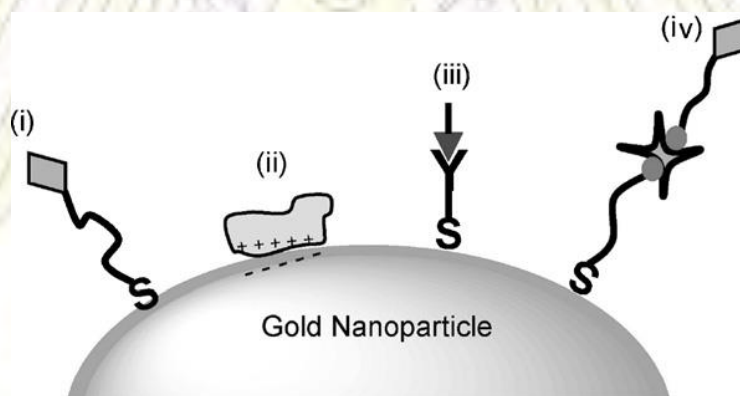
(7) ตัวเร่งปฏิกิริยา สำหรับปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ เนื่องจากพื้นผิวของอนุภาคนำทองคำสามารถ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้หรือในบางกรณีสามารถลดการเกิดปฏิกิริยา (ไนโตรเจนออกไซด์) นอกจากนี้ อนุภาคนำทองคำสามารถพัฒนาสำหรับการใช้งานเชื้อเพลิง ซึ่งเทคโนโลยีเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ใน อุตสาหกรรมยานยนต์

1.2.5 การเพิ่มความเสถียรให้อนุภาคนาโนทองคำ

การทำให้อนุภาคนาโนทองคำมีความเสถียรหรือการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิว เพื่อให้สามารถนำอนุภาคนาโนทองคำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย มี 3 วิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง [9]

ดังรูปที่ 1.6

- (1) อาศัยพันธะโควาเลนต์ระหว่าง AuNPs กับลิแกนด์ที่มีหมู่ไทออล (-SH), ฟอสฟีน (phosphine), และอะมิโน (-NH₂) เป็นต้น ทำให้มีความซับซ้อนมาก พันธะมีความแข็งแรง อนุภาคจึงมีความเสถียรมาก โดยสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเทคนิคที่นำมาใช้มากที่สุด คือ กระบวนการสร้างพันธะระหว่างอนุภาคทองคำและลิแกนด์ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ
- (2) อาศัยแรงดึงดูดระหว่างประจุหรือการดูดซับทางกายภาพของลิแกนด์ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและใช้เวลาไม่นาน ทำให้มีข้อดีมากกว่าการใช้พันธะโควาเลนต์ แต่อย่างไรก็ตามพันธะจะไม่แข็งแรง ทำให้สามารถหลุดออกได้ง่ายเมื่อทำปฏิกิริยา ทำให้อนุภาคไม่เสถียรมาก ทำให้ไม่เหมาะในการนำไปใช้ประโยชน์
- (3) นำไปติดกับสารชีวโมเลกุลอย่างโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตที่มีความจำเพาะ เช่น แอนติบอดี-แอนติเจน, ไบโอดีน-อะวิดิน เป็นต้น

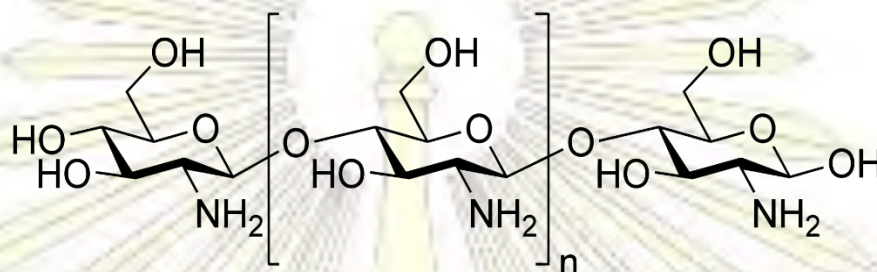


- (i): thiolated or disulfide modified ligands
(ii): Electrostatic interaction
(iii): antibody–antigen associations
(iv): streptavidin–biotin binding

รูปที่ 1.6 การเพิ่มความเสถียรและหมู่ฟังก์ชันอนุภาคนาโนทองคำ [9]

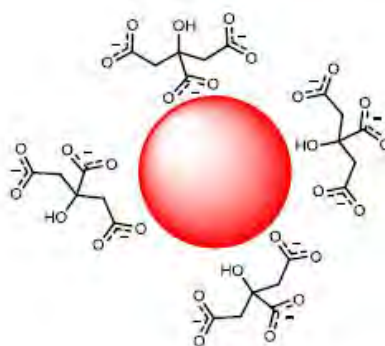
1.2.6 ไคโตซาน

ไคโตซาน เป็นโพลิเมอร์ทางธรรมชาติ ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญในรูปของ ดีกลูโคซามีน (D-glucosamine) ดังรูปที่ 1.7 จึงมีหมู่อะมิโนและหมู่ไฮดรอกซิล สามารถละลายน้ำได้ที่สภาวะกรดอ่อน จึงทำให้มีคุณสมบัติที่โดดเด่นและหลากหลาย มีประสิทธิภาพสูงในกิจกรรมชีวภาพ และยังสามารถสลายได้ตามธรรมชาติ จึงสามารถนำไคโตซานมาเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคนาโนทองคำได้อีกด้วย [10]



รูปที่ 1.7 โครงสร้างของไคโตซาน

มีงานวิจัยต่าง ๆ นำไคโตซานมาเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคนาโนทองคำ โดยพบว่าเมื่อใช้ซิเตรทเป็นตัวรีดิวซ์ พื้นผิวของโมเลกุลจะมีประจุลบมากขึ้น เนื่องจากซิเตรทสามารถดูดซับได้บนพื้นผิวอนุภาคเกิดแรงผลักกันทางไฟฟ้าดังรูปที่ 1.8 ดังนั้นอนุภาคจะสามารถมารวมตัวกัน เมื่อมีปริมาณซิเตรทน้อยลง จากนั้นเมื่อใส่ไคโตซานลงไปประจุบนพื้นผิวของอนุภาคจะมีแรงทางไฟฟ้ากับประจุบวกของไคโตซาน เนื่องจากโมโนเมอร์ของไคโตซานเป็นดีกลูโคซามีน (D-glucosamine) ซึ่งมีหมู่เอมีนสามารถรับโปรตรอนได้ในสภาวะที่เป็นกรด [10]

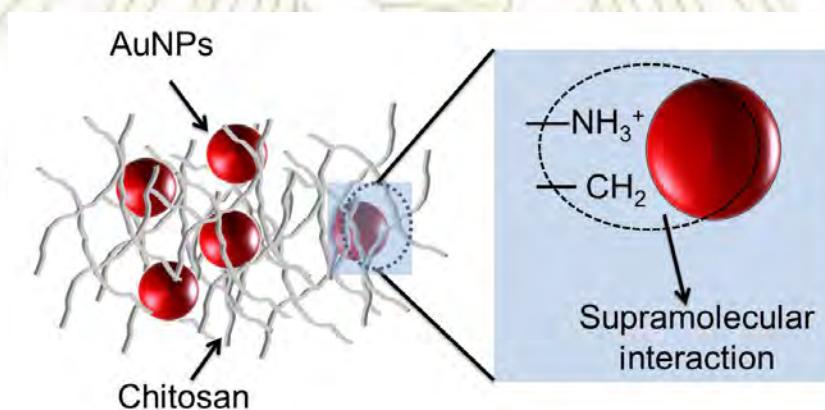


รูปที่ 1.8 ซิเตรทบนพื้นผิวอนุภาคนาโนทองคำ [10]

ไคโตซานสามารถทำปฏิกิริยาบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองคำได้ ทำให้สามารถควบคุมขนาด และทำให้อนุภาคมีความเสถียรเป็นเวลามากกว่า 3 เดือน โดยที่ความยาวคลื่นของเซอร์เฟซพลาสมอน เรโซแนนซ์ (SPR) ไม่เปลี่ยนแปลง ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็น เวลา ความแรงไอออน (ionic strength) อุณหภูมิ พีเอช เป็นต้น จึงมีการเสนอ 3 กลไกที่ให้อนุภาคนาโนทองคำมีความเสถียร ดังนี้

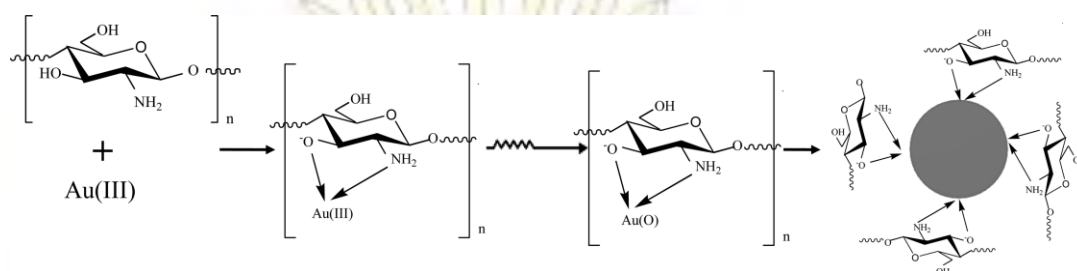
- (1) เกิดจากประจุทางไฟฟ้าที่ต่างชนิดกันและความเกะกะ จะมีความเสถียรมากในสภาวะที่เป็นกรดและค่าความแรงไอออนต่ำ
- (2) เกิดจากความเกะกะ ความเสถียรจะขึ้นอยู่กับสภาวะที่เป็นกรดและค่าความแรงไอออนสูง
- (3) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลางจะทำให้ไม่สามารถทำให้อนุภาคเสถียรได้

จากสัณฐานที่พีเอช 4.8 และมีค่าความแรงไอออนสูง มีลักษณะตรงกับกรณี (2) พบว่า $R-NH_3^+$ จากไคโตซานทำให้อนุภาคเสถียร จึงมีการพิจารณาโครงสร้างสามมิติของไคโตซานและอนุภาคนาโนทองคำ เนื่องจาก CH_2 ของดีกลูโคซามีนบนโครงสร้างของไคโตซานก็มีบทบาทเช่นกัน ดังรูปที่ 1.9 ถึงแม้ว่าจะไม่มีหลักฐานชัดเจนว่าหมู่ฟังก์ชันใดที่มีประสิทธิภาพในการทำให้อนุภาคนาโนทองคำเสถียรได้ดีที่สุด แต่ปฏิกริยาระหว่างกันของโมเลกุลที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของพันธะที่มีส่วนทำให้อนุภาคนาโนทองคำเสถียร [11]



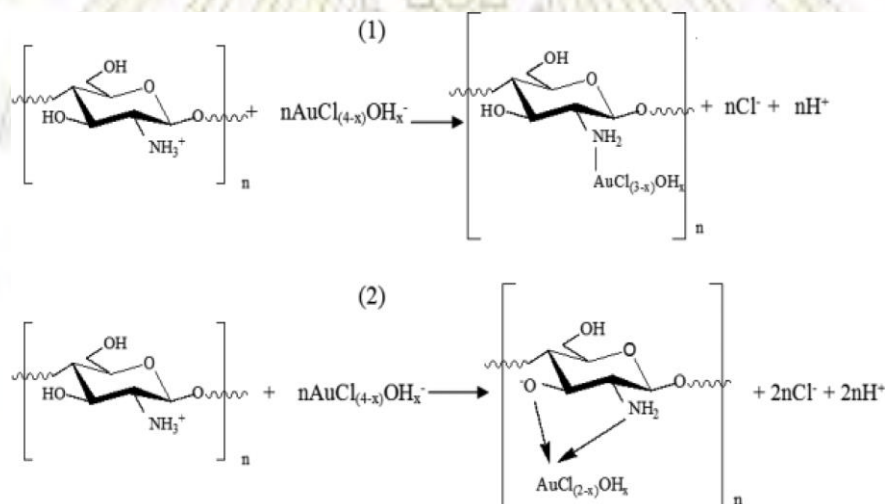
รูปที่ 1.9 แรงระหว่างโมเลกุลของไคโตซานกับอนุภาคนาโนทองคำ [11]

การศึกษาอิทธิพลของโคโตซานที่มีต่อ Au^{3+} ทำให้เกิดอนุภาคนาโนทองคำ พบว่าได้อนุภาคนาโนทองคำที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของ Au^{3+} ด้วยโคโตซาน [12] ดังรูปที่ 1.10



รูปที่ 1.10 กลไกการเกิด AuNPs จากโคโตซาน [12]

ความแตกต่างเนื่องจากการสูญเสียโปรตอนจาก $AuCl_4^-$ และกลูโคซามีนจากโคโตซาน ซึ่งสามารถเพิ่มการสูญเสียโปรตรอนได้ เนื่องจากมีเอมีนปฐมภูมิ (primary amine) และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 1.11 จะเห็นได้ว่ากลูโคซามีนสามารถปลดปล่อยได้ 1 หรือ 2 โปรตอน



รูปที่ 1.11 โคออดิเนชันระหว่างกลูโคซามีนกับ Au^{3+} [12]

- (1) การเชื่อมต่อระหว่างไนโตรเจนอะตอมของหมู่เอมีนบนกลูโคซามีนเป็นแบบแบบมอนอดেন্টาเทต (monodentate)
- (2) การเชื่อมต่อเป็นแบบไบเดนเตต (bidentate) ซึ่งเชื่อมระหว่างไนโตรเจนอะตอมของเอมีนปฐมภูมิและออกซิเจนอะตอมที่สูญเสียโปรตอนบนหมู่ไฮดรอกซิล เกิดเป็นวงห้าเหลี่ยมที่มีความเสถียร

1.2.7 ต้นเถาเอ็นอ่อน

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult.) จัดเป็นไม้เถาเลื้อยพาดพันกับต้นไม้อื่น เป็นไม้เลื้อยจำพวกเถาเนื้อแข็ง เถาลำต้นกลม เปลือกเถาเรียบหนาเป็นสีน้ำตาลอมสีดำหรือเป็นสีแดงเข้มและมีลายประตลอดเถา ยาวประมาณ 4-5 เมตร ก้านเล็ก มีสีเทาอมเขียวและไม่มีขนปกคลุม เมื่อเถาแก่เปลือกจะหลุดลอกออกเป็นแผ่น ๆ มียางสีขาวข้นทั้งต้นดังรูปที่ 1.12 พรรณไม้ชนิดนี้ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด มักพบขึ้นตามป่าราบหรือตามที่รกร้าง ทางจังหวัดห้วยกระบุรี ส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืชมีสรรพคุณต่าง ๆ ดังนี้

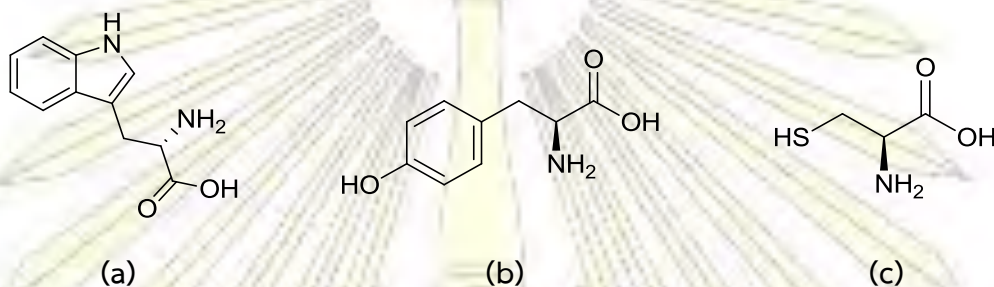
- (1) ราก เถา และใบมีรสขม เป็นยาเย็น มีพิษ ออกฤทธิ์ต่อหัวใจและตับ ใช้เป็นยาพอกเลือด
- (2) เถานำมาต้มกินจะช่วยทำให้จิตใจชุ่มชื้น
- (3) เมล็ดมีรสขมเมา สรรพคุณเป็นยาขับลมในลำไส้และในกระเพาะอาหาร ทำให้ผายและเรอ ช่วยแก้อาการจุกเสียดแน่นท้อง
- (4) เถาใช้แก้อาการฟกช้ำดำเขียว
- (5) ใบและเถามีสรรพคุณเป็นยาบำรุงเส้นเอ็น แก้อาการปวดเมื่อย โดยใบมีรสขมให้คลื่นไส้ ใช้ทำเป็นลูกประคบ แก้ปวดเส้นเอ็น ช่วยคลายเส้นเอ็น ทำให้เส้นเอ็นที่ตึงยึดหย่อน ส่วนเถามีรสขม แก้เส้นเอ็นพิการ เส้นแข็ง แก้อาการปวดเมื่อยเส้นเอ็น แก้อาการปวดบวม ปวดเมื่อยตามร่างกาย ปวดหลัง แก้ขัดยอก [13]



รูปที่ 1.12 ต้นเถาเอ็นอ่อน [13]

จากงานวิจัยของ Laupattarakasem และคณะ [14] ได้ทำการศึกษาด้านเถาเอ็นอ่อนในภาคใต้ของประเทศไทย โดยลำต้นสามารถนำมาใช้ในการรักษาการอักเสบ เช่น โรคข้ออักเสบ กล้ามเนื้ออักเสบ และอาการบาดเจ็บของข้อต่อ ต่อมา Vinayaka และคณะ [15] พบว่าสารสกัดจากต้นเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อรา ที่เป็นสาเหตุของโรคกลากเกลื้อน

นอกจากนี้ในน้ำยางพบเอ็นไซม์คริปโตเลเพน (Cryptolepain) ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ดังรูปที่ 1.13 คือ ทริปโตแฟน ไทโรซีน ซีสเทอีน ซึ่งต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ [16-17] จึงสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำได้



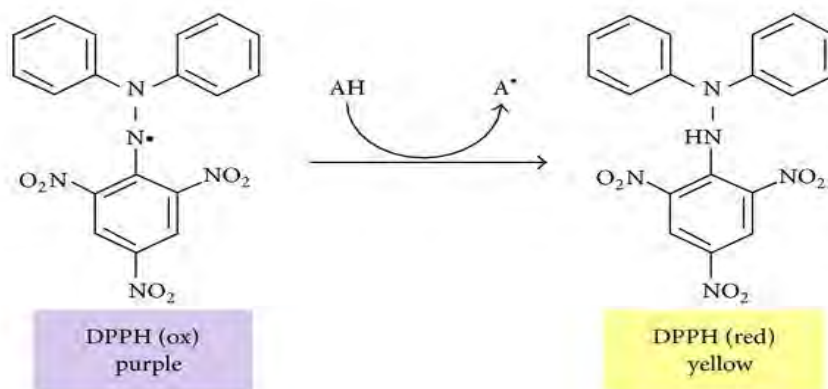
รูปที่ 1.13 โครงสร้างของกรดอะมิโน (a) ทริปโตแฟน (b) ไทโรซีน (c) ซีสเทอีน

1.2.8 การต่อต้านอนุมูลอิสระ (DPPH Radical-Scavenging Activity Assay)

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมาก จึงจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ทำลายสมดุลของระบบต่าง ๆ โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ สามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ โดยทั่วไปอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอื่น ใน 2 รูปแบบ คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนมาจากสารโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงและการเพิ่มโมเลกุลของออกซิเจนเข้าไป เพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl radical)

สารที่นำมาใช้ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งสารต่อต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ ได้แก่ สารเคมีจากพืช ผัก ผลไม้ สมุนไพร ชา เป็นต้น โดยพบสารสำคัญหลายชนิดได้แก่ สารประกอบฟีนอล วิตามินซี เบต้าแคโรทีน แคโรทีนอยด์ เป็นต้น

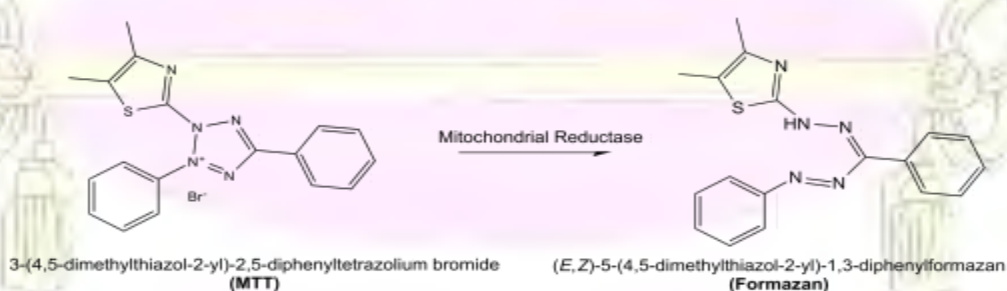
DPPH Radical-Scavenging Activity Assay ใช้อนุมูลอิสระ DPPH• เป็นอนุมูลที่มีไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ ซึ่งถ้ามีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ดังรูปที่ 1.14



รูปที่ 1.14 หลักการของ DPPH Radical-Scavenging Activity Assay [18]

1.2.8 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT assay)

หลักการทำงานของ MTT assay คือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่เท่านั้นที่สามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase เปลี่ยน MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ให้เป็น formazan โดยปฏิกิริยารีดักชัน ดังรูปที่ 1.15 โดยผลึกของ formazan ที่ได้มีสีม่วงน้ำเงิน และมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 550-600 nm การดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสีม่วงน้ำเงินหรือปริมาณ formazan ที่เกิด แปรผันโดยตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase enzyme ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น จึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยการวัดปริมาณ formazan ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง MTT ภายในเซลล์

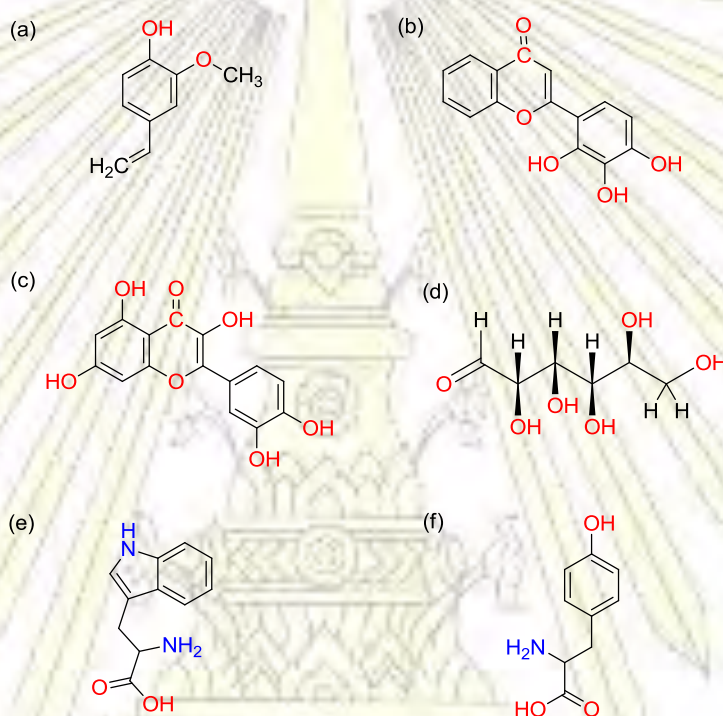


รูปที่ 1.15 หลักการของ MTT assay [19]

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การสังเคราะห์ AuNPs ให้มีขนาดเล็กและมีความเสถียรสูง มีการใช้สารเคมีที่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งในปัจจุบันได้นำวัสดุจากธรรมชาติที่มีบทบาทในการสังเคราะห์ ได้แก่ ยางของต้นไม้, โปรตีน, สารพฤกษเคมีต่าง ๆ เป็นต้น เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและได้ประสิทธิภาพที่ดี โดยจำเป็นจะต้องมีบทบาทเป็นตัวรีดิวซ์และทำให้เสถียร

ต่อมา Makarov และคณะ [20] ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะ โดยใช้พืช พบว่าสารที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันไปเป็นอนุภาคนาโนของโลหะที่แตกต่างกัน ซึ่งองค์ประกอบหลักที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์แสดงดังรูปที่ 1.16



รูปที่ 1.16 องค์ประกอบหลักของชีวโมเลกุลในพืชที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะ

(a) เทอร์พีนอยด์ (ยูจีนอล) (b,c) ฟลาโวนอยด์ (ลูทีโอลลิน, เควอซีทิน)

(d) เฮกโซส (e,f) กรดอะมิโน (ทริปโตแฟน, ไทโรซีน) [20]

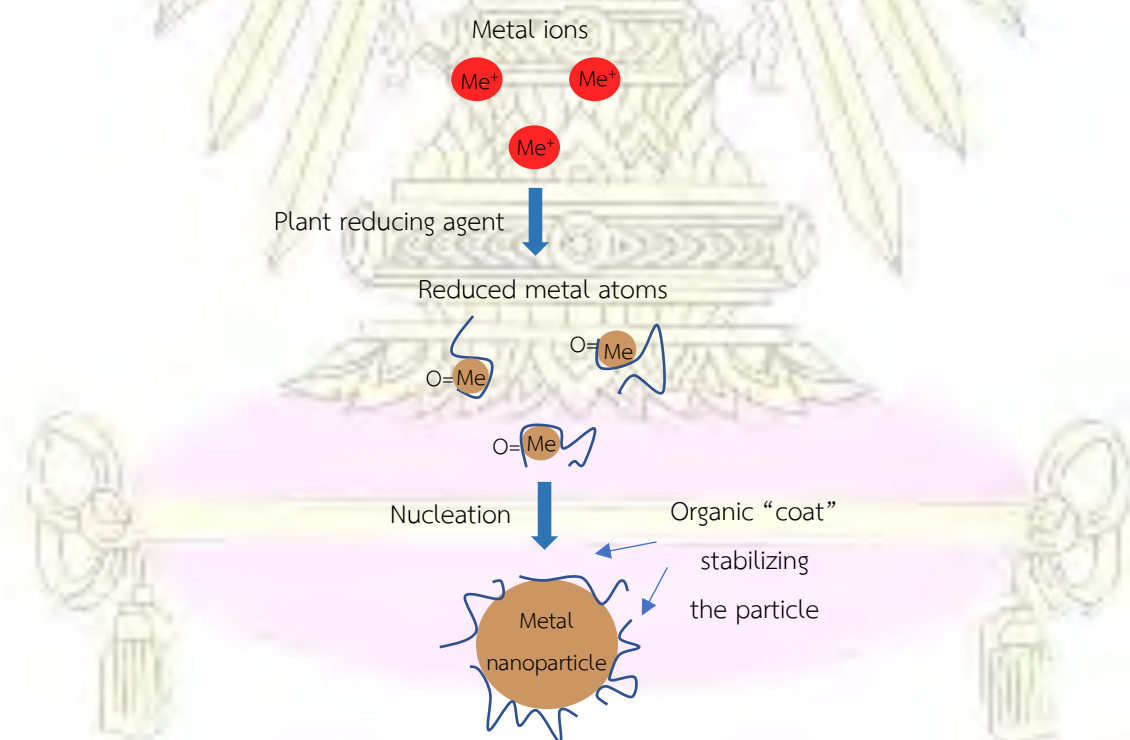
จากการศึกษาพบว่าโปรตีนมีบทบาทในการสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนเมตรจากพืช เนื่องจากกรดอะมิโนที่แตกต่างกันจะมีประสิทธิภาพในการเชื่อมต่อกับโลหะและเป็นตัวรีดิวซ์ที่ต่างกัน โดยพบว่าทริปโตแฟน (tryptophan) เป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีที่สุด สำหรับไอออนของทอง แต่ฮิสทีดีน (histidine) สามารถเชื่อมต่อกับไอออนทองได้ดีที่สุด เนื่องจากกรดอะมิโนสามารถเชื่อมต่อกับไอออนของโลหะผ่านทางหมู่อะมิโนและคาร์บอนิลผ่านทางโครงสร้างหลักหรือโซ่ข้างของหมู่อะมิโน เช่น

หมู่คาร์บอนิลของแอสปาร์ติก (aspartic) และกลูตามิก (glutamic) หรือไนโตรเจนในวงอิมิดาโซล (imidazole ring) ของฮิสทีดีน รวมถึงโซ่ข้างอื่น ๆ ที่สามารถเชื่อมต่อกับไอออนของโลหะได้ เช่น ไทออล (-SH) ของซิสเทอีน (cysteine), ไทโออีเทอร์ (-S-) และเมไทโอนีน (methionine), ไฮดรอกซิล (-OH) ของซีรีน (serine), ธรีโอนีน (threonine) และไทโรซีน (tyrosine), คาร์บอนิล (C=O) ของแอสพาราจีน (asparagine) และกลูตามีน (glutamine) [20]

การศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนของโลหะ พบว่าหมู่ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชันของเงินคือ หมู่ไฮดรอกซิลของไทโรซีน หมู่คาร์บอนิลของกลูตามีนและแอสพาราจีน รวมถึงหมู่ไทออลของซิสเทอีนและหมู่อะมิโนก็มีบทบาทในปฏิกิริยารีดักชันของโลหะอีกด้วย [20]

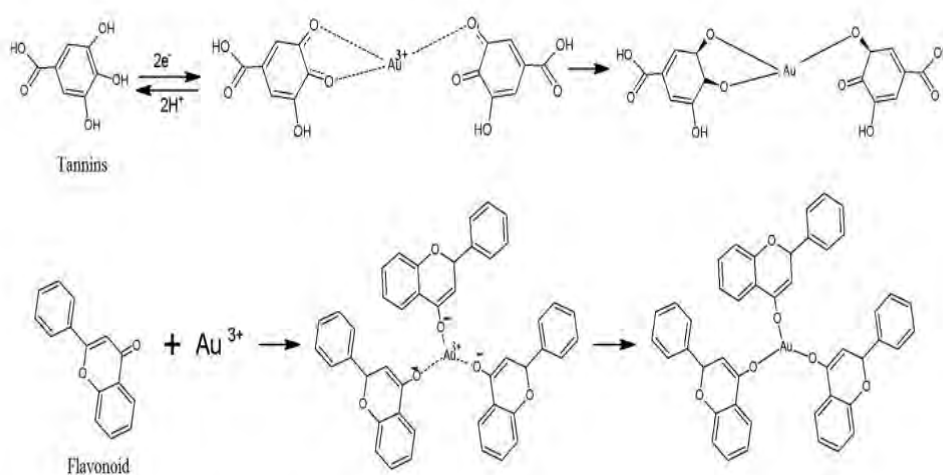
กลไกการเกิดปฏิกิริยาในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะ โดยใช้พืช แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนดังรูปที่ 1.17

- (1) สภาวะกระตุ้น (the activation phase) ไอออนของโลหะเกิดปฏิกิริยารีดักชันและเกิดการรวมตัวของอนุภาคเกิดเป็นนิวเคลียส
- (2) สภาวะเจริญเติบโต (the growth phase) เกิดการรวมกันของอนุภาคโดยที่อนุภาคจะรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้นในขนาดนาโนเมตร
- (3) สภาวะสุดท้าย (the termination phase) ขนาดมีความคงที่ เนื่องจากมีสารจากพืชที่เพิ่มความเสถียร



รูปที่ 1.17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะ โดยใช้พืช [20]

Shabestarian และคณะ [21] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำจากสารสกัดจากชูแมค และทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบว่า $AuCl_4^-$ สามารถออกซิไดซ์สารประกอบแทนนินและฟีนอล ทำให้หมู่ไฮดรอกซิลเปลี่ยนไปเป็นหมู่คาร์บอนิล และไพอิเล็กตรอน (π electron) ของหมู่คาร์บอนิลเมื่อเข้าสู่กระบวนการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน (Red/Ox system) จะส่งอิเล็กตรอนให้ออร์บิทัลที่ว่างของโลหะ เพื่อเปลี่ยนเป็นอนุภาคของโลหะได้ ดังรูปที่ 1.18 ดังนั้นจึงมีการเสนอว่าสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แทนนิน (tannins) และสารประกอบฟีนอลอื่น ๆ สามารถทำหน้าที่เป็น capping agent ในการสร้างอนุภาคนาโนทองคำ ซึ่งมีส่วนช่วยในการรักษาความเสถียร



รูปที่ 1.18 ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของ Tannins และ Flavonoid ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ [21]

Das และคณะ [22] ใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการสังเคราะห์ คือ อยางจากต้นรัก (Calotropis procera) ที่มีลักษณะเป็นยางข้นสีขาว รวมถึงมีปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ มีเอนไซม์ซิสเตอีนโปรตีเอส (cysteine protease) ที่มีหมู่ไทออลอิสระและทริปโตเฟน (tryptophan) พบว่าสามารถสังเคราะห์ได้อนุภาคที่มีความเสถียรสูงและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านชีวการแพทย์ได้

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้จะเป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำจากยางของเถาเอ็นอ่อน ทำการปรับปริมาณของสารละลายกรดคลอโรอริก สารสกัดยางจากต้นเถาเอ็นอ่อนและโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ จากนั้นใช้โคโตซานเพิ่มความเสถียร โดยอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสารละลายสีเหลืองไปเป็นสารละลายแดงหรือม่วง ขึ้นกับสภาวะที่แตกต่างกัน โดยหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (Lowry method) ส่วนอนุภาคนาโนทองคำนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Vis spectroscopy) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นำไปตรวจสอบด้วยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR spectroscopy) จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

1.5 วัตถุประสงค์

1. สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยโคโตซาน โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน
2. ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยโคโตซาน โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติและเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์

2.2.1 เครื่องมือ

- (1) พูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR spectroscopy)
- (2) ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Vis spectroscopy)
- (3) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

2.1.2 อุปกรณ์

- (1) บีกเกอร์
- (2) หลอดทดลอง
- (3) ไมโครปิเปต
- (4) แท่งแม่เหล็กกวนสาร
- (5) เครื่องให้ความร้อน
- (6) เทอร์โมมิเตอร์
- (7) กระดาษวัดค่าพีเอช
- (8) เครื่องหมุนเหวี่ยง
- (9) ขวดกำหนดปริมาตร

2.2 รายการสารเคมี

- (1) สารละลายกรดคลอโรอริก (HAuCl_4)
- (2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- (3) โซเดียมคาร์บอเนต (NaCO_3)
- (4) คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- (5) โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- (6) สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin)
- (7) ไคโตซาน
- (8) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- (9) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- (10) โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- (11) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

- (12)Folin & Ciocalteu's phenol
- (13)2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (DPPH)
- (14)เอทานอล ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)
- (15)กรดแกลลิก ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 โดยการชั่ง NaCl 80.0 กรัม, KCl 2.0 กรัม, KH_2PO_4 2.7 กรัม, Na_2HPO_4 14.2 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เจือจางสารละลาย 10 เท่า จากนั้นปรับให้เป็นพีเอช 7.4

2.3.2 เตรียมสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน

1. ยางที่เก็บครั้งที่ 1 นำยางที่เก็บจากต้นเถาเอ็นอ่อนละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 สัดส่วน 1:1 เก็บใส่ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C
2. ยางที่เก็บครั้งที่ 2 เก็บยางมา 0.3434 กรัม ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาณ 5 mL

2.3.3 หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนด้วยวิธีลาวรี (Lowry method)

วิธีหาปริมาณโปรตีนที่มีความแม่นยำสูงจะต้องผ่านการไฮโดรไลซิสกรดอะมิโนด้วยกรด ซึ่งวิธีที่ใช้ส่วนใหญ่มีความไว (sensitivity) กับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน แต่ไม่สามารถหาความเข้มข้นที่แน่นอนได้ วิธีลาวรีไม่มีข้อจำกัดนี้จึงมีความไวและแม่นยำในการหาปริมาณโปรตีนมาก จึงถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นโปรตีนที่ผสมกันหรือสารสกัดหยาบ [23]

วิธีนี้ได้พัฒนาปรับปรุงจากปฏิกิริยาไบยูเรต (Biuret reaction) ที่เกิดจากพันธะเปปไทด์ของโปรตีนทำปฏิกิริยากับคอปเปอร์ภายใต้สภาวะเบส ทำให้เกิด Cu^+ ซึ่งเกิดปฏิกิริยากับโพลีโมลิบเดต (Folin reagent) และ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งมีส่วนผสมของฟอสฟอโมลิบเดต (phosphomolybdate) และฟอสฟอโมทังสเตต (phosphotungstate) ได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม วิธีนี้มีสารเคมีที่ไปรบกวนหลายชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอล รวมทั้ง ฟีนอลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน น้ำตาลต่าง ๆ เช่น กลูโคส ซูโครส รวมทั้งกลีเซอรอล ไทออล และตัวรีดิวซ์ต่าง ๆ และ

สามารถวัดโปรตีนได้ที่ระดับความเข้มข้นของต่ำ ๆ ที่ 0.01 mg/mL และช่วงที่เหมาะสมในการหาปริมาณโปรตีน คือ 0.01-1.0 mg/mL ซึ่งขั้นตอนการเตรียมสารเคมีประกอบด้วย [24]

- (1) เตรียมสารละลายเชิงซ้อนที่ประกอบด้วย 2% (w/v) Na_2CO_3 , 1% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ 2% (w/v) $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ละลายในน้ำกลั่นในอัตราส่วนต่อปริมาตร 100:1:1 ตามลำดับ
- (2) เตรียม 2M NaOH
- (3) 1 M Folin reagent
- (4) สารตัวอย่าง คือ ส่วนใสของสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน
- (5) สารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin 2 mg/mL เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐาน (μL)	0	2.5	5	12.5	25	50	125	250	500
น้ำกลั่น (μL)	500	498	495	488	475	450	375	250	0
ความเข้มข้นโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	10	20	50	100	200	500	1000	2000

ขั้นตอนการทดลอง

- (1) นำสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองจากนั้นใส่ 2M NaOH นำไปวางบนเครื่องให้ความร้อนอุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที ให้เกิดการไฮโดรไลซิส
- (2) ทำให้เย็นลง โดยการวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- (3) ใส่ 0.1 มิลลิลิตร Folin reagent โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30-60 นาที (ไม่ควรเกิน 60 นาที) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน
- (4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm (ถ้ามีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือที่ความยาวคลื่น 500 nm (ถ้ามีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 100-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- (5) นำข้อมูลที่ได้อ่านกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

2.3.4 เตรียมสารละลายโคโคซาน

- (1) ชั่งโคโคซาน 0.0584 กรัม ละลายในกรดอะซิติก 1% (v/v)
- (2) คนสารที่อุณหภูมิห้อง จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อนจะได้สารละลายโคโคซานความเข้มข้น 0.05% (w/v)

2.3.4 สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยยางจากเถาเอ็นอ่อน

- (1) หาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ โดยทำการทดลองโดยใช้ยางที่เก็บได้ 2 ครั้ง
 - ยางที่เก็บครั้งที่ 1 ทำการปรับปริมาณ HAuCl_4 ความเข้มข้น 10^4 ppm, สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน ความเข้มข้น 39 mg/mL, 3%NaOH และ 0.05% โคโคซาน
 - ยางที่เก็บครั้งที่ 2 ทำการปรับปริมาณ สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนความเข้มข้น และ 0.05% โคโคซาน
- (2) ปิดเตาส่วนใสของสารสกัดยางจากต้นเถาเอ็นอ่อน, NaOH โดยปรับปริมาตรที่แตกต่างกันลงไปหลอดทดลอง เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสม กรณีที่ใช้โคโคซานเพิ่มความเสถียรให้ ปิดเตาลงไปด้วย จากนั้นใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร นำไปวางบนเครื่องให้ความร้อนอุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาที
- (3) ปิดเตา HAuCl_4 ลงไป จากนั้นสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- (4) สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสี
- (5) นำไปทดสอบด้วย SEM และ FT-IR

2.3.5 ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH Radical-Scavenging Activity Assay)

- (1) เตรียม 0.1 mM DPPH ที่ละลายในเอทานอล
- (2) จากนั้นนำไปผสมกับสารตัวอย่าง คือ อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้
- (3) ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการทำปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
- (4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระได้ดังสมการ

$$\text{DPPH radical-scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} + A_{\text{background}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ละลายในเอทานอล

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ละลายในเอทานอลผสมกับอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ในอัตราส่วนต่อปริมาตรที่เท่ากัน

$A_{\text{background}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลผสมกับอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ในอัตราส่วนต่อปริมาตรที่เท่ากัน

2.3.6 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT assay)

- (1) ปิเปตเซลล์ปกติจากเนื้อเยื่อไตผิวหนังของหนู L929 และเซลล์มะเร็งช่องปาก KB ที่ทำการเพาะเลี้ยงลงไปใน 96-well culture plate ปริมาณ 200 μL
- (2) นำเซลล์ที่อยู่ใน 96-well culture plate มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- (3) เตรียมสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมและเติมโคโคซาน ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 และ 0.98 μM
- (4) ปิเปตเซลล์ที่อยู่ใน 96-well culture plate ปริมาตร 20 μL จากนั้นปิเปตอนุภาคนาโนทองคำที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 μL ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายใน 96-well culture plate คือ 50, 25, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20 และ 0.10 μM นำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- (5) ปิเปต MTT ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 10 μL ลงใน 96-well culture plate จากนั้นทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง
- (6) จะเกิดผลึกของ formazan ที่ก้นหลุม จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออกจากหลุม และเติม DMSO ปริมาตร 150 μL เพื่อละลายผลึก formazan
- (7) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ได้ดังนี้

$$\% \text{ การอยู่รอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ใส่อนุภาคนาโนทองคำ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ใส่อนุภาคนาโนทองคำ}} \times 100$$

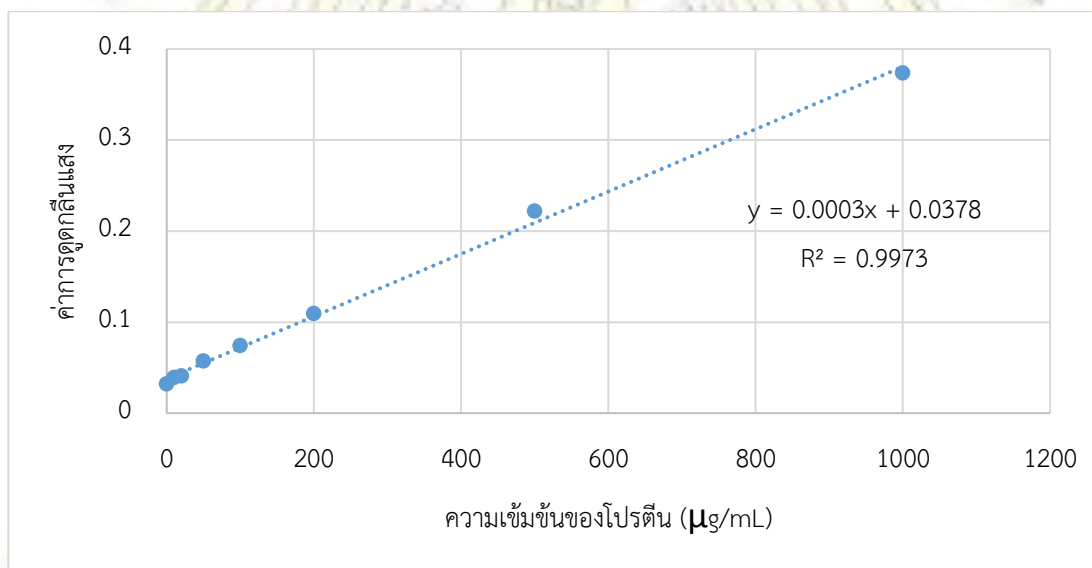
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากต้นเถาเอ็นอ่อนด้วยวิธีลาวรี (Lowry method)

ตารางที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin และสารสกัดจากยางของต้นเถาเอ็นอ่อน (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)

ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 750 nm	ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 750 nm
0	0.032	200	0.109
10	0.039	500	0.221
20	0.040	1000	0.374
50	0.057	2000	0.504
100	0.074	สารสกัดยางที่เจือจาง 10 เท่า	0.128

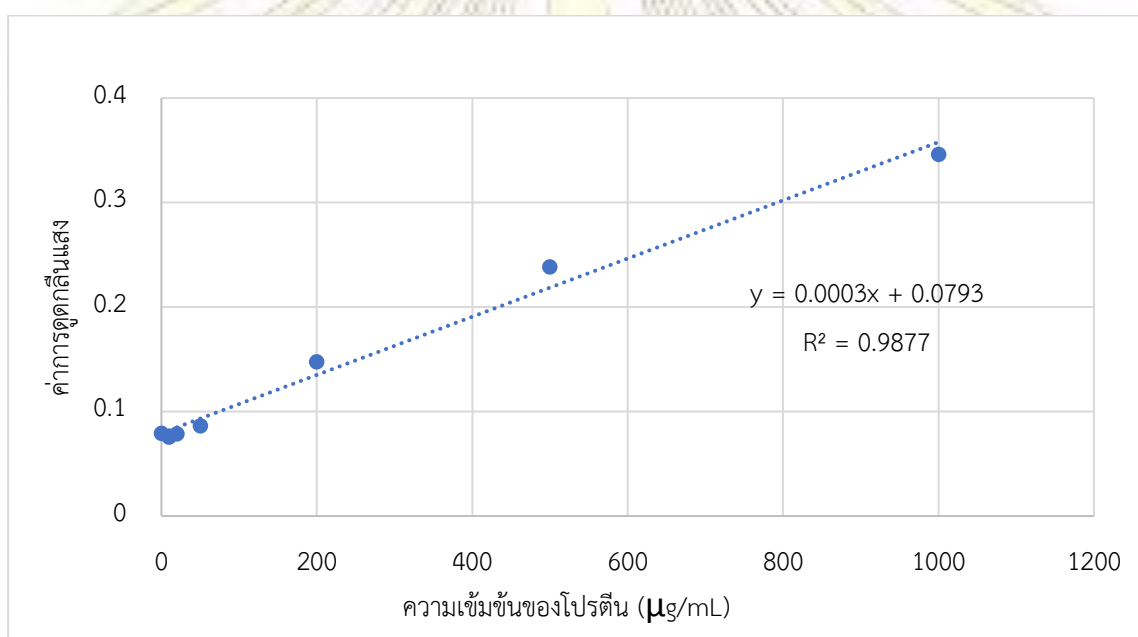


รูปที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin pH 7.0 ที่ 750 nm (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)

พบว่าจากการทดลองหาปริมาณโปรตีนจากยางที่เก็บครั้งที่ 1 จากกราฟมาตรฐาน ได้สมการเป็น $y = 0.0003x + 0.0378$, $R^2 = 0.9973$ ดังรูปที่ 3.1 จะได้ความเข้มข้นโปรตีนคือ 39 mg/mL

ตารางที่ 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin และสารสกัดจากยางของต้นเถาเอ็นอ่อน (ยางที่เก็บครั้งที่ 2)

ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 750 nm	ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 750 nm
0	0.079	200	0.147
10	0.076	500	0.238
20	0.078	1000	0.346
50	0.086	สารสกัดยางที่เจือจาง 20 เท่า	0.212



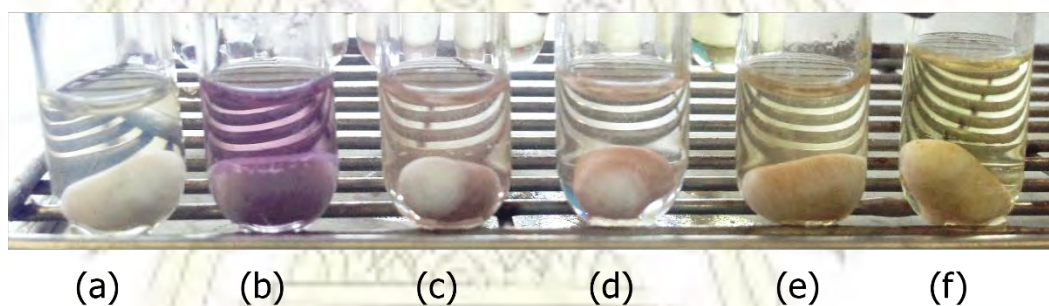
รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin pH 7.0 ที่ 750 nm (ยางที่เก็บครั้งที่ 2)

พบว่าจากการทดลองหาปริมาณโปรตีนจากยางที่เก็บครั้งที่ 2 จากกราฟมาตรฐาน ได้สมการเป็น $y = 0.0003x + 0.03793$, $R^2 = 0.9877$ ดังรูปที่ 3.2 จะได้ความเข้มข้นโปรตีนคือ 29 mg/mL แสดงว่าในสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อนมีโปรตีน สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ที่พบว่าในน้ำยางของเถาเอ็นอ่อนพบ เอ็นไซม์คริปโตเลเพน (Cryptolepain) ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ทริปโตเฟน ไทโรซีน ซีสเทอีน [17]

3.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยใช้สารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน (อย่างที่เก็บครั้งที่ 1)

3.2.1 การปรับปริมาณ HAuCl_4

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการปรับปริมาณ HAuCl_4 ดังรูปที่ 3.3 พบว่าจะเกิดอนุภาคนาโนทองคำเป็นสารละลายสีม่วงดังรูปที่ 3.3(b) ในสภาวะที่ใช้ HAuCl_4 10^4 ppm ปริมาณ 5 μL และสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน 39 mg/mL ปริมาณ 50 μL และเมื่อมีปริมาณ HAuCl_4 มากเกินไป จะเกิดเป็นตะกอน เนื่องจากสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และเพิ่มความเสถียรจากสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน คือเอนไซม์คริปโตเลเพนที่มีน้อยเกินไป ทำให้ไม่มีความสามารถมากพอ จึงเกิดจากการรวมตัวกันเองของไอออนของทอง และเมื่อมีปริมาณ HAuCl_4 น้อยเกินไป ทำให้ไม่สามารถเป็นตัวรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยน Au^{3+} ไปเป็น Au^0 ได้ ดังนั้นจึงทำการหาปริมาณที่เหมาะสมของ HAuCl_4 และสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมที่จะเกิดอนุภาคนาโนทองคำ จะต้องมีส่วนประกอบที่เพียงพอจากเอนไซม์คริปโตเลเพน ที่มีไทโรซีนเป็นสารประกอบฟีนอล รวมถึงทริปโตแฟนและซีสเทอีน สามารถเป็นตัวรีดิวซ์อนุภาคนาโนทองคำ รวมทั้งหมู่ฟังก์ชันอื่น ๆ ในเอนไซม์ เช่น หมู่คาร์บอนิล หมู่อะมิโน หมู่ไทออล สามารถเชื่อมต่อกับอนุภาคนาโนทองคำ และทำให้อนุภาคมีความเสถียรได้



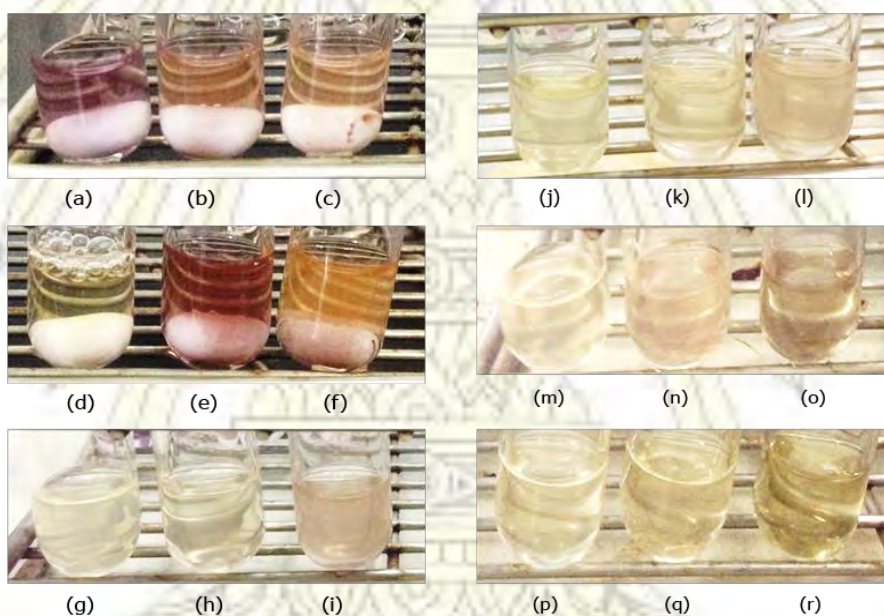
รูปที่ 3.3 อนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากการปรับปริมาณ

HAuCl_4 (μL) เมื่อใช้สารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน 50 μL

(a) 2 (b) 5 (c) 10 (d) 20 (e) 40 (f) 50 μL

3.2.2 การปรับปริมาณ HAuCl_4 และสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน

เมื่อทำการปรับปริมาณ HAuCl_4 และสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 3.4 พบว่าได้อนุภาคนาโนทองคำที่มีสีต่างกัน ดังรูปที่ 3.4(a) ได้เป็นสารละลายใสสีม่วง เกิดจากการใช้ HAuCl_4 5 μL และสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน 100 μL และรูปที่ 3.4(e) ได้เป็นสารละลายสีม่วงแดง เกิดจากการใช้ HAuCl_4 10 μL สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน 200 μL ซึ่งสอดคล้องปรากฏการณ์เซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ทำให้เห็นสีของอนุภาคนาโนทองคำเป็นสีแดง จากกลไกการเกิดอนุภาคนาโนทองคำ คือ ตัวรีดิวซ์จะทำหน้าที่เปลี่ยน Au^{3+} ไปเป็น Au^0 ต่อมาเกิดสภาวะเจริญเติบโต ซึ่งเกิดการรวมกันของอนุภาคโดยที่อนุภาคจะรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้นในขนาดนาโนเมตร และจากนั้นจะมีสารเพิ่มความเสถียรล้อมรอบอนุภาคทำให้ขนาดคงที่ได้ จากการที่เห็นเป็นสีม่วงจึงเกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคนาโนทองคำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพราะมีเอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์และตัวเพิ่มความเสถียรที่ล้อมรอบอนุภาคน้อยเกินไป อนุภาคจึงรวมตัวกัน ดังนั้นปริมาณกรดคลอโรอริกกับสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่เหมาะสม คือ 10 μL และ 200 μL ตามลำดับ



รูปที่ 3.4 อนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากการปรับปริมาณ

HAuCl_4 (μL) : สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน (μL)

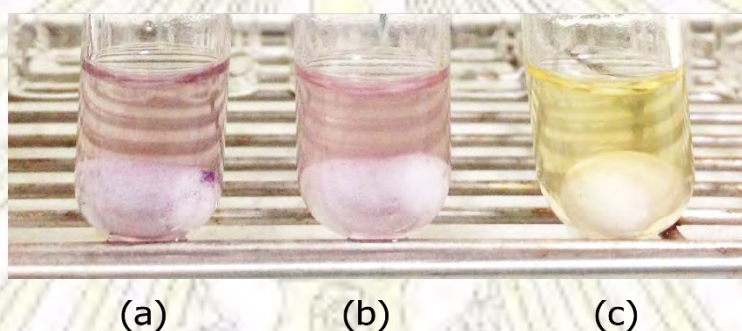
(a) 5:100 (b) 10:100 (c) 20:100 (d) 5:200 (e) 10:200 (f) 20:200

(g) 5:400 (h) 10:400 (i) 20:400 (j) 5:600 (k) 10:600 (l) 20:600

(m) 5:800 (n) 10:800 (o) 20:800 (p) 5:900 (q) 10:900 (r) 20:900

3.2.3 การปรับปริมาณ NaOH

ต่อมานำมาศึกษาผลของ NaOH โดยจากผลการทดลอง ดังรูปที่ 3.5 การปรับปริมาณ 3% NaOH พบว่าเมื่อใช้ 10 μL ที่ pH เท่ากับ 11 และเมื่อใส่ HAuCl_4 ได้สารละลายเป็นสีม่วงแดง ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับอนุภาคนาโนทองคำที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจาก NaOH มีหน้าที่ในการไปรับโปรตอนจากหมู่ไฮดรอกซิลของไทโรซีน ที่พบในสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อนเพื่อเปลี่ยนไปเป็นหมู่คาร์บอเนล ทำให้สามารถเป็นตัวรีดิวซ์เปลี่ยน Au^{3+} ไปเป็น Au^0 ได้ซึ่ง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอ็นไซม์คริปโตเลเพน อยู่ในช่วง 8-10.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60-75°C [17] ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยยาลจากเถาเอ็นอ่อน คือ HAuCl_4 10⁴ ppm ปริมาณ 10 μL สารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน 39 mg/mL ปริมาณ 200 μL และ 3% NaOH 10 μL โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที

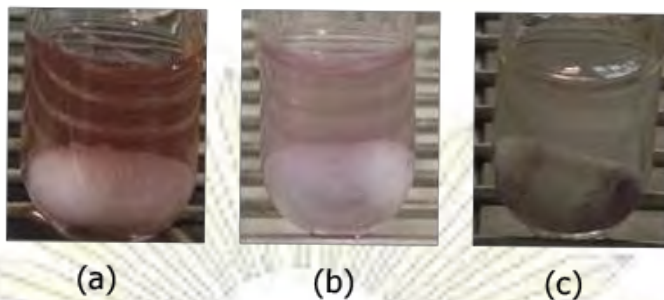


รูปที่ 3.5 อนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากปริมาณ 3% NaOH ที่แตกต่างกัน

(a) 5 μL (b) 10 μL (c) 20 μL

3.2.4 การศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน

จากผลการทดลอง พบว่าประสิทธิภาพในการเป็นตัวรีดิวซ์และตัวเพิ่มความเสถียรของสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อนลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเก็บไว้นานขึ้นดังรูปที่ 3.6 เนื่องจากเอ็นไซม์สามารถเสื่อมสภาพอาจเกิดจากอุณหภูมิที่เก็บไม่ถึง 4 °C จึงมีข้อจำกัดในด้านเวลาในการเก็บรักษา ดังนั้นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ด้วยการใส่สารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน จึงควรมานำมาทดลองให้รวดเร็วที่สุด เพื่อให้เอ็นไซม์ยังคงเป็นตัวรีดิวซ์และเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคได้



รูปที่ 3.6 อนุภาคนาโนทองคำที่ได้จากระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่แตกต่างกัน (1) 10 วัน (2) 13 วัน (3) 1 เดือน 17 วัน

3.2.5 การเพิ่มความเสถียรด้วยไคโตซาน

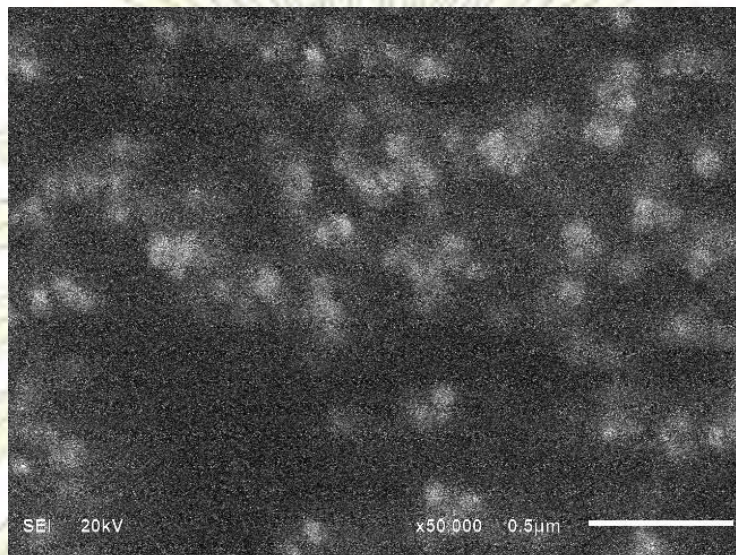
และเพื่อให้อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์มีความเสถียรมากขึ้น ต่อมาจึงนำไคโตซานมาช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคนาโนทองคำ ดังรูปที่ 3.7 จะเห็นว่าเมื่อใช้ไคโตซาน 50 μL และ 100 μL เกิดอนุภาคนาโนทองคำที่มีสีตะกอนที่แตกต่างกัน คือ ตะกอนสีชมพูและม่วง โดยเมื่อใช้ปริมาณไคโตซานมากขึ้น จะทำให้อนุภาคนาโนทองคำขนาดใหญ่มากขึ้น เนื่องจากไคโตซานละลายได้ในสภาวะกรดอ่อน จึงต้องปรับสภาวะให้ได้ pH 11 โดยสารละลาย NaOH และ pH จะลดลง เมื่อเติมกรดคลอโรอริก และไคโตซานมี pka เท่ากับ 6.4 ทำให้ไคโตซานบางส่วนสามารถตกตะกอนได้ จึงมีข้อสันนิษฐานว่ามีไคโตซานตกตะกอนปนอยู่ในสารละลายด้วย ทำให้ไม่สามารถควบคุมขนาดอนุภาคได้



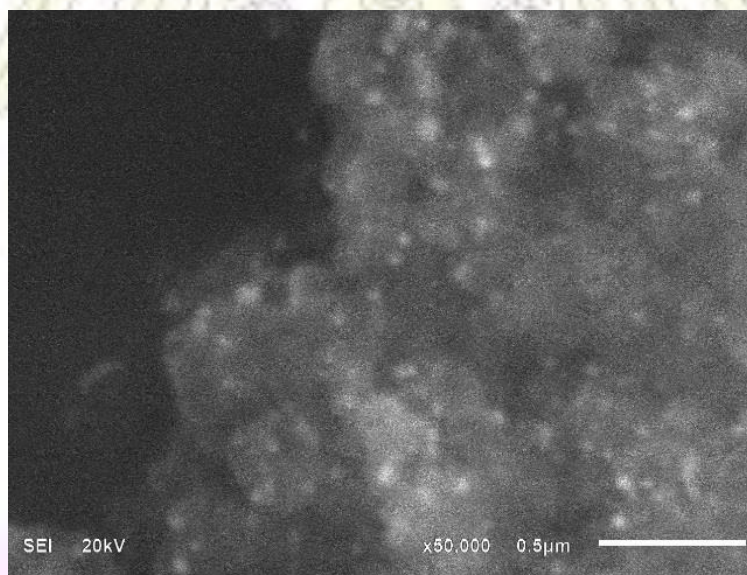
รูปที่ 3.7 อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซานปริมาณแตกต่างกัน

(a) 50 μL (b) 100 μL (c) 200 μL (d) 300 μL (e) 400 μL

จากผล SEM ดังรูปที่ 3.8 พบตะกอนของไคโตซาน โดยอนุภาคนาโนทองคำสามารถเกาะอยู่บนไคโตซาน ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า ไคโตซานสามารถควบคุมขนาดอนุภาคได้ ในสภาวะที่มีความเป็นกรดอ่อน เนื่องจากจะเกิดแรงระหว่างโมเลกุล $R-NH_3^+$ และ CH_2 ของดิวไทลโคซามีนบนโครงสร้างของไคโตซาน ทำให้อนุภาคนาโนทองคำมีความเสถียรได้ [11] ดังนั้นใน pH ที่เหมาะสมในการทดลองนี้ ไคโตซานจึงไม่เหมาะในการควบคุมขนาดอนุภาค



(a)



(b)

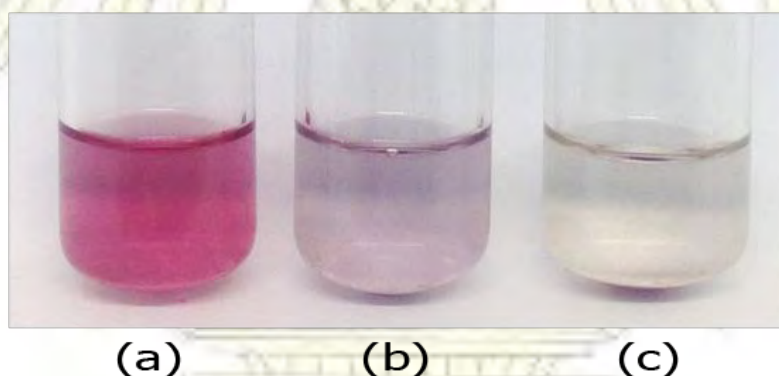
รูปที่ 3.8 SEM ของอนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซานปริมาณที่ต่างกักัน

(a) 50 µL (b) 100 µL

3.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยใช้สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน (ยางที่เก็บครั้งที่ 2)

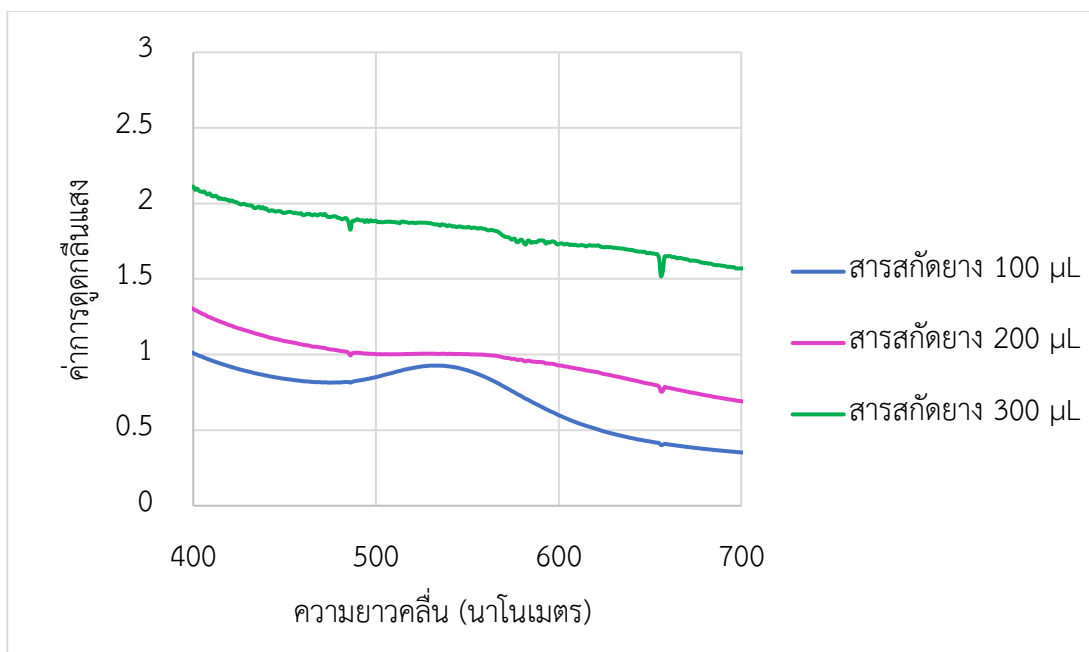
3.3.1 การปรับปริมาณสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่ต่างกัน

จากนั้นเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ จึงนำมาทำการทดลองกับยางที่เก็บได้ในครั้งที่ 2 พบว่าจากรูปที่ 3.9 เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่ต่างกัน พบว่าเมื่อใช้สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน 100 μL เกิดเป็นสารละลายใสสีชมพู และจากนั้นนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV-Vis ดังรูปที่ 3.10 พบพีกของเซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 531 nm ส่วนเมื่อใช้สกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน 200 μL และ 300 μL ไม่พบพีกเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนทองคำ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยยางจากเถาเอ็นอ่อน คือ HAuCl_4 10^4 ppm ปริมาณ 10 μL สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน 28.8 mg/mL ปริมาณ 100 μL และ 3% NaOH 10 μL โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที ซึ่งจะเห็นว่าสภาวะที่ใช้ในการทดลองใกล้เคียงกับการใช้ยางจากการเก็บครั้งที่ 1 แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน เนื่องจากไม่สามารถที่จะเก็บยางแต่ละครั้งให้มีปริมาณโปรตีนที่เท่ากันได้ และเกิดความคลาดเคลื่อนในการหาปริมาณโปรตีนด้วย Lowry method ทำให้เมื่อได้ยางมาทำการทดลองในแต่ละครั้งจึงต้องทำการหาปริมาณโปรตีนก่อน จากนั้นนำมาปรับปริมาณสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนให้เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ



รูปที่ 3.9 อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนปริมาณที่ต่างกัน

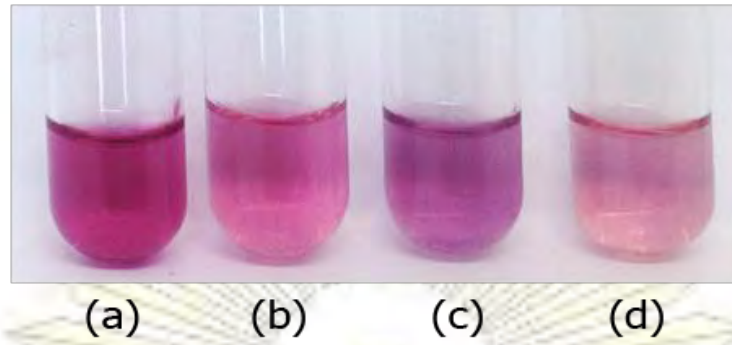
(a) 100 μL (b) 200 μL (c) 300 μL



รูปที่ 3.10 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน ปริมาณที่แตกต่างกัน

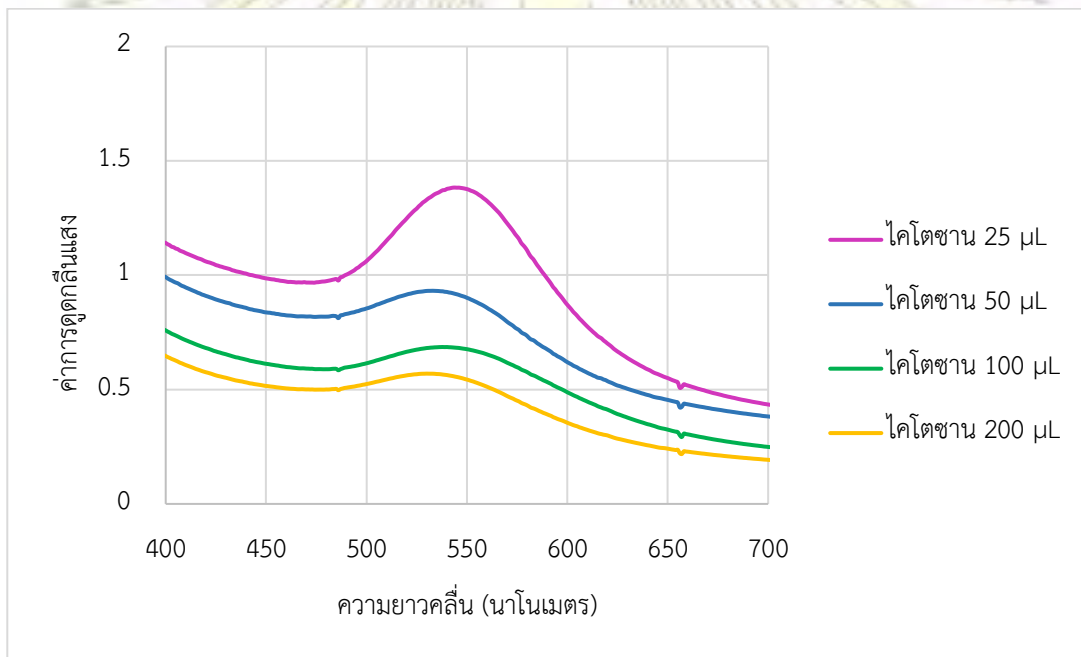
3.3.2 การปรับปริมาณโคโตซานที่แตกต่างกัน

จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อนมาเพิ่มความเสถียรด้วยการใช้โคโตซาน พบว่า สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำได้ ดังรูปที่ 3.11 ซึ่งได้สีที่แตกต่างกันไป เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV-Vis ดังรูปที่ 3.12 พบพีคของเซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 544 nm 533 nm 538 nm 530 nm เมื่อใช้ปริมาณโคโตซานมากขึ้นตามลำดับ และจะสังเกตเห็นว่า intensity ลดน้อยลง เนื่องจากโคโตซานสามารถนำมาใช้เป็นตัวรีดิวซ์ได้ แต่มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ไม่ดีและโครงสร้างสามารถสลายตัวเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากเมื่อเติมโคโตซานมากขึ้น ทำให้มีการเติม NaOH เพื่อปรับให้เป็น pH 11 โคโตซานบางส่วนตกตะกอน จึงมีความสามารถในการรีดิวซ์และเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคได้น้อยลง intensity จึงลดลง ดังนั้นปริมาณโคโตซานที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำด้วยยางจากเถาเอ็นอ่อน คือ 25 µL



รูปที่ 3.11 อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ที่เสถียรด้วยโคโตซานปริมาณที่ต่างกัน

(a) 25 μL (b) 50 μL (c) 100 μL (d) 200 μL

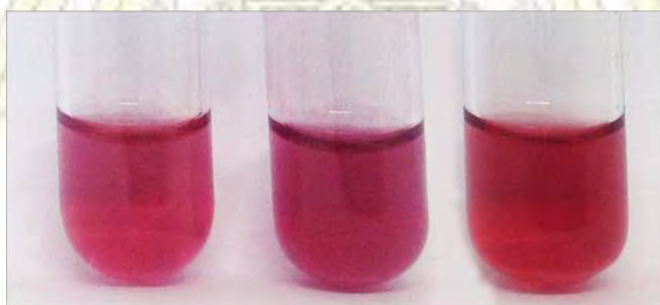


รูปที่ 3.12 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยโคโตซานปริมาณที่ต่างกัน

3.3.3 เปรียบเทียบอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมและเติมไคโตซานและเติมพุลลูแลน

จากนั้นจึงนำสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน พบว่าพิกเอกลักษณะของอนุภาคนาโนทองคำที่ใกล้เคียงกันดังรูปที่ 3.14 โดยอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมไคโตซาน พบพิกของเซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ (SPR) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 527 nm และเมื่อเติมไคโตซาน SPR ดูดกลืนแสงที่ 539 nm ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 และ 60 nm ตามลำดับ เนื่องจากพิกของ SPR จะขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค โดยดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นมากขึ้น เมื่อมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่จะมีช่องว่างระหว่างพลังงานที่แคบลง ทำให้ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นมากขึ้น

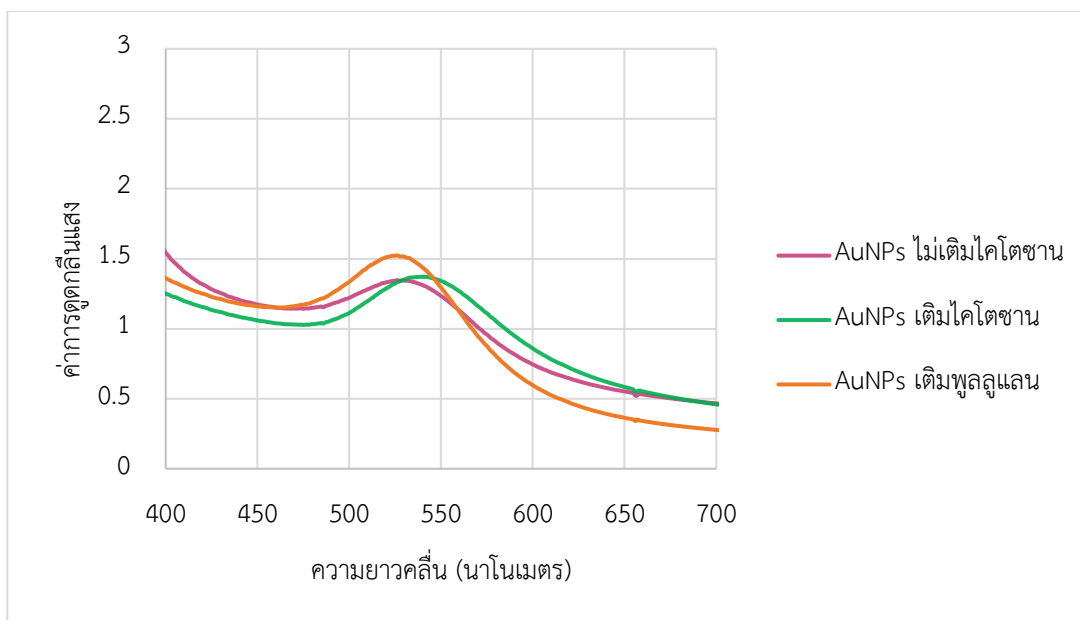
จะเห็นว่าสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และเพิ่มความเสถียรให้อนุภาคนาโนทองคำได้ดีกว่าการเติมไคโตซานลงไป เนื่องจากทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับพุลลูแลนซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถเพิ่มความเสถียรได้เช่นกัน พบพิกของเซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 529 nm มีขนาด 40 nm ซึ่งใกล้เคียงกับการไม่เติมไคโตซาน พุลลูแลนจึงสามารถควบคุมขนาดอนุภาคได้ดีกว่าไคโตซาน เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ และที่ pH 7 เป็น pH เหมาะสมในการทดลอง ไคโตซานไม่สามารถควบคุมขนาดอนุภาคในสภาวะที่เป็นกลาง เนื่องจากแรงระหว่างโมเลกุล $R-NH_3^+$ และ CH_2 ของดิวทิลโคซามีนบนโครงสร้างของไคโตซาน ในสภาวะกรดอ่อน ทำให้อนุภาคนาโนทองคำมีความเสถียรได้ [11] ดังนั้นใน pH ที่เหมาะสมในการทดลองนี้ ไคโตซานจึงไม่สามารถทำให้อนุภาคเสถียรได้



(a) (b) (c)

รูปที่ 3.13 อนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้

(a) ไม่เติมไคโตซาน (b) เติมไคโตซาน (c) เติมพุลลูแลน



รูปที่ 3.14 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมและเติมไคโตซาน และเติมพอลิเอทิลีนไกลคอล

3.3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค FT-IR

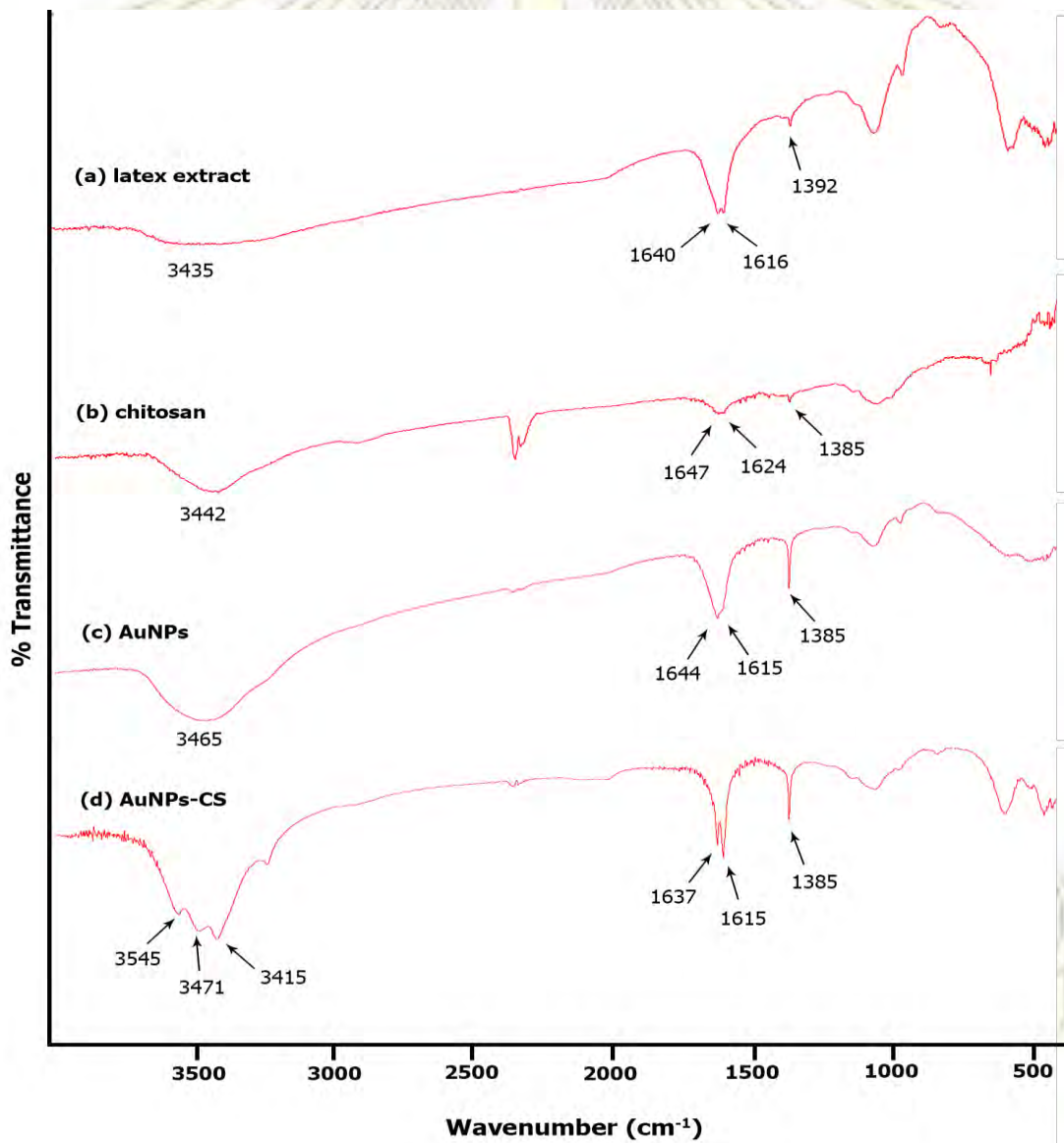
พิจารณา IR สเปกตรัมดังรูปที่ 3.15(a) ของสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน พบว่ามีการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่น $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคของ O-H และ N-H stretching ซ้อนทับกันอยู่ พีคที่ 1640 cm^{-1} และ 1616 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ C=O stretching และ N-H bending ของหมู่เอไมด์ตามลำดับ พีคที่ 1392 cm^{-1} เป็นพีคของ C-O stretching พีคทั้งหมดแสดงถึงโครงสร้างของกรดอะมิโนและสารประกอบฟีนอลที่อยู่ในสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน โดยทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ไอออนของโลหะ ให้กลายเป็นอนุภาคระดับนาโนเมตรได้

พิจารณา IR สเปกตรัมดังรูปที่ 3.15(b) ของไคโตซาน พบว่ามีการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่น $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคของ O-H และ N-H stretching ซ้อนทับกันอยู่ พีคที่ 1647 cm^{-1} และ 1624 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ C=O stretching และ N-H bending ของหมู่เอไมด์ตามลำดับ พีคที่ 1392 cm^{-1} เป็นพีคของ C-O stretching

พิจารณา IR สเปกตรัมดังรูปที่ 3.15(c) ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน พบว่ามีการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นคล้ายสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน และเกิดพีคที่ชัดเจนมากขึ้น คือ พีคที่ 1644 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ C=O stretching และพีคที่ 1385 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ C-O stretching พีคที่เกิดขึ้นเป็นการยืนยันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจาก

จากเถาเอ็นอ่อน โดยสารประกอบฟีนอลสามารถเปลี่ยนไปเป็นหมู่คาร์บอนิล (C=O) เพื่อเป็นตัวรีดิวซ์ ให้เกิดอนุภาคนาโนทองคำและสามารถเชื่อมต่อกับอนุภาคนาโนทองคำ จึงมีบทบาทในการเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาคอีกด้วย

พิจารณา IR สเปกตรัมดังรูปที่ 3.15(d) ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อนโดยการเติมโคโตซาน พบว่ามีการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่น 3545 cm^{-1} 3471 cm^{-1} และ 3415 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ O-H และ 1° N-H stretching ตามลำดับและพบพีคที่ 1637 cm^{-1} และ 1615 cm^{-1} เป็นพีคของ C=O stretching และ N-H bending ของหมู่เอไมด์ตามลำดับ และพีคที่ 1385 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ C-O stretching เป็นพีคที่ชัดเจนมากขึ้นเช่นเดียวกับอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน

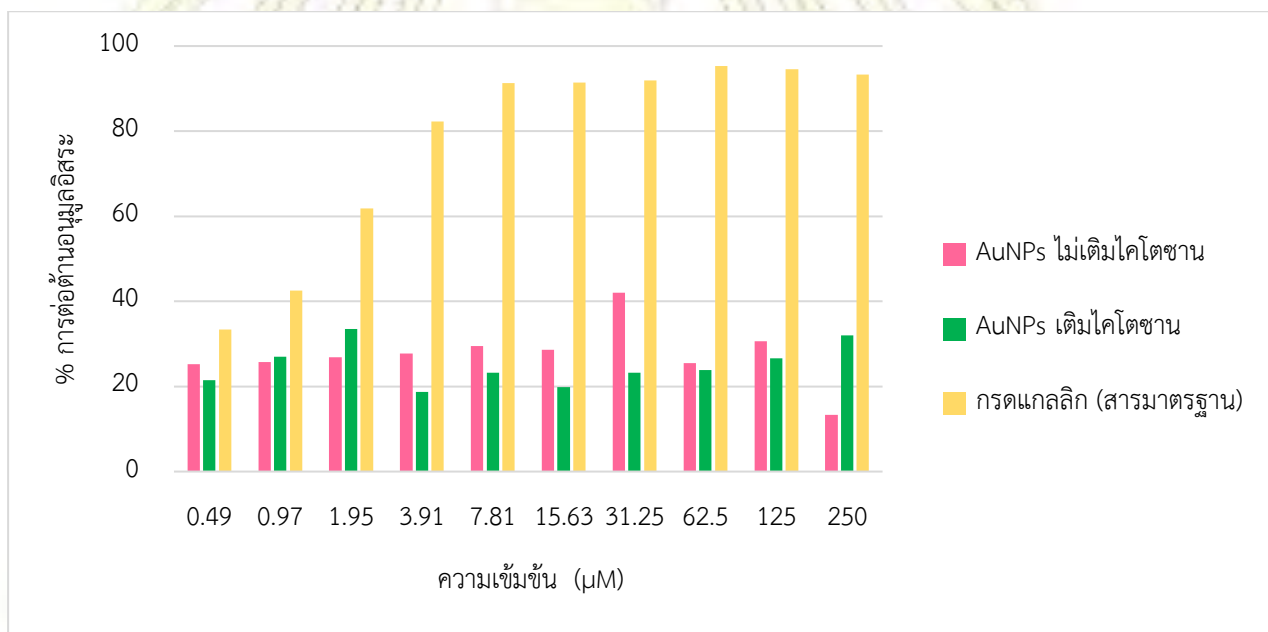


รูปที่ 3.15 FT-IR spectra ของ (a) latex extract (b) chitosan (c) AuNPs (d) AuNPs-CS

3.4 ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH Radical Scavenging Activity)

DPPH Radical Scavenging Activity เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารประกอบต่าง ๆ วิธีนี้อาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปของ DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระ DPPH มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 nm เห็นเป็นสีม่วง จากนั้นเมื่อ DPPH รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองคำจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองได้

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่าอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากยางจากเถาเอ็นอ่อน ที่ไม่เติมและเติมโคโคซานมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระดังรูปที่ 3.16 พบว่าอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมโคโคซาน มีเปอร์เซ็นต์ต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 31.25 μM เท่ากับ 42.09% และอนุภาคนาโนทองคำที่เติมโคโคซานสูงสุดที่ความเข้มข้น 1.95 μM เท่ากับ 33.56% ซึ่งจะเห็นว่าอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมโคโคซานมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าเมื่อเติมโคโคซาน เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าจะมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง จึงมีโอกาสที่สารชีวโมเลกุล เช่น สารประกอบฟีนอลที่เกาะอยู่ที่ผิว AuNPs ไปรีดิวซ์ DPPH ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า และพบว่าเมื่อใช้อนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะเกิดสีแดงจากอนุภาคนาโนทองคำไปרבกววนสีของ DPPH ที่เป็นสีม่วง ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนไปได้



รูปที่ 3.16 ประสิทธิภาพในการทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากยางจากเถาเอ็นอ่อน ที่ไม่เติมและเติมโคโคซาน

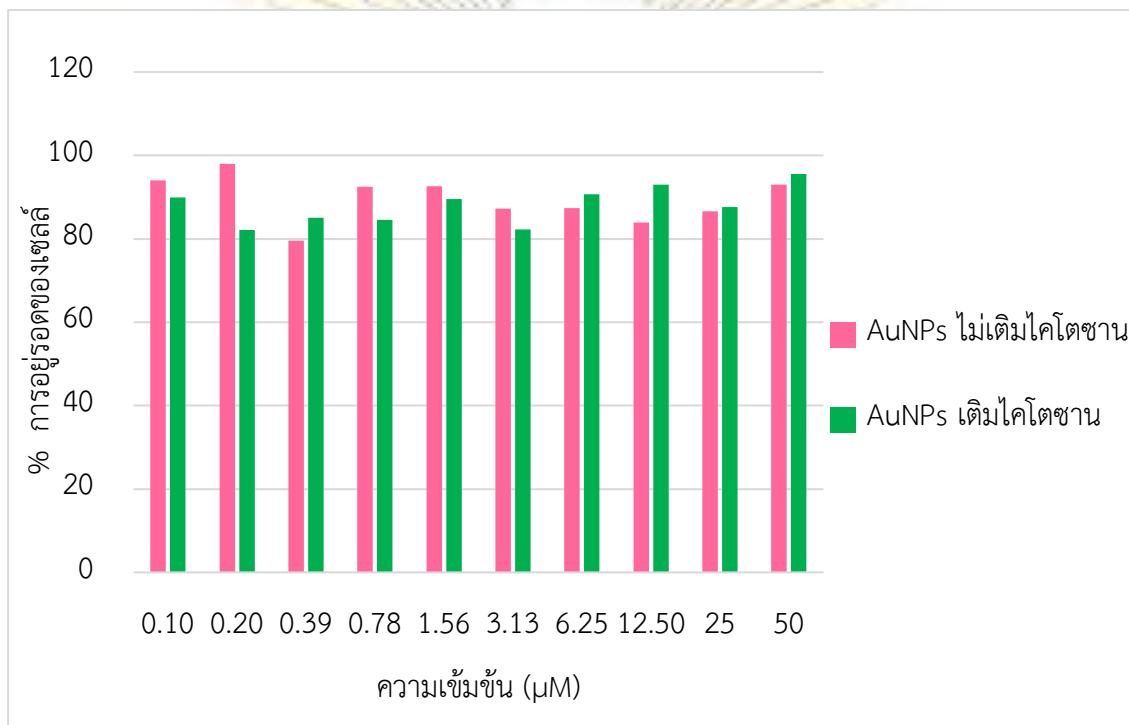
3.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT assay)

จากผลการทดสอบกับเซลล์ปกติของเนื้อเยื่อไตผิวหนังของหนู L929 ดังรูปที่ 3.17 พบว่าอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สูง ซึ่งกราฟในช่วงแรกที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ลดลง เนื่องจากปริมาณอนุภาคนาโนทองคำที่มากขึ้น ที่ยังคงเป็นพิษต่อเซลล์เล็กน้อย และสูงขึ้นอีกครั้งเมื่อมีไคโตซานหรือเอ็นไอเอ็มจากยางเถาเอ็นอ่อนบนพื้นผิวของอนุภาคมากขึ้น โดยอนุภาคนาโนทองคำที่เติมไคโตซานมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่สูงกว่าการไม่เติมไคโตซาน เนื่องจากไคโตซานซึ่งเป็นโพลิเมอร์ในธรรมชาติ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ล้อมรอบอนุภาคนาโนทองคำอยู่ ดังนั้นจึงทำให้อนุภาคมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงขึ้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงถึง 112.89 ที่ความเข้มข้น 25 μM



รูปที่ 3.17 ผลความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากยางเถาเอ็นอ่อน ที่ไม่เติมและเติมไคโตซาน ต่อเซลล์ปกติของเนื้อเยื่อไตผิวหนังของหนู L929 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (μM) ของอนุภาคนาโนทองคำ

จากผลการทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก KB ดังรูปที่ 3.18 พบว่าอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มากกว่า 80 % โดยพบว่าอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมและเติมไคโตซานมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีความแข็งแรง สามารถทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี ดังนั้นอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก



รูปที่ 3.18 ผลความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากยางจากเถาเอ็นอ่อน ที่ไม่เติมและเติมไคโตซาน ต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก KB ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (μM) ของอนุภาคนาโนทองคำ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ต้องการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำที่เสถียรด้วยไคโตซาน โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน และจากนั้นนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ โดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน ด้วยวิธีทางชีวภาพได้ คือ HAuCl_4 10^4 ppm ปริมาณ 10 μL สารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อน 28.8 mg/mL ปริมาณ 100 μL และ 3% NaOH 10 μL โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที และเมื่อเติมไคโตซานเพื่อเพิ่มความเสถียร ปริมาณไคโตซานที่เหมาะสม คือ 25 μL โดยอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมไคโตซานมีพีคของ surface plasmon resonance ดูดกลืนแสงที่ 527 nm และเมื่อเติมไคโตซานดูดกลืนแสงที่ 539 nm nm ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 และ 60 nm ตามลำดับ โดยสารชีวโมเลกุลในสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และเพิ่มความเสถียรให้อนุภาคนาโนทองคำ เอ็นไซม์คริปโตเลปैन (Cryptolepain) รวมถึงสารประกอบฟีนอลเป็นตัวรีดิวซ์และเพิ่มความเสถียรให้อนุภาคนาโนทองคำได้ ซึ่งการเติมไคโตซานทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจาก pH 7 เป็น pH ที่เหมาะสมในการทดลอง ทำให้ไคโตซานไม่สามารถควบคุมขนาดอนุภาคในสภาวะที่เป็นกลาง เนื่องจากแรงระหว่างโมเลกุล R-NH_3^+ และ CH_2 ของดิวไทลโคซามีนบนโครงสร้างของไคโตซาน ในสภาวะกรดอ่อน ทำให้อนุภาคนาโนทองคำมีความเสถียรได้ [11] ดังนั้นใน pH ที่เหมาะสมในการทดลองนี้ ไคโตซานจึงไม่สามารถทำให้อนุภาคเสถียรได้

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์จากยางจากเถาเอ็นอ่อน อนุภาคนาโนทองคำที่ไม่เติมไคโตซานมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าเมื่อเติมไคโตซาน เนื่องจากขนาดที่เล็กกว่าจึงมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง สารต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอลจึงสามารถล้อมรอบผิวได้ดีกว่า โดยมีเปอร์เซ็นต์ต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองคำ 31.25 μM เท่ากับ 42.09% ส่วนอนุภาคนาโนทองคำที่เติมไคโตซานสูงสุดที่ความเข้มข้น 1.95% เท่ากับ 33.56%

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของเนื้อเยื่อไตฉิวหนังของหนู (L929) พบว่าอนุภาคนาโนทองคำที่เติมไคโตซานมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าการไม่เติมไคโตซาน โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงถึง 112.89% ที่ความเข้มข้น 25 μM เนื่องจากไคโตซานเป็นโพลีเมอร์ในธรรมชาติ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ล้อมรอบอนุภาคนาโนทองคำอยู่ จึงทำให้อนุภาคมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงขึ้น และอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB)

เอกสารอ้างอิง

1. Satoshi, H.; Nick, S. Introduction to Nanoparticles. *Microwaves Nanopart. Synth.* **2013**, 1-21.
2. Njoki, P. N.; Lim, I.-I. S.; Mott, D.; Park, H.-Y.; Khan, B.; Mishra, S.; Sujakumar, R.; Luo, J.; Zhong, C.-J. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* **2007**, *111*, 14664–14669.
3. Ahmed, S.; A.; Ikram, S.; S., S. Y. Biosynthesis of Gold Nanoparticles: A Green Approach. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2016**, *161*, 141–153.
4. Nguyen, D. T.; Kim, D.-J.; Kim, K.-S. Controlled Synthesis and Biomolecular Probe Application of Gold Nanoparticles. *Micron.* **2011**, *42*, 207–227.
5. Nano Technology <http://nanotechnologyjd.weebly.com/manufacturing-processed.html> (accessed Feb 6, 2017).
6. Loyprasert, S.; Hedström, M.; Thavarungkul, P.; Kanatharana, P.; Mattiasson, B. Sub-attomolar Detection of Cholera Toxin using a Label-free Capacitive Immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1977–1983.
7. Dhillon, G. S.; Brar, S. K.; Kaur, S.; Verma, M. Green Approach for Nanoparticle Biosynthesis by Fungi: Current Trends and Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, *32*, 49–73.
8. Gold Nanoparticles: Properties and Applications <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html> (accessed Feb 6, 2017).
9. Wang, Z.; Ma, L. Gold Nanoparticle Probes. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1607–1618.
10. Prado-Gotor, R.; López-Pérez, G.; Martín, M.; Cabrera-Escribano, F.; Franconetti, A. Use of Gold Nanoparticles as Crosslink Agent to Form Chitosan Nanocapsules: Study of the Direct Interaction in Aqueous Solutions. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *135*, 77–85.
11. Silva, A. T. B.; Coelho, A. G.; Lopes, L. C. D. S.; Martins, M. V. A.; Crespilho, F. N.; Merkoçi, A.; Silva, W. C. D. Nano-assembled Supramolecular Films from Chitosan-stabilized Gold Nanoparticles and Cobalt(II) Phthalocyanine. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *8*, 1237-1245.

12. Vo, K. D. N.; Guillon, E.; Dupont, L.; Kowandy, C.; Coqueret, X. Influence of Au(III) Interactions with Chitosan on Gold Nanoparticle Formation. *J. Phys. Chem. C*. **2014**, *118*, 4465–4474.
13. *Cryptolepis buchananii* Roem. & Schult. <https://medthai.com> (accessed Feb 13, 2017).
14. Laupattarakasem, P.; Wangsrimongkol, T.; Surarit, R.; Hahnvajanawong, C. In Vitro and in Vivo Anti-inflammatory Potential of *Cryptolepis buchanani*. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 349–354.
15. Vinayaka, K.; Prashith, K. T.; Mallikarjun, N.; Sateesh, V. Anti-dermatophyte Activity of *Cryptolepisbuchanani* Roem. and Schult. *Pharmacogn. J.* **2010**, *2*, 170–172.
16. Pande, M.; Dubey, V. K.; Jagannadham, M. V. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Cryptolepain, A Novel Glycosylated Serine Protease from *Cryptolepis buchanani*. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63*, 74–77.
17. Pande, M.; Dubey, V. K.; Yadav, S. C.; Jagannadham, M. V. A Novel Serine Protease Cryptolepain from *Cryptolepis buchanani*: Purification and Biochemical Characterization. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 10141–10150.
18. Teixeira, J. C. A.; Gaspar, A.; Garrido, E. M.; Garrido, J.; Borges, F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–11.
19. Ebada, S. S.; Edrada, R. A.; Lin, W.; Proksch, P. Methods for Isolation, Purification and Structural Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Marine Invertebrates. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1820–1831.
20. Makarov, V. V.; Love, A. J.; Sinitsyna, O. V.; Makarova, S. S.; Yaminsky, I. V.; Taliansky, M. E.; Kalinina, N. O. Green Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles using Plants. *Acta naturae.* **2014**, *6*, 35-44.
21. Shabestarian, H.; Homayouni-Tabrizi, M.; Soltani, M.; Namvar, F.; Azizi, S.; Mohama, R.; Shabestarian, H. Green synthesis of Gold Nanoparticles using Sumac Aqueous Extract and Their Antioxidant Activity. *J. Mater. Res.* **2017**, *20*, 264-270.
22. Das, R. K.; Sharma, P.; Nahar, P.; Bora, U. Synthesis of Gold Nanoparticles using Aqueous Extract of *Calotropis procera* Latex. *Mater. Lett.* **2011**, *65*, 610–613.
23. Sapan, C. V.; Lunblad, R. L.; Price, N. C. Colorimetric Protein Assay Techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 99-108.
24. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Follin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.



ภาคผนวก

ตารางที่ 1 การปรับปริมาณ HAuCl_4 ที่แตกต่างกัน ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)

หลอดที่	Au^{3+} (ppm)	Au^{3+} 10^4 ppm (μL)	ยาง (μL)	3% NaOH (μL)	pH ก่อน/ หลังใส่ Au^{3+}	น้ำ (μL)	ปริมาตรรวม (μL)	ผลการทดลอง
1	20	2	50	10	11/6	938	1000	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน
2	50	5	50	10	11/3	935	1000	สารละลายใส สีม่วง ตะกอนม่วง
3	100	10	50	10	11/2	930	1000	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน ตะกอนส้ม
4	200	20	50	10	11/2	920	1000	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน ตะกอนส้ม
5	400	40	50	10	11/1	900	1000	สารละลายใส สีเหลือง ตะกอนส้ม
6	500	50	50	10	11/1	890	1000	สารละลายใส สีเหลือง ตะกอนส้ม

ตารางที่ 2 การปรับปริมาณ HAuCl_4 และสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่แตกต่างกัน ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)

หลอดที่	Au^{3+} (ppm)	Au^{3+} 10^4 ppm (μL)	ยาง (μL)	3% NaOH (μL)	pH ก่อน/ หลังใส่ Au^{3+}	น้ำ (μL)	ปริมาตร รวม (μL)	ผลการทดลอง
1	50	5	100	10	10/3	885	1000	สารละลายใส สีม่วง
2	100	10	100	10	10/2	880	1000	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน ตะกอนดำ
3	200	20	100	10	10/2	870	1000	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน ตะกอนม่วง
4	50	5	200	10	10/3	785	1000	สารละลายใส สีเหลือง
5	100	10	200	10	10/2	780	1000	สารละลายใส สีม่วงแดง
6	200	20	200	10	10/2	770	1000	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน ตะกอนดำ
7	50	5	400	10	10/3	585	1000	สารละลายขุ่น สีเหลืองอ่อน
8	100	10	400	10	10/2	580	1000	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน ตะกอนม่วง
9	200	20	400	10	10/2	570	1000	สารละลายขุ่น สีเหลืองอ่อน ตะกอนม่วง
10	50	5	600	10	10/3	385	1000	สารละลายใส สีเหลือง

ตารางที่ 2 (ต่อ) การปรับปริมาณ HAuCl_4 และสารสกัดยางจากเถาเอ็นอ่อนที่แตกต่างกัน ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)

หลอดที่	Au^{3+} (ppm)	Au^{3+} 10^4 ppm (μL)	ยาง (μL)	3% NaOH (μL)	pH ก่อน/ หลังใส่ Au^{3+}	น้ำ (μL)	ปริมาตร รวม (μL)	ผลการทดลอง
11	100	10	600	10	10/2	380	1000	สารละลายใส สีเหลือง ตะกอนม่วง
12	200	20	600	10	10/2	370	1000	สารละลายใส สีเหลือง ตะกอนม่วง
13	50	5	800	10	10/3	185	1000	สารละลายใส สีเหลือง
14	100	10	800	10	10/2	180	1000	สารละลายใส สีเหลือง ตะกอนม่วง
15	200	20	800	10	10/2	170	1000	สารละลายใส สีเหลือง ตะกอนม่วง
16	50	5	900	10	10/3	85	1000	สารละลายใส สีเหลือง
17	100	10	900	10	10/2	80	1000	สารละลายใส สีเหลือง
18	200	20	900	10	10/2	70	1000	สารละลายใส สีเหลือง

ตารางที่ 3 ปริมาณ NaOH ที่แตกต่างกัน ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)

หลอดที่	3% NaOH (μL)	pH ก่อน/ หลังใส่ Au^{3+}	Au^{3+} (ppm)	Au^{3+} 10^4 ppm (μL)	ยาง (μL)	น้ำ (μL)	ปริมาตรรวม (μL)	ผลการทดลอง
1	5	10/3	100	10	200	785	1000	สารละลายขุ่น สีม่วงอ่อน ตะกอนม่วง
2	10	11/4	100	10	200	780	1000	สารละลายขุ่น สีม่วงแดงอ่อน
3	20	12/8	100	10	200	770	1000	สารละลายขุ่น สีเหลือง

ตารางที่ 4 การศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อน ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)

หลอดที่	เวลาเก็บ รักษาสารสกัด ยาง	Au^{3+} 10^4 ppm (μL)	ยาง (μL)	3% NaOH (μL)	pH ก่อน/ หลังใส่ Au^{3+}	น้ำ (μL)	ปริมาตรรวม (μL)	ผลการทดลอง
5	10 วัน	10	200	10	10/2	780	1000	สารละลายใส สีม่วงแดง
2	13 วัน	10	200	10	11/4	780	1000	สารละลายขุ่น สีม่วงแดงอ่อน
3	1 เดือน 17 วัน	10	200	10	10/5	780	1000	สารละลายขุ่น สีเหลืองอ่อน ตะกอนม่วง

ตารางที่ 5 ปริมาณไคโตซานที่แตกต่างกัน ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที (ยางที่เก็บครั้งที่ 1)

หลอดที่	0.05% Chitosan (μL)	3% NaOH (μL)	pH ก่อน/ หลังใส่ Au^{3+}	Au^{3+} 10^4 ppm (μL)	ยาง (μL)	น้ำ (μL)	ปริมาตรรวม (μL)	ผลการทดลอง
1	50	20	10/5	10	200	720	1000	สารละลายขุ่น สีม่วงแดง ตะกอนม่วงแดง
2	100	30	10/5	10	200	660	1000	สารละลายขุ่น สีม่วง ตะกอนม่วง
3	200	50	10/5	10	200	540	1000	สารละลายขุ่น สีเหลืองอ่อน
4	300	70	12/6	10	200	420	1000	สารละลายขุ่น สีเหลืองอ่อน
5	400	120	12/6	10	200	270	1000	สารละลายขุ่น สีเหลืองอ่อน

ตารางที่ 6 การปรับปริมาณสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อนที่แตกต่างกัน ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที (ยางที่เก็บครั้งที่ 2)

หลอดที่	ยาง (μL)	Au^{3+} (ppm)	Au^{3+} 10^4 ppm (μL)	3% NaOH (μL)	pH ก่อน/ หลังใส่ Au^{3+}	น้ำ (μL)	ปริมาตรรวม (μL)	ผลการทดลอง
1	100	100	10	10	12/7	880	1000	สารละลายใส สีชมพู
2	200	100	10	10	11/7	780	1000	สารละลายขุ่น สีม่วงอ่อน
3	300	100	10	10	10/7	680	1000	สารละลายขุ่น ไม่มีสี

ตารางที่ 7 การปรับปริมาณไคโตซานที่แตกต่างกัน ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยใช้ยางจากเถาเอ็นอ่อน ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 60 นาที (ยางที่เก็บครั้งที่ 2)

หลอดที่	0.05% Chitosan (μL)	3% NaOH (μL)	pH ก่อน/ หลังใส่ Au^{3+}	Au^{3+} 10^4 ppm (μL)	ยาง (μL)	น้ำ (μL)	ปริมาตรรวม (μL)	ผลการทดลอง
1	25	10	10/6	10	100	855	1000	สารละลายใส สีชมพูเข้ม
2	50	20	12/7	10	100	820	1000	สารละลายใส สีชมพูอ่อน
3	100	30	12/7	10	100	760	1000	สารละลายใส สีม่วงอ่อน
4	200	50	12/8	10	100	640	1000	สารละลายใส สีชมพูอ่อน

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวภาวิดา ปิยะชาติ เกิดเมื่อวันที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ที่อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนหาดใหญ่วิทยาลัย จังหวัดสงขลา เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 37/4 ถนนหอยมุกต์ ซอยละม้ายสงเคราะห์ 1 อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา รหัสไปรษณีย์ 90110 อีเมล pawida_piyachat@outlook.com

