

ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาคออกซิไดซ์คาร์บอนระดับนาโน  
Study Interaction between Lipid Bilayer Membrane and  
Oxidized Carbon Nanoparticles (OCN)



โดย

นางสาวกมลลักษณ์ สารสันติกุล

นางสาวฐิติพร แสนสุริย์รังสิกุล

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

เรื่อง ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาคออกซิไดส์คาร์บอนระดับนาโน  
โดย นางสาวมณฑลลักษณ์ สารสันติกุล และนางสาวฐิติพร แสนสุรีย์รังสีกุล  
ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภสร วณิชเวชารุ่งเรือง)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จูอนุวัฒน์กุล)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

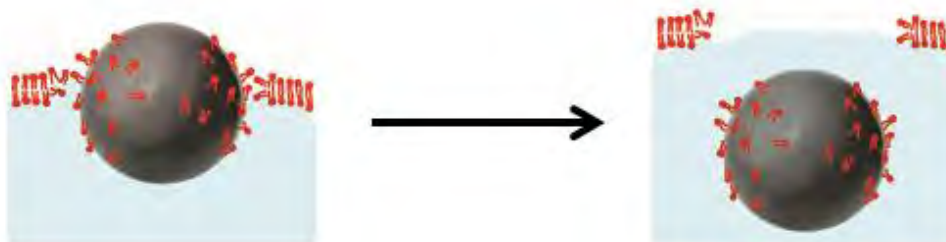
.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)  
หัวหน้าภาควิชาเคมี  
วันที่ 22 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2558

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้

ชื่อโครงการ	ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาคออกซิไดส์คาร์บอนระดับนาโน		
ชื่อนิสิตในโครงการ	1. นางสาวกมลลักษณ์ สารสันติกุล	เลขประจำตัว	5433053523
	2. นางสาวฐิติพร แสนสุรีย์รังสิกุล	เลขประจำตัว	5433081023
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วนิชเวหารุ่งเรือง		
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปีการศึกษา 2557		

### บทคัดย่อ

อนุภาคนำส่งยาและสารออกฤทธิ์ต่างๆได้รับความสนใจและถูกนำมาใช้ทั้งในการรักษาโรค การทดลองทางวิทยาศาสตร์ รวมไปถึงการใช้งานในอาหารและเครื่องดื่ม ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสังเคราะห์อนุภาคออกซิไดส์คาร์บอนระดับนาโน (Oxidized Carbon Nanoparticle : OCN) ซึ่งเป็นอนุภาคที่สามารถนำส่งสารในกลุ่มมโหฬารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ได้ ในงานนี้ทำการศึกษากลไกการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนี้ อนุภาค OCN เตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างรุนแรงของแกรไฟต์ภายใต้คลื่นเสียงอัลตราโซนิกแล้วแยกอนุภาคด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง อนุภาค OCN ที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดประมาณ  $37.7 \pm 4.6$  นาโนเมตร ผู้วิจัยจำลองเยื่อไขมันสองชั้น (lipid bilayer membrane) ของเซลล์โดยการเตรียมไลโปโซมขนาดใกล้เคียงเซลล์ (cell-sized liposome) ติดสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่เป็นตัวให้พลังงานบนเยื่อไขมันสองชั้นและติดสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่เป็นตัวรับพลังงานบนอนุภาค OCN จากนั้นศึกษาอันตรกิริยาระหว่าง OCN และ ไลโปโซมด้วยเทคนิค Förster resonance energy transfer (FRET) โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งพบว่าอนุภาค OCN เกิดอันตรกิริยากับไลโปโซมได้ดี นอกจากนี้ยังทำการทดลองตรวจสอบการเหนี่ยวนำให้ผนังของไลโปโซมรั่วโดย OCN โดยออกแบบให้สารละลายภายในและสารละลายภายนอก (medium) ของไลโปโซมมีสีต่างกันเมื่อสังเกตผ่านกล้องฟลูออเรสเซนต์ไมโครสโคป จากนั้นผสมสารแขวนลอยไลโปโซมกับอนุภาค OCN แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายในไลโปโซม พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที สีของสารละลายภายในไลโปโซมเป็นสีเดียวกับกับสารละลายภายนอกแสดงให้เห็นว่า อนุภาค OCN สามารถเหนี่ยวนำให้เยื่อไขมันสองชั้นของไลโปโซมเกิดรูรั่วขึ้น



รูปที่ 1 แบบจำลองการแทรกตัวผ่านเยื่อไขมันสองชั้นของอนุภาค OCN

คำสำคัญ : กลไกการเข้าสู่เซลล์, เยื่อไขมันสองชั้น, ไลโปโซม, FRET

Title : Study Interaction between Lipid Bilayer Membrane and Oxidized Carbon Nanoparticles (OCN)

Student names : Kamonluck Sathornsantikun ID 5433053523

Titiporn Sansureerungsikul ID 5433081023

Advisor : Associate Dr. Supason Wanichwecharungruang

Department of chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2014

### Abstract

Drug carriers have received much interest and have been applied for therapeutic, scientific studies and food/beverage industries. Herein, Oxidized Carbon Nanoparticles (OCN) are synthesized. The particles can deliver macromolecules into the cells. In this work, we have studied the mechanism of lipid bilayer membrane penetration of OCN. OCN was synthesized by strong oxidation of graphite under sonication. The particles were separated by step-wise high-speed centrifugation. The OCN showed a spherical shape with a diameter of  $37.7 \pm 4.6$  nanometers. We have mimicked lipid bilayer membrane of a cell through the preparation of cell-size liposomes. The liposomes contained donor lipid fluorescence dye at their lipid membrane. We loaded the acceptor lipid fluorescence dye onto OCN particles. These were used for studying the interaction between lipid bilayer membrane and OCN through the Förster resonance energy transfer (FRET) technique. By monitoring the fluorescence transformation, we observed that OCN possessed good affinity to the lipid bilayer membrane. To confirm that the particles could create pores on the lipid bilayer membrane of the liposomes and thus induced leakage of the liposomes, we fabricated liposome suspension in which the content of the solution at the inside and that at the outside of the liposome were different. Then we investigated, under fluorescence microscope, an ability of OCN to destroy such difference. It was observed that after 60 minutes of introducing OCN into the liposome suspension, the content of the solution at the inside of the liposomes became similar to that at the outside of the liposomes. The result confirms the hypothesis that the OCN can induce transient pores onto the lipid bilayer membrane.

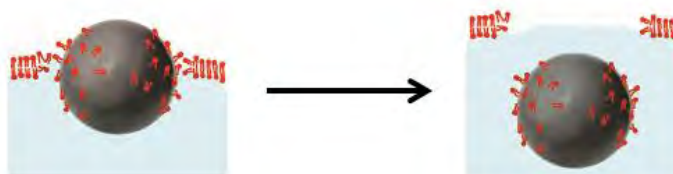


Figure 1 The model of OCN insertion phenomenon by passed through lipid bilayer of liposome.

Keywords : Mechanism into the cells, Lipid Bilayer, Liposome, FRET



## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ เรื่อง ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค ออกซิไดซ์คาร์บอนระดับนาโน (OCN) เพื่อพิสูจน์กลไกการเข้าสู่ไลโปโซมของอนุภาค OCN สำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วณิชเวชารุ่งเรือง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิด คำแนะนำและการสนับสนุนเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการเขียนรายงานฉบับนี้ จนเสร็จสมบูรณ์ คณะผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ชีรยุทธ วิไลวัลย์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จูอนุวัฒน์กุล ที่ให้เกียรติสละเวลามาเป็นกรรมการประเมินเล่มโครงการนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆ ขอขอบคุณภาควิชาเคมีและศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัยต่างๆ ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ต้นตุลानी Associate Professor Tsutomu Hamada อาจารย์ ดร. พร้อมพงศ์ เพียรพิณีจรรยา นายชฤต สินธุเสก นางสาวจิราพร สีมอก นางสาวกิตติมา อมรวชิรบดี ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือวิจัยและสารเคมีตลอดจนคำแนะนำดีๆ รวมถึงความช่วยเหลือในทุกๆ ขั้นตอนของการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณกำลังใจที่สำคัญจากพ่อแม่ พี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคน ขอขอบคุณ Hamada group และ SW group สำหรับความเป็นกันเองและความอบอุ่นที่มอบให้เสมอมา

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ และองค์การสนับสนุนนักศึกษาแห่งประเทศไทยญี่ปุ่น (Japan Student Service Organization : JASSO) ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลอื่นๆที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

## หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
- สารบัญรูป	ช
- สารบัญกราฟ	ญ
- สารบัญตาราง	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
1.3 ระเบียบวิจัยและขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1.6 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	6
<b>บทที่ 2 การทดลอง</b>	
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	9
2.2 สารเคมี	10
2.3 วิธีการทดลอง	11
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง</b>	
3.1 การสังเคราะห์อนุภาคออกซิไดซ์คาร์บอนระดับนาโน	15
3.2 ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาคออกซิไดซ์คาร์บอนระดับนาโน	20
<b>บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง</b>	30
เอกสารอ้างอิง	31
ประวัติผู้วิจัย	33

## สารบัญรูป

	หน้า
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
รูปที่ 1.1 แผนภาพความล้มเหลวของยาไปสู่เซลล์เป้าหมาย (ซ้าย) และการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงของยาบนอนุภาคนำส่ง (ขวา)	1
รูปที่ 1.2 แผนภาพของอนุภาคระดับนาโนที่ถูกนำเข้าสู่ร่างกายด้วยวิธีการกิน สูดดมหรือซึมผ่านผิวหนัง จะอยู่ในชั้นของเหลวภายนอกเซลล์ซึ่งจะมีโปรตีนและสารชีวโมเลกุลอื่นๆกระจายตัวอยู่ โปรตีนที่เคลือบบนพื้นผิวของอนุภาคจะถูกรเรียกว่า protein corona ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดว่าอนุภาคนาโนมีอันตรกิริยากับเซลล์ในลักษณะใด โดยอาจจะมีกลไกการเข้าสู่เซลล์แบบใช้พลังงาน (active uptake) เช่น วิธีเอนโดโซโทซิส หรือแบบไม่ใช้พลังงาน (passive uptake) เช่นวิธี Penetration <sup>6</sup>	2
รูปที่ 1.3 โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบไขมันเรียงตัวกัน 2 ชั้น (lipid bilayer) โครงสร้างไขมันประกอบไปด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) หรือเรียกว่า ไขมันส่วนหัว (lipid head group) และส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) หันเข้าหากันได้เป็นลักษณะดังภาพ <sup>10</sup>	3
รูปที่ 1.4 (ก) โครงสร้างของโมเลกุลไขมัน POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine) โดยมีส่วนหัวเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic head) ส่วนหางเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) (ข) ส่วนหัวและหางของโมเลกุลไขมันจะเกิดการรวมตัวเข้าหากันอยู่ในรูปของเยื่อไขมันสองชั้น (lipid bilayer membrane) ลักษณะคล้ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์สิ่งมีชีวิต (ค) โมเลกุลไขมันรวมตัวกันได้เป็นถุงไขมันขนาดตั้งแต่ 0.02 – 250 ไมโครเมตร <sup>15</sup>	6
รูปที่ 1.5 ขนาดของไลโปโซมจำแนกตาม lamellarity classification system (lamellar lipid bilayer) Small unilamellar vesicles (SUV) คือไลโปโซมขนาดเล็กที่มี lamella เพียงชั้นเดียว Large unilamellar vesicles (LUV) คือไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มี lamella เพียงชั้นเดียว Giant unilamellar vesicles (GUV) คือไลโปโซมที่มีขนาดมากกว่า 1 ไมโครเมตร Multilamellar vesicles มี lamellar หลายชั้น Multivesicular คือถุงขนาดเล็กหลายๆ ถุงที่ถูกห่อหุ้มด้วยถุงขนาดใหญ่ <sup>15</sup>	6
รูปที่ 1.6 แผนภาพการถ่ายโอนพลังงานของ Fluorescence Resonance Energy Transfer <sup>19</sup>	8

**บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล**

รูปที่ 3.1 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแกรไฟต์ได้เป็นแกรไฟีนออกไซด์ตามวิธีของ Arayachukeat <sup>11</sup>	15
รูปที่ 3.2 การเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคที่สังเคราะห์ภายใต้แรงสั่นด้วยเสียง (ก) อนุภาคที่สังเคราะห์เสร็จใหม่ (ข) อนุภาคที่สังเคราะห์เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือน (ค) อนุภาคที่สังเคราะห์หลังจากการให้แรงสั่นด้วยเสียงเป็นเวลา 10 นาที (ง) อนุภาคที่สังเคราะห์หลังจากการให้แรงสั่นด้วยเสียงเป็นเวลา 20 นาที	17
รูปที่ 3.3 EDS สเปกตรัมของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้	18
รูปที่ 3.4 แบบจำลองไลโปโซมที่เกิดจากการติดสีฟลูออเรสเซนต์ไว้ภายในเยื่อไขมันสองชั้น	21
รูปที่ 3.5 การบวมตัวของเยื่อไขมันสองชั้นที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในตัวกลางที่เป็นน้ำจากวิธีการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธีไฮดรชัน <sup>20</sup>	21
รูปที่ 3.6 แบบจำลองการถ่ายโอนพลังงานที่คาดว่าจะเกิดขึ้นระหว่าง C <sub>6</sub> NBD (ตัวให้พลังงาน) คู่ DMPE-RhB (ตัวรับพลังงาน) โดยการพาตัวรับพลังงานเข้าสู่ไลโปโซมด้วยการแทรกผ่านเยื่อไขมันสองชั้น (ภาพซ้าย) หรือพาตัวรับพลังงานเข้าสู่ไลโปโซมด้วยการเกิดเอนโดไซโทซิส (ภาพขวา)	23
รูปที่ 3.7 แบบจำลองการมีรูรั่วบนเยื่อไขมันสองชั้นของไลโปโซม	24
รูปที่ 3.8 แผนการทดลองการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมภายใต้กล้อง fluorescence microscope (phase contrast mode)	25
รูปที่ 3.9 ภาพถ่ายจากกล้อง fluorescence microscope ของไลโปโซมที่มีขนาดประมาณ 40 ไมโครเมตร ในตัวกลางที่เป็นสารละลายซูโครส	25
รูปที่ 3.10 ภาพจากกล้อง fluorescence microscope (ก) ไลโปโซมในสารละลายอ้างอิงที่ 0 นาที (ข) ไลโปโซมในสารละลายอ้างอิงที่ 60 นาที (ค) ไลโปโซมและอนุภาค OCN ในสารละลายวิเคราะห์ที่ 0 นาที (ง) ไลโปโซมและอนุภาค OCN ในสารละลายวิเคราะห์ที่ 60 นาที	26
รูปที่ 3.11 แผนการทดลองการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมภายใต้กล้อง confocal laser scanning microscope	27



รูปที่ 3.12 ภาพจากกล้อง Confocal laser scanning microscope (ก) ภาพจาก Fluorescence mode เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที (ข) ภาพจาก Phase contrast mode เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที

รูปที่ 3.13 ภาพจากกล้อง fluorescence microscope (ก) สารละลายวิเคราะห์ (สารแขวนลอยไลโปโซมผสมกับส่วนของเหลวของอนุภาค OCN) (ข) สารแขวนลอยไลโปโซม ที่ตั้งทิ้งไว้ 7 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

รูปที่ 3.14 การเปลี่ยนแปลงของสารละลายทั้ง 3 หลอดคือ สารละลายผสมระหว่างไลโปโซมกับอนุภาค OCN สารละลายผสมระหว่างน้ำกับ OCN และสารละลายผสมระหว่างไลโปโซมกับน้ำ เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ เป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

**บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง**

รูปที่ 4.1 แบบจำลองกลไกการเข้าสู่ไลโปโซมของอนุภาค OCN โดยอนุภาค OCN น่าจะเข้าไปใกล้ไลโปโซมและดูดซับไขมันที่เป็นโครงสร้างหลักไว้บนอนุภาคจนเกิดเป็นรูรั่วบนเยื่อไขมันสองชั้น จากนั้นอนุภาค OCN จึงแทรกตัวผ่านรูรั่วเข้าสู่ไลโปโซมภายหลัง



## สารบัญกราฟ

	หน้า
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล</b>	
กราฟที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงที่ดูดกลืน ( Absorbance ) กับความยาวคลื่น (Wavelength) ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ (OCN) และแกรไฟต์	19
กราฟที่ 3.2 Raman Spectrum ของแกรไฟต์	19
กราฟที่ 3.3 Raman Spectrum ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้	20
กราฟที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสัมพัทธ์ (Relative Intensity) ของสารแขวนลอยไลโปโซมผสมสารละลาย DMPE (free.DMPE) กับความยาวคลื่นที่เวลาต่างๆ	22
กราฟที่ 3.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสัมพัทธ์ (Relative Intensity) ของสารแขวนลอยไลโปโซมผสมอนุภาคที่บรรจุ DMPE (OCN-DMPE) กับความยาวคลื่นที่เวลาต่างๆ	22
กราฟที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไลโปโซมที่เปลี่ยนสีเทียบกับเวลา	28

## สารบัญตาราง

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล

หน้า

ตารางที่ 3.1 ปริมาณธาตุต่างๆ ณ ตำแหน่งของอนุภาค

18



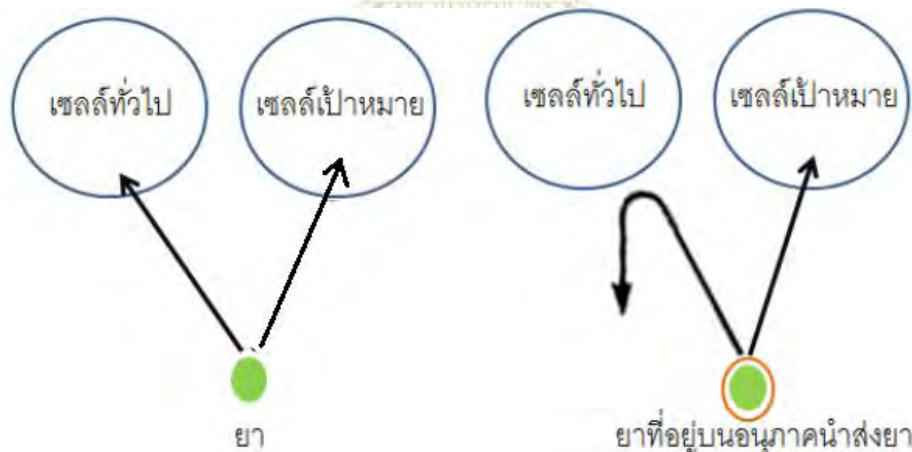
## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CCNs	=	Cluster of carbon nanospheres
CNT-Oxide	=	Carbon oxide nanotube
C <sub>6</sub> NBD	=	N-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]- phytosphingosine
DI water	=	Deionized water
DMPE-RhB	=	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N- (lissamine rhodamine B sulfonyl)
DOPC	=	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
EDS	=	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
Egg PC	=	L- $\alpha$ -Lecithin (Egg yolk)
free DMPE	=	Isolate DMPE-RhB (fluorescence dye)
FRET	=	Förster resonance energy transfer
GUV	=	Giant unilamellar vesicles
ITO-glass	=	Indium Tin Oxide-slide glass
Liposome-C <sub>6</sub> NBD	=	Liposome containing C <sub>6</sub> NBD (fluorescence dye)
LUV	=	Large unilamellar vesicles
MLVs	=	Multilamella bilayer vesicles
OCN	=	Oxidized carbon nanoparticles
OCN-DMPE	=	OCN containing DMPE-RhB (fluorescence dye)
POPC	=	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
<i>P. acnes</i>	=	<i>Propionibacterium acnes</i>
SEM	=	Scanning electron microscope
SUV	=	Small unilamellar vesicles
ULVs	=	Unilamellar bilayer vesicles



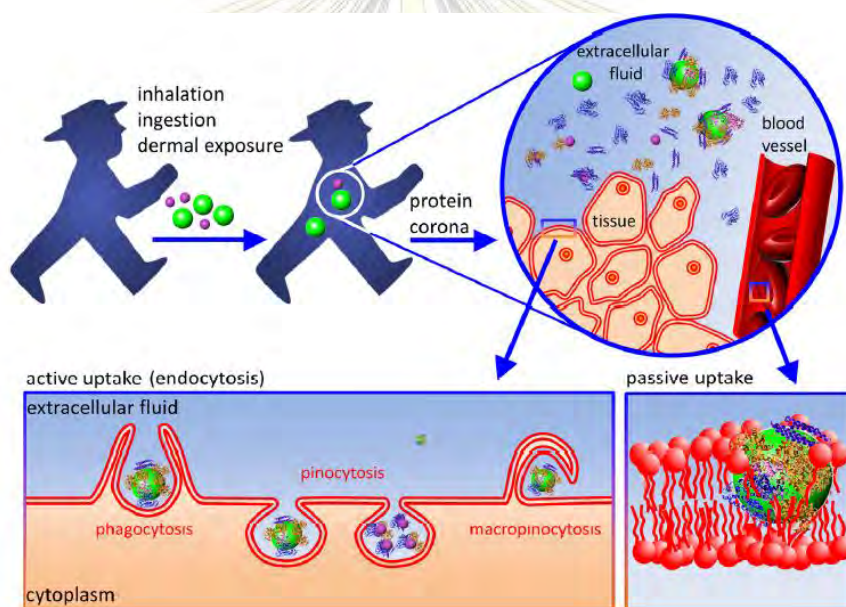
### 1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

ในปัจจุบันอนุภาคนำส่งยาที่มีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากการรักษาเคมีบำบัดของโรคมะเร็ง ยาที่ใช้ในการรักษาไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ปกติได้ อีกทั้งยาที่ใช้ในการรักษาส่วนใหญ่มีความสามารถละลายน้ำที่ต่ำ ทำให้ร่างกายดูดซึมได้ยาก เช่น พาคลิแทกเซล (Paclitaxel) เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งปอดและรังไข่<sup>1</sup> มีความสามารถในการละลายน้ำน้อยกว่า 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ดังนั้นจึงได้มีการนำอนุภาคนำส่งยามาช่วยในการรักษา โดยอนุภาคนำส่งยาที่มีขนาดระดับนาโนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาเนื่องจากอนุภาคนำส่งยาเหล่านี้สามารถกระจายตัวอย่างรวดเร็วในบริเวณที่เกิดโรคต่างๆ และสามารถนำส่งยาภายในเซลล์ได้ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ<sup>1</sup> ของตัวยาได้อีกด้วย โดยเป้าหมายสูงสุดของอนุภาคนำส่งยา คือการควบคุมที่มีความแม่นยำของการกระจายตัวของยา การกำหนดเซลล์เป้าหมาย ความเสถียรของยาภายในสิ่งมีชีวิต จลนศาสตร์การไหลเวียน และกลไกการปลดปล่อยยา ซึ่งสมบัติหลักของอนุภาคนำส่งยาระดับนาโนที่ดี 2 ประการคือ การกำหนดเป้าหมายที่มีประสิทธิภาพไปยังเนื้อเยื่อและเซลล์ที่จำเพาะเจาะจง รวมถึงชะลอการถูกกำจัดอย่างรวดเร็วของอนุภาคในเนื้อเยื่อเป้าหมายเมื่อเวลาผ่านไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของอนุภาคนำส่ง เช่น เมื่อเปรียบเทียบการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคที่มีลักษณะเป็นแท่งและทรงกลมที่มีขนาดใกล้เคียงกัน พบว่าอนุภาคที่เป็นทรงกลมจะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่า<sup>2</sup>



รูปที่ 1.1 แผนภาพความไม่เจาะจงของยาไปสู่เซลล์ต่างๆ (ซ้าย) และการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงของยาบนอนุภาคนำส่ง (ขวา)

นอกจากการคิดค้นระบบนำส่งยาที่ดีแล้ว ผู้วิจัยยังต้องคำนึงกลไกการเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย รวมไปถึงวิธีการปลดปล่อยตัวยาออกจากอนุภาคนำส่งยาเพื่อให้การรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย โดยกลไกการเข้าสู่เซลล์จะเกี่ยวข้องกับสมบัติที่สำคัญของเซลล์สิ่งมีชีวิต คือ ความสามารถในการคัดเลือกและควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เพื่อรักษาสสมดุลยภาพของเซลล์ให้คงอยู่ได้และเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ความสามารถในการคัดเลือกของเซลล์นี้เกิดเนื่องมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเยื่อไขมันสองชั้น (lipid bilayer membrane) มีสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (selective permeable membrane)<sup>3</sup> โมเลกุลขนาดเล็กและไม่มีขั้ว เช่น  $O_2$ ,  $CO_2$  จะใช้วิธีแพร่ผ่านเยื่อไขมันสองชั้นเพื่อเข้าสู่เซลล์ ในขณะที่โมเลกุลมีขั้ว เช่น ไอออนต่างๆ และอนุภาคโปรตีนจะไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ด้วยตัวเอง แต่จะมีช่องพิเศษที่เรียกว่า ช่องโปรตีน (specialized membrane-transport protein channels)<sup>4</sup> ให้สารเหล่านี้ผ่านเข้าไป ส่วนอนุภาคหรือโมเลกุลระดับนาโนจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีหลักๆ 2 วิธีคือ วิธีเอนโดไซโทซิส (endocytosis) โดยจะมีเยื่อหุ้มเซลล์มาล้อมอนุภาคหรือโมเลกุลจนกลายเป็นถุงเก็บสารแล้วนำเข้าสู่เซลล์<sup>5</sup> และวิธีการซึมผ่าน lipid bilayer โดยตรง (direct penetration)<sup>5</sup>



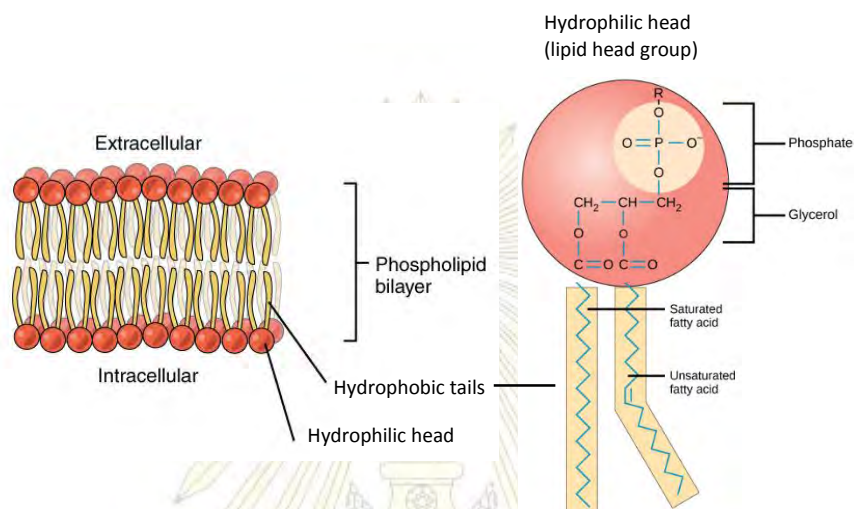
รูปที่ 1.2 แผนภาพของอนุภาครระดับนาโนที่ถูกนำเข้าสู่ร่างกายด้วยวิธีการกิน สูดดมหรือซึมผ่านผิวหนัง จะอยู่ในชั้นของเหลวภายนอกเซลล์ซึ่งมีโปรตีนและสารชีวโมเลกุลอื่นๆกระจายตัวอยู่ โปรตีนที่เคลือบบนพื้นผิวของอนุภาคเรียกว่า protein corona ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดว่าอนุภาคนาโนมีอันตรกิริยากับเซลล์ในลักษณะใด โดยอาจจะมีการเข้าสู่เซลล์แบบใช้พลังงาน (active uptake) เช่น วิธีเอนโดไซโทซิส หรือแบบไม่ใช้พลังงาน (passive uptake) เช่นวิธี penetration<sup>6</sup>

ปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนำส่งยาระดับนาโนได้แก่

รูปร่าง พบว่าอนุภาคที่เป็นทรงกลมจะสามารถยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้มากที่สุด และจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าอนุภาคที่เป็นหลอดทรงกระบอก<sup>7</sup>

ขนาดของอนุภาค พบว่าขนาดที่น้อยกว่า 200 นาโนเมตร จะเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่สร้างจากกรดไขมันอิ่มตัว ส่วนอนุภาคที่มีขนาดมากกว่า 200 นาโนเมตร จะเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่สร้างจากกรดไขมันไม่อิ่มตัว<sup>8</sup>

ประจุบนพื้นผิวอนุภาค ประจุบนอนุภาคจะเหนี่ยวนำให้ไขมันส่วนหัว (lipid head group) บนเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการกระจายตัวด้วยแรงทางไฟฟ้าสถิต โดยอนุภาคที่มีประจุบนพื้นผิวเป็นบวกจะเกิดอันตรกิริยากับหมู่ที่มีประจุลบบริเวณไขมันส่วนหัว โดยหมู่ที่มีประจุลบจะเอียงตัวเข้าหาอนุภาคประจุบวก จนเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการแยกตัวออกเป็นรูรั่ว อนุภาคก็จะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ในทางตรงกันข้ามกับอนุภาคประจุลบจะเหนี่ยวนำให้ไขมันส่วนหัวที่มีประจุบวกเกิดการจัดเรียงตัวรอบล้อมอนุภาคประจุลบแทน<sup>9</sup>



รูปที่ 1.3 โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมันเรียงตัวกัน 2 ชั้น (lipid bilayer) โครงสร้างไขมันประกอบไปด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) หรือเรียกว่า ไขมันส่วนหัว (lipid head group) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) หันเข้าหากันได้เป็นลักษณะดังภาพ<sup>10</sup>

ในปี ค.ศ. 2012 Arayachukeat และคณะ<sup>10</sup> สามารถสังเคราะห์อนุภาคแบบใหม่จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของแกรไฟต์ได้เป็นแกรไฟต์ออกไซด์ นั่นคือ คลัสเตอร์คาร์บอนนาโนสเฟียร์ (CCNs) และพบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้เป็นอนุภาคทรงกลม ขนาดประมาณ 130 นาโนเมตร สามารถนำส่ง curcumin เข้าสู่เซลล์มะเร็งไตและเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้

นอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมในปี ค.ศ. 2012 ของสินธุเสกและคณะ<sup>12</sup> ที่เกี่ยวกับอนุภาค CCNs พบว่าสามารถนำส่งยารักษามะเร็งพาคลิแทคเซลเข้าสู่เซลล์มะเร็งปอด และพบว่ายารักษามะเร็งพาคลิแทคเซลสามารถส่งผลกระทบต่อไมโครทิวบูลของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการแบ่งเซลล์ได้ อีกทั้งอนุภาค CCNs สามารถกระจายตัวได้ดีในน้ำและมีความเสถียรสูง จึงเหมาะสมในการเป็นอนุภาคนำส่งยา แต่เนื่องจาก CCNs เป็นอนุภาคนำส่งยาชนิดใหม่จึงยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกการเข้าสู่เซลล์

ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนำส่งยาชนิดนี้ ผู้วิจัยจะศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเซลล์กับอนุภาค CCNs ซึ่งได้ค้นพบในภายหลัง<sup>12</sup> ว่าเป็นอนุภาคคาร์บอนที่ถูกออกซิไดส์ จึงเรียกว่า อนุภาคออกซิไดส์คาร์บอน โดยในการศึกษาผู้วิจัยเลือกใช้เทคนิค Förster resonance energy transfer (FRET) เนื่องจากเทคนิค FRET เป็นเทคนิคที่เหมาะสมแก่การศึกษาการถ่ายโอนพลังงานของหมู่ที่ติดกลืนแสงและถ่ายโอนพลังงาน (donor) ไปยังหมู่ที่รับพลังงานและเรืองแสง (acceptor) ภายในโมเลกุลเดียวกันโดยความเข้มของการเรืองแสงจะ



เป็นตัวบ่งบอกระยะทางระหว่างหมู่ทั้งสองนี้ จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการติดตามระยะทางระหว่างสองจุดในโมเลกุลที่สนใจขณะเกิดการเปลี่ยนแปลง

ผู้วิจัยจะสังเคราะห์อนุภาคออกซิไดส์คาร์บอนระดับนาโน (Oxidized carbon nanoparticles, OCN) โดยตัดแปรจากวิธีของ Arayachukeat<sup>11</sup> พิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้และศึกษาอันตรกิริยาของอนุภาคที่ได้กับเยื่อหุ้มเซลล์จำลอง

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. สังเคราะห์อนุภาค OCN จากแกรไฟต์และพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างของอนุภาค OCN
2. ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN
3. พิสูจน์กลไกการเข้าสู่ไลโปโซมของอนุภาค OCN

## 1.3 ระเบียบวิธีและของเขตของการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการวางแผนการทดลอง รวมถึงจัดหาวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ
2. สังเคราะห์อนุภาค OCN จากแกรไฟต์ โดยตัดแปรจากวิธีของ Arayachukeat<sup>11</sup>
3. พิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาค OCN ด้วยเทคนิคต่อไปนี้
  - การส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning electron microscopy (SEM)
  - รามานสเปกโทรสโกปี (Raman spectroscopy)
  - ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี (UV-visible spectrometer)
  - Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)
  - การวิเคราะห์ธาตุ (Elemental analysis)
4. สังเคราะห์ไลโปโซมโดยตัดแปรจากวิธีของ Hamada<sup>8</sup> และ Angelova<sup>13</sup> จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของไลโปโซมด้วย fluorescence microscope และ confocal laser scanning microscope
5. ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN ด้วย fluorescence spectrophotometer โดยการนำอนุภาค OCN ติดสีย้อม 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DMPE-RhB) ที่เป็นตัวรับพลังงาน (acceptor species) และนำไลโปโซมติดสีย้อม N-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-phytosphingosine (C<sub>6</sub>NBD) ที่เป็นตัวให้พลังงาน (donor species) โดยใช้ปริมาณของสีย้อมตามวิธีของ Pornpattananangkul และคณะ<sup>14</sup> เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN ด้วยเทคนิค Förster Resonance Energy



Transfer (FRET) โดยอนุภาค OCN กับเยื่อไขมันสองชั้นต้องอยู่ใกล้กันมากจนสามารถเกิดการถ่ายโอนพลังงานจากตัวให้ไปยังตัวรับพลังงานได้ ซึ่งดูได้จากสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ

#### 6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลและเขียนรายงาน

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN เพื่อสามารถนำไปพิสูจน์กลไกการเข้าสู่ไลโปโซมของอนุภาค OCN ได้

### 1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ใน ค.ศ. 2012 Arayachukeat และคณะ<sup>11</sup> สามารถสังเคราะห์อนุภาคแบบใหม่จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของแกรไฟต์ได้เป็นแกรไฟีนออกไซด์ นั่นคือ คลัสเตอร์คาร์บอนนาโนสเฟียร์ (CCNs) ซึ่งอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลม ขนาดประมาณ 130 นาโนเมตร สามารถนำส่งยา curcumin ซึ่งเป็นสารสกัดจากต้นขมิ้นไต้หวันผิวของอนุภาคและนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งไตและมะเร็งปากมดลูกได้

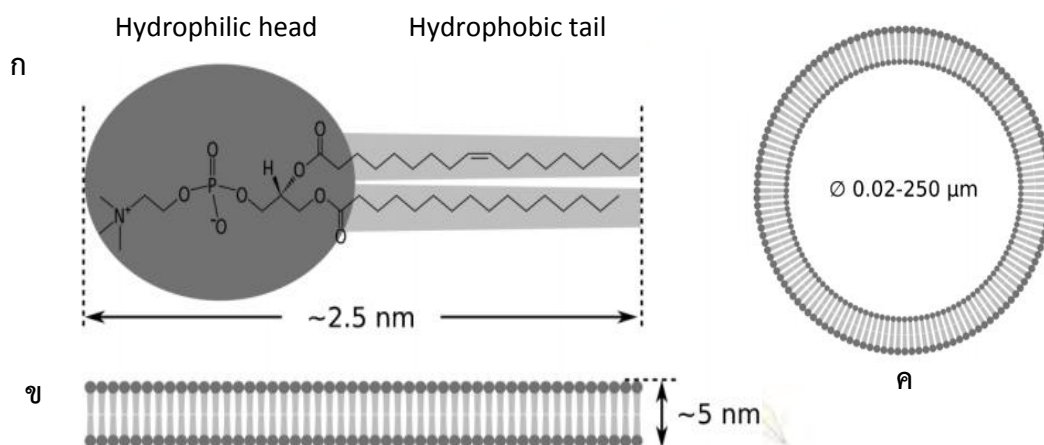
ใน ค.ศ.2012 สินธุเสก และคณะ<sup>12</sup> สามารถสังเคราะห์อนุภาคตามวิธีของ Arayachukeat<sup>10</sup> และทำการบรรจุยาพาคลิแทคเซล (Paclitaxel) ไ่วบนอนุภาคเพื่อนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งปอด พบว่ายารักษามะเร็งพาคลิแทคเซลสามารถส่งผลต่อไมโครทิวบูลของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการแบ่งเซลล์ได้

ใน ค.ศ.2013 Pornpattananangkul และคณะ<sup>14</sup> แสดงให้เห็นถึงความสามารถการต่อต้านเชื้อ *P. acnes* ที่ดีขึ้นเมื่อบรรจุกรดลอริก (Lauric acid) ไ่วภายในไลโปโซม โดยใช้เทคนิค Förster resonance energy transfer (FRET) เป็นวิธีหนึ่งในการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างไลโปโซมที่บรรจุกรดลอริกกับเชื้อ *P. acnes*

## 1.6 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

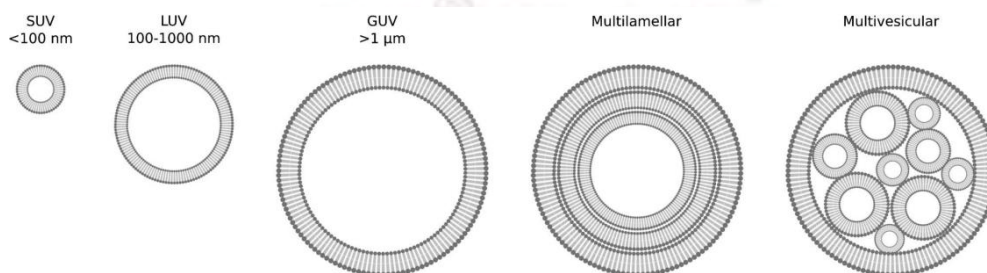
### 1.6.1. ไลโปโซม (liposome)<sup>15</sup>

ไลโปโซม คือ อนุภาคที่มีลักษณะเป็นถุงกลมๆ ของสารไขมันชนิดแอมฟิพาติก (amphipathic) กล่าวคือมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มีโครงสร้างดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 (ก) โครงสร้างของโมเลกุลไขมัน POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) โดยมีส่วนหัวเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic head) ส่วนหางเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) (ข) ส่วนหัวและหางของโมเลกุลไขมันจะเกิดการรวมตัวเข้าหากันอยู่ในรูปของเยื่อไขมันสองชั้น (lipid bilayer membrane) ลักษณะคล้ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์สิ่งมีชีวิต (ค) โมเลกุลไขมันรวมตัวกันได้เป็นถุงไขมันขนาดตั้งแต่ 0.02 – 250 ไมโครเมตร<sup>15</sup>

จากลักษณะที่คล้ายเซลล์สิ่งมีชีวิตของไลโปโซม จึงมีการนำไลโปโซมมาใช้อย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นการใช้ไลโปโซมเป็นตัวห่อหุ้มสารต่างๆ เช่น DNA, ยา เพื่อใช้ในต้านระบบนำส่งยีน (gene delivery)<sup>16</sup> และระบบนำส่งยา (drug delivery)<sup>17</sup> ตามลำดับ หรือการใช้ไลโปโซมเป็นเซลล์จำลอง



รูปที่ 1.5 ขนาดของไลโปโซมจำแนกตาม lamellarity classification system (lamellar lipid bilayer) Small unilamellar vesicles (SUV) คือไลโปโซมขนาดเล็กที่มี lamella เพียงชั้นเดียว Large unilamellar vesicles (LUV) คือไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มี lamella เพียงชั้นเดียว Giant unilamellar vesicles (GUV) คือไลโปโซมที่มีขนาด

มากกว่า 1 ไมโครเมตร Multilamellar vesicles มี lamellar หลายชั้น Multivesicular คือถุงขนาดเล็กหลายๆ ถุงที่ถูกห่อหุ้มด้วยถุงขนาดใหญ่<sup>15</sup>

วิธีการเตรียมไลโปโซมมีหลายวิธีขึ้นกับการนำไปใช้ ในงานนี้ผู้วิจัยได้ใช้ไลโปโซมเป็นเซลล์จำลอง จึงเลือกใช้วิธี Electroformation และ Hydration เนื่องจากเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย อีกทั้งยังได้ไลโปโซมที่เป็น Giant unilamellar vesicles อีกด้วย โดยกระบวนการของวิธี Electroformation เริ่มจากเตรียมฟิล์มไขมันบนแผ่นอิเล็กโทรด ระเหยตัวทำละลายและทำฟิล์มไขมันให้แห้งในเดซิเคเตอร์ จากนั้นแช่แผ่นอิเล็กโทรดที่เคลือบด้วยฟิล์มไขมันลงในสารละลายตัวกลางแล้วให้ความต่างศักย์ลงไป จะทำให้ฟิล์มไขมันเกิดอันตรกิริยากับสารละลายตัวกลาง และหลุดออกจนเกิดการรวมตัวกันเองได้เป็นไลโปโซมที่เป็น Giant unilamellar vesicles เป็นส่วนใหญ่โดยจะมีขนาดตั้งแต่ 10-100 ไมโครเมตร

ส่วนวิธี Hydration จะแตกต่างกับวิธี Electroformation คือจะไม่มี การให้ความต่างศักย์ แต่จะใช้การเขย่า (vortex) เพื่อให้ฟิล์มไขมันกับสารละลายตัวกลางเกิดอันตรกิริยาต่อกันแทน โดยวิธีนี้จะได้ไลโปโซมทั้งแบบ Giant unilamellar vesicles, Multilamellar vesicles และ Multivesicular โดยไลโปโซมทั้ง 3 แบบจะมีขนาดตั้งแต่ 1-10 ไมโครเมตร

### 1.6.2. เทคนิค Förster Resonance Energy Transfer (FRET)

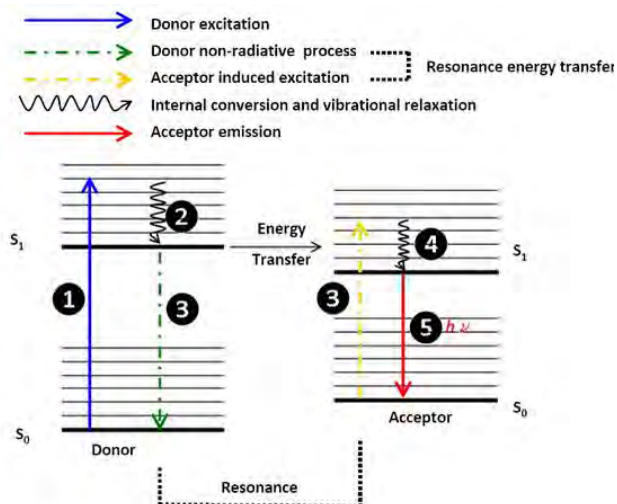
Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) เป็นปรากฏการณ์ที่ตัวให้พลังงานที่ถูกกระตุ้น (excited donor) ถ่ายโอนพลังงานให้กับตัวรับพลังงาน (acceptor) ผ่านกระบวนการที่ไม่ใช้รังสีซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้ขึ้นอยู่กับระยะทาง ใช้หลักการในการถ่ายโอนพลังงานระหว่างตัวให้พลังงานที่อยู่ในสถานะถูกกระตุ้นไปยังตัวรับพลังงานที่ใกล้เคียง โดยถ้าการเรืองแสงของโมเลกุลที่ให้พลังงานซ้อนทับกับการดูดกลืนแสงของโมเลกุลที่รับพลังงานและทั้งสองโมเลกุลอยู่ในระยะที่ใกล้กันมากที่สุด ตัวให้พลังงานจะสามารถถ่ายโอนพลังงานที่ถูกกระตุ้นไปยังตัวรับพลังงานผ่านแรงระหว่างขั้วได้<sup>18</sup> พลังงานที่ถูกถ่ายโอนสามารถหาได้จากสูตร

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

โดยที่  $R$  คือ ระยะทางระหว่างตัวให้พลังงานและตัวรับพลังงาน

$R_0$  คือ ระยะทางที่พลังงานที่ 50% ถูกถ่ายโอน

โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงของความเข้มสัญญาณการเรืองแสงของทั้ง 2 ชนิด กล่าวคือตัวให้พลังงานจะมีความเข้มสัญญาณลดลง เรียกว่า Quenching และความเข้มสัญญาณการเรืองแสงของตัวรับพลังงานจะเพิ่มมากขึ้น เรียกว่า Enhancing



รูปที่ 1.6 แผนภาพการถ่ายโอนพลังงานของ Fluorescence Resonance Energy Transfer<sup>1</sup>





## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 2.1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JSM-6610LV, JEOL, Tokyo, Japan )
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge, Beckman Coulter Allegra 64R, CA, USA )
3. เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer, CARY 100 Bio, Palo Alto, USA)
4. เครื่องรามานสเปกโทรสโกปี (Raman Spectroscopy (DXR Raman Microscope, Thermo Scientific, USA)
5. เครื่องอัลตราโซนิก (Sonicator, Ultrasonic Cleaner VDT-1730QTD, China )
6. เครื่องวิเคราะห์ธาตุเชิงปริมาณและคุณภาพ (Energy dispersive x-ray spectrometer (EDS, Oxford Instruments, Oxford, UK)
7. กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลไมโครสโคป (Confocal Laser Scanning Microscope, FV1000D Olympus)
8. กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลไมโครสโคป (Confocal Laser Scanning Microscope, Eclipse, Ti series microscope, Nikon, Japan)
9. กล้องฟลูออเรสเซนซ์ไมโครสโคป (Fluorescence Microscope, Camera Watec, Olympus IX71)
10. เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (Gwinstek AFG-2005)
11. เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Fluorescence Spectrometer)
12. ถังไดอะไลซิส (MWCO 12000-14000, Sigma-Aldrich Co., ST Louis, MI, USA)
13. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Weight balance, SHIMADZU AUV220D)

## 2.2. สารเคมี

1. 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DMPE-RhB, Avanti® Polar Lipids, INC.)
2. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), Avanti® Polar Lipids, INC.)
3. Calcein (Bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, Wako, Japan)
4. Chloroform (Kanto Kagaku, Japan)
5. Deionized Water (DI water)
6. D(+)-Glucose monohydrate (Glucose, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
7. Glucose (Nacalai Tesque, INC., Japan)
8. Hydrogen Peroxide (18% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , Suksapanpanich, Bangkok, Thailand)
9. L- $\alpha$ -Lecithin (Egg PC, Egg Yolk, CALBIOCHEM,EMD Chemicals, Inc., San Diego, USA )
10. Milli-Q water (Millipak® 40 filterunit 0.2  $\mu$ m Milliphore, USA)
11. Natural flake graphite (NFG, Thai Carbon and Graphite Co., Ltd, Bangkok, Thailand)
12. N-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-phytosphingosine (C6-NBD Phytosphingosine, Avanti® Polar Lipids, INC.)
13. Oxidized Carbon Nanoparticle (OCN)
14. Potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>, Suksapanpanich, Bangkok, Thailand)
15. Sodium Nitrate (NaNO<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, USA )
16. Sucrose (Nacalai Tesque, INC., Japan)
17. Sulfuric Acid (98 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck KGaA, Darmstadt, Germany )

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2.3. วิธีการทดลอง

### 2.3.1. การสังเคราะห์อนุภาคออกซิไดส์คาร์บอนระดับนาโน (OCN) โดยตัดแปรงจากวิธีของ Arayachukeat<sup>11</sup>

1. ผสมผงแกรไฟต์กับผงโซเดียมไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) อย่างละ 1 กรัมและบดละเอียดด้วยโกร่งบดสาร เมื่อบดผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (18 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ปริมาณ 50 มิลลิลิตรและคนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที
3. นำสารละลายไปสั่นด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 60 นาที
4. เติมผงโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ( $\text{KMnO}_4$ ) 6 กรัมและคนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 90 นาที
5. เติมน้ำ DI ปริมาตร 400 มิลลิลิตรและคนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที
6. เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ความเข้มข้น 5 % น้ำหนัก/ปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และคนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที
7. ปั่นเหยียงสารละลายด้วยเครื่องปั่นเหยียงความเร็วสูงที่ความเร็ว 10000 rpm เก็บส่วนที่ตกตะกอนไปผสมกับน้ำ DI จากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็นกลาง ด้วยวิธีการไดอะไลซิสเป็นเวลา 14 วัน
8. ปั่นเหยียงสารละลายที่ได้จากการปรับ pH ที่ความเร็วต่างๆดังนี้
  - 8.1) 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่ทิ้งตะกอนแล้วนำสารละลายไปปั่นต่อ
  - 8.2) 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่ทิ้งตะกอนแล้วนำสารละลายไปปั่นต่อ
  - 8.3) 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่ทิ้งตะกอนแล้วนำสารละลายไปปั่นต่อ
  - 8.4) 15,000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีที่ทิ้งตะกอนแล้วนำสารละลายไปปั่นต่อ
  - 8.5) 20,000 rpm เป็นเวลา 30 นาทีที่เก็บส่วนของเหลว (อนุภาค OCN)

### 2.3.2. ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN

#### 2.3.2.1. ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง Liposome- $\text{C}_6\text{NBD}$ กับ OCN-DMPE ด้วยเทคนิค Förster resonance energy transfer (FRET) ที่เวลาต่างๆ

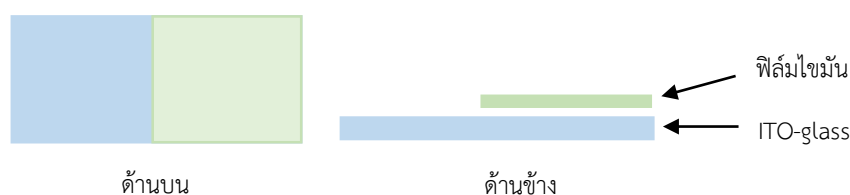
1. ใส่ N-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-phytosphingosine ( $\text{C}_6\text{NBD}$ ) ในอัตราส่วนของ  $\text{C}_6\text{NBD}$  0.1% โดยโมล<sup>14</sup> ลงบนไลโปโซมความเข้มข้น 1540 ppm (**Liposome- $\text{C}_6\text{NBD}$** )
  - 1.1) ปิเปตสารละลาย L- $\alpha$ -Lecithin (Egg PC)เข้มข้น (14.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม) 1.07 มิลลิลิตร สารละลาย  $\text{C}_6\text{NBD}$  เข้มข้น (0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม) 47.5 ไมโครลิตร และปิเปตสารละลายกลูโคสเข้มข้น (10 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล) 3 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลม ผสมสารละลายให้เข้ากัน
  - 1.2) นำไปทำให้แห้งภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนจนมีลักษณะเป็นฟิล์มบาง
  - 1.3) เก็บฟิล์มที่เตรียมได้ภายใต้ระบบสุญญากาศเป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน
  - 1.4) เติมน้ำ Milli-Q ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- 1.5) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงก่อนการใช้งาน
2. การเตรียมสารแขวนลอย 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DMPE-RhB) 0.5% โดยโมล<sup>14</sup> (**free DMPE**)
  - 2.1) ปิเปตสารละลาย DMPE-RhB เข้มข้น (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในตัวทำละลายเอทานอล 119 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำ DI
3. การเตรียมสารแขวนลอย OCN เข้มข้น 308 ppm
  - 3.1) ปิเปตสารแขวนลอย OCN เข้มข้น OCN (1540 ppm) 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI
4. ติด 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DMPE-RhB) ลงบนอนุภาค OCN (**OCN-DMPE**)
  - 4.1) ปิเปตสารแขวนลอย OCN เข้มข้น (1540 ppm) 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร
  - 4.2) ปิเปตสารละลาย DMPE-RhB เข้มข้น (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในตัวทำละลายเอทานอล 119 ไมโครลิตร
  - 4.3) ผสมสารแขวนลอยให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
5. ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง Liposome-C<sub>6</sub>NBD กับ OCN-DMPE โดยเทคนิค FRET ที่เวลาต่างๆ ด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer
  - 5.1) เตรียมสารแขวนลอยผสม 4 หลอด
    - 5.1.1) ผสมสารแขวนลอย Liposome-C<sub>6</sub>NBD ที่ได้จากข้อ 1. กับน้ำ DI (1.5 มิลลิลิตร: 1.5 มิลลิลิตร)
    - 5.1.2) ผสมสารแขวนลอย Liposome-C<sub>6</sub>NBD ที่ได้จากข้อ 1. กับสารละลาย DMPE (free DMPE) ที่ได้จากข้อ 2. (1.5 มิลลิลิตร: 1.5 มิลลิลิตร)
    - 5.1.3) ผสมสารแขวนลอย OCN ที่ได้จากข้อ 3. กับ น้ำ DI (1.5 มิลลิลิตร: 1.5 มิลลิลิตร)
    - 5.1.4) ผสมสารแขวนลอย Liposome-C<sub>6</sub>NBD ที่ได้จากข้อ 1. กับสารแขวนลอย OCN-DMPE ที่ได้จากข้อ 4. (1.5 มิลลิลิตร: 1.5 มิลลิลิตร)
  - 5.2) วัดการคายพลังงานของสารแขวนลอยทั้ง 4 หลอดทุกๆ 5 นาทีเป็นเวลา 15 นาทีด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 470 นาโนเมตร และมีช่วงการศึกษาตั้งแต่ 480-800 นาโนเมตร

### 2.3.2.2. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นและอนุภาค OCN ด้วยวิธีการสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซม

1. การเตรียมไลโปโซมเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธี Electroformation<sup>13</sup>
  - 1.1) สร้างฟิล์มไขมันด้วยการปิเปตสารละลาย 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 22.5 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ลงบน ITO-glass (Indium Tin Oxide-slide glass) ด้านที่มีการเคลือบด้วย ITO ซึ่งจะมีค่าความต้านทานอยู่ระหว่าง 30 – 40  $\Omega$  ในลักษณะดังภาพ



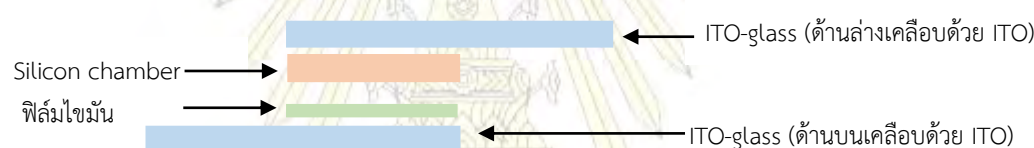


1.2) นำฟิล์มไขมันที่ได้จากข้อ 1.1) ไปทำให้แห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที จากนั้นเปิดคลอโรฟอร์ม 30 ไมโครลิตร ลงบนฟิล์มไขมันเพื่อให้ไขมันเกิดการไหลและจัดเรียงตัวได้ดีขึ้น

1.3) นำฟิล์มไขมันที่ได้จากข้อ 1.2) ไปทำให้แห้งในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อกำจัดตัวทำละลาย

1.4) นำ Silicon chamber วางลงบน ITO-glass ด้านที่มีการเคลือบด้วย ITO อีกแผ่นหนึ่ง (ค่าความต้านทานของ ITO-glass อยู่ระหว่าง 30 – 40  $\Omega$ )

1.5) นำ ITO-glass จากข้อ 1.4) มาวางลงบน ฟิล์มไขมันบน ITO-glass จากข้อ 1.3) โดยให้ Silicon chamber อยู่ระหว่าง ITO-glass ทั้งสองแผ่น ในลักษณะดังภาพ



1.6) จากนั้นฉีดสารละลายซูโครส 100 มิลลิโมลาร์ 450 ไมโครลิตร เข้าไปใน chamber

1.7) ใช้กระดาษฟอยล์หุ้มที่ปลาย ITO-glass ทั้ง 2 แผ่น จากนั้นนำ chamber ที่ได้ไปวางในตู้อบที่ 50 องศาเซลเซียส และให้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1 โวลต์ ที่ความถี่ 10 เฮิรตซ์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ไลโปโซมเกิดการจัดเรียงตัว

1.8) หลังจากนั้นดูดสารแขวนลอยของไลโปโซม (liposome suspension) ออกจาก chamber อย่างช้าๆ โดยใช้เข็มฉีดยา เก็บสารแขวนลอยของไลโปโซมไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

## 2. การวิเคราะห์โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมด้วยเทคนิคทาง microscopy

### 2.1. การเตรียมสารละลายอ้างอิง

2.1.1) ปิเปตสารแขวนลอยของไลโปโซม 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก

2.1.2) ปิเปตสารละลายกลูโคส 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอย ข้อ 2.1.1)

2.1.3) ปิเปตน้ำ Milli-Q 10 ไมโครลิตร ลงไปในสารละลายข้อ 2.1.2) ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้อง fluorescence microscope (Olympus IX71) เป็นเวลา 60 นาที

### 2.2 การเตรียมสารละลายวิเคราะห์

2.2.1) ปิเปตสารแขวนลอยของไลโปโซม 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในขวด

2.2.2) ปิเปตสารละลายกลูโคส 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย

ข้อ 2.2.1)

2.2.3) ปิเปตสารแขวนลอย OCN 1260 ppm 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายข้อ 2.2.2) ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้อง fluorescence microscope (Olympus IX71) เป็นเวลา 60 นาที

2.3 การเตรียมสารละลายวิเคราะห์ที่ติด Calcein fluorescent dye

2.3.1) ปิเปตสารแขวนลอยของไลโปโซม 1 มิลลิโมลาร์ 20 ไมโครลิตร ลงในขวด

2.3.2) ปิเปตสารละลายกลูโคส 200 มิลลิโมลาร์ 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายข้อ 2.3.1)

2.3.3) ปิเปตสารละลายฟลูออเรสเซนต์ Calcein 68.5 ไมโครโมลาร์ 2 ไมโครลิตร ลงในสารละลายข้อ 2.3.2)

2.3.4) ปิเปตสารแขวนลอย OCN 1260 ppm 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายข้อ 2.3.3) ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้อง Confocal Laser Scanning Microscope เป็นเวลา 60 นาที

### 2.3.2.3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารแขวนลอยไลโปโซมเมื่อเติมอนุภาค OCN โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

1. การเตรียมไลโปโซมเข้มข้น 1540 ppm จาก สารละลาย Egg PC ด้วยวิธีไฮเดรชัน<sup>20</sup>
  - 1.1) ผสมสารละลาย Egg PC เข้มข้น (14.4 mg/mL) ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 312 ไมโครลิตร กับ สารละลายกลูโคสเข้มข้น (10 มิลลิโมลาร์) ในตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตร 876 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันในขวดขนาดเล็ก
  - 1.2) นำไปทำให้แห้งภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนจนมีลักษณะเป็นฟิล์มบาง
  - 1.3) เก็บฟิล์มที่ได้ภายใต้ระบบสุญญากาศเป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน
  - 1.4) เติมน้ำ Milli-Q ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
  - 1.5) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงก่อนการใช้งาน
2. เตรียมสารละลาย 3 หลอด
  - 2.1) ผสมสารแขวนลอยของไลโปโซมที่ได้จากข้อ 1 กับสารแขวนลอย OCN ความเข้มข้น 660 ppm (1 มิลลิลิตร : 1 มิลลิลิตร)
  - 2.2) ผสมสารแขวนลอยของไลโปโซมที่ได้จากข้อ 1 กับน้ำ DI (1 มิลลิลิตร : 1 มิลลิลิตร)
  - 2.3) ผสมสารแขวนลอย OCN กับน้ำ DI (1 มิลลิลิตร : 1 มิลลิลิตร)
3. ติดตามลักษณะที่เปลี่ยนไปของสารผสมด้วยการถ่ายภาพที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าเป็นเวลา 6 วัน

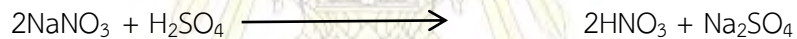
### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล

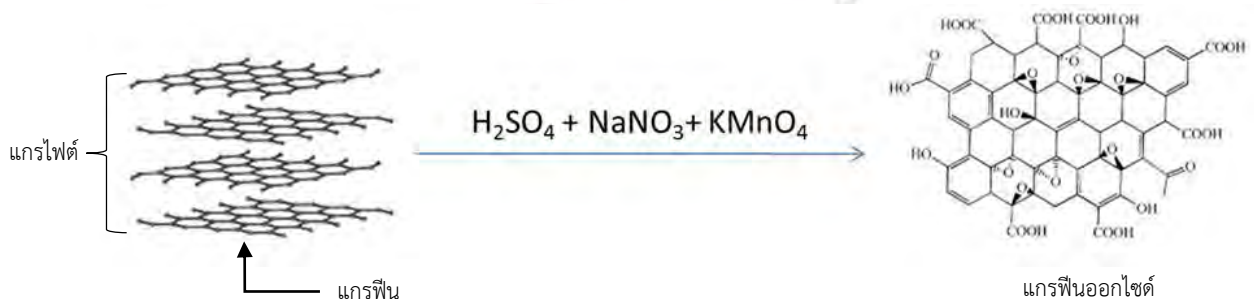
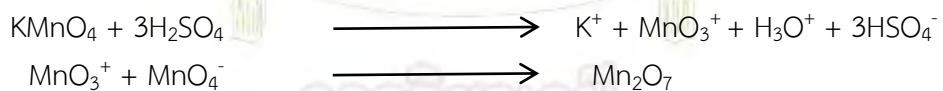
#### 3.1. การสังเคราะห์ออกซิไดส์คาร์บอนระดับนาโน (Oxidized Carbon Nanoparticles : OCN)

##### 3.1.1. ขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาค OCN

ผู้วิจัยสังเคราะห์อนุภาค OCN โดยดัดแปรจากวิธีของ Arayachukeat<sup>11</sup> ซึ่งเป็นวิธีที่ปรับมาจากวิธีของ Hummers และ Offeman<sup>21</sup> เริ่มจากการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันผงแกรไฟต์ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) โซเดียมไนเตรต (NaNO<sub>3</sub>) และโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO<sub>4</sub>) ในที่นี้ NaNO<sub>3</sub> และ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> จะทำปฏิกิริยากันได้เป็นกรดไนตริก (HNO<sub>3</sub>) ดังสมการ HNO<sub>3</sub> จะไปทำลายพันธะคู่ (C-C bond) และทำให้แรงระหว่างระนาบแกรไฟน์ถูกทำลาย ได้เป็นแผ่นแกรไฟน์ขนาดใหญ่หลายๆแผ่น นอกจากนี้แรงสั่นจากการ sonicate น่าจะช่วยเสริมการเข้าแทรกของรีเอเจนต์ที่ระหว่างระนาบ ทำให้การทำลายพันธะคู่ของกรด HNO<sub>3</sub> ทำได้อย่างมีประสิทธิภาพและทั่วถึงมากขึ้น ทำให้เกิดเป็นแผ่นแกรไฟน์ขนาดเล็ก

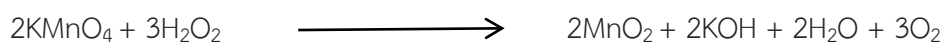


เมื่อเติมโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO<sub>4</sub>) ลงในสารละลายที่มี H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารทั้งสองชนิดได้เป็น Mn<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ซึ่งเป็นตัวออกซิไดส์ที่แรงมาก จะไปออกซิไดส์แผ่นแกรไฟน์เกิดเป็นแกรไฟน์ออกไซด์ ดังสมการ

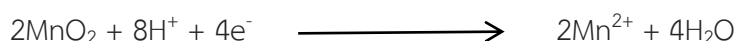


รูปที่ 3.1 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแกรไฟต์ได้เป็นแกรไฟน์ออกไซด์ตามวิธีของ Arayachukeat<sup>11</sup>

เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) เพื่อหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ  $\text{KMnO}_4$  ดังสมการ



เนื่องจากในระบบมีภาวะเป็นกรดทำให้  $\text{MnO}_2$  ถูกรีดิวซ์จนกลายเป็น  $\text{Mn}^{2+}$  ดังสมการ



นำสารที่ได้จากการทำปฏิกิริยาข้างต้น มาปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm เพื่อกำจัดกรดที่มีปริมาณมากเกินไป จากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนมากระจายตัวในน้ำและนำไปไดอะไลซิส (Dialysis) โดยถุงไดอะไลซิส (มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่าน ซึ่งใช้หลักการแพร่ของตัวถูกละลายจากความเข้มข้นมากไปยังความเข้มข้นน้อย) เพื่อกำจัดกรดที่ยังคงเหลืออยู่ในสารละลาย จนระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลคือสารละลายภายในและภายนอกถุงไดอะไลซิสมี pH เท่ากัน (pH 5.5)

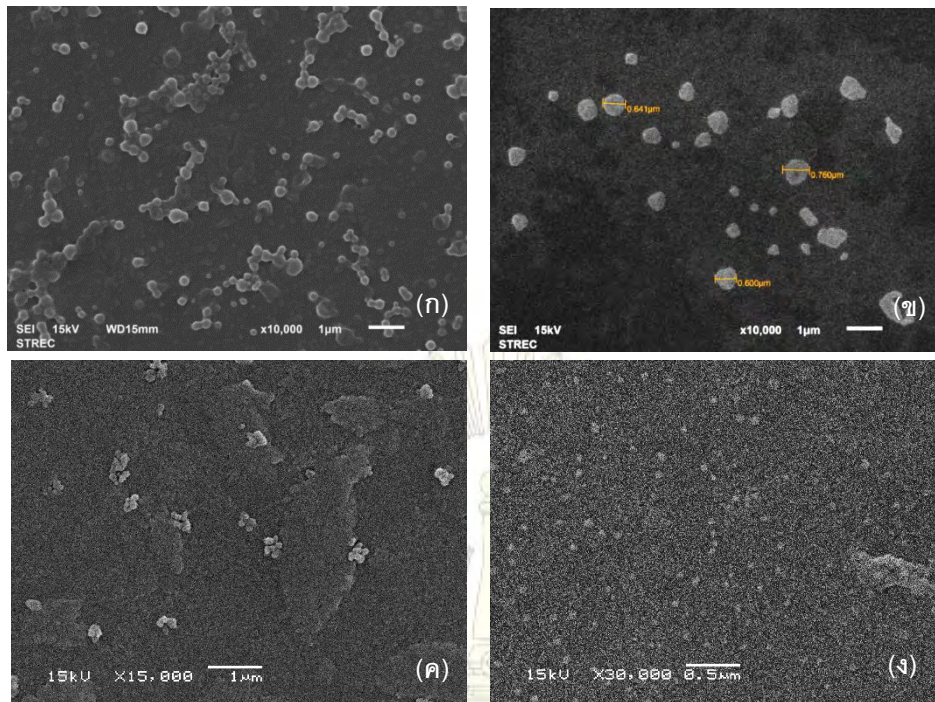
นำสารที่ได้จากการปรับ pH มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่างๆ เพื่อแยกผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา โดยค่อยๆ เพิ่มความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดสารที่ขนาดใหญ่ออกก่อน โดยผลิตภัณฑ์ในความเร็วรอบต่างๆ ได้แก่ แกรไฟต์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา คาร์บอนออกไซด์นาโนทิวบ์ (CNT-Oxide) แผ่นแกรไฟต์ออกไซด์และ fullerene oxide ตามลำดับ โดยสุดท้ายเมื่อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20000 rpm ในชั้นของเหลวจะพบอนุภาค OCN กระจายตัวอยู่<sup>10</sup> เพราะ OCN เป็นอนุภาคขนาดเล็ก ทำให้ไม่ตกตะกอนที่ความเร็วดังกล่าว และเนื่องจาก OCN เป็นอนุภาคคาร์บอนออกไซด์คาดว่าน่าจะมีหมู่ฟังก์ชันจำพวกคาร์บอนิลและแอลกอฮอล์เป็นจำนวนมาก ทำให้อนุภาค OCN สามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเหลวที่ตัวกลางเป็นน้ำได้

### 3.1.2. พิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาคออกไซด์คาร์บอนระดับนาโน (OCN)

#### 3.1.2.1. พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy)

เมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดและลักษณะของชั้นของเหลวที่ความเร็วปั่นเหวี่ยง 20000 rpm ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าขนาดของอนุภาคที่ได้เกี่ยวข้องกับขนาดตัวอย่างไปทำการสั่นด้วยเสียงดังรูปที่ 3.2 กล่าวคือ เมื่อนำอนุภาคที่สังเคราะห์ใหม่ๆ ไปวิเคราะห์จะพบว่า อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาด  $37.7 \pm 4.6$  นาโนเมตร ซึ่งจะมีขนาดที่เล็กกว่าอนุภาคที่ตั้งทิ้งไว้นาน 6 เดือนคือ  $225 \pm 57$  นาโนเมตร และเมื่อนำอนุภาคดังกล่าวมาให้แรงสั่นด้วยเสียงอีกครั้งทำให้อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กลงดังเดิม อีกทั้งเมื่อให้ระยะเวลาการสั่นเพิ่มมากขึ้น พบว่าอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กลงมากขึ้นอีกด้วย

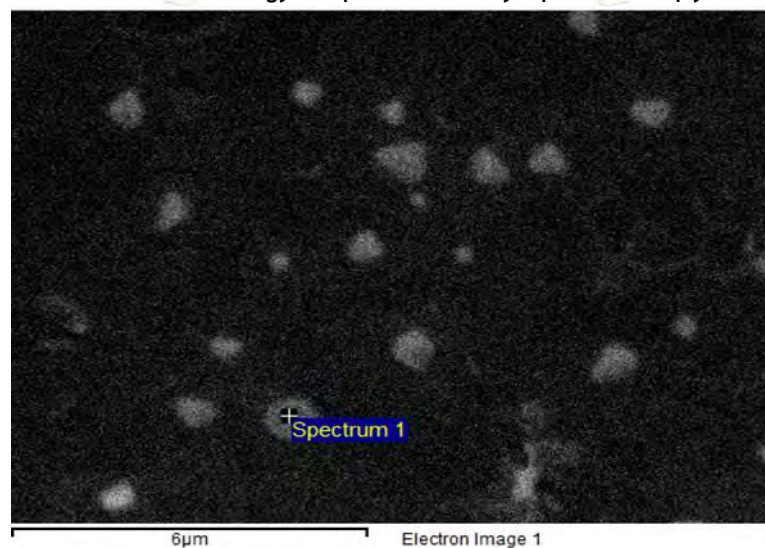




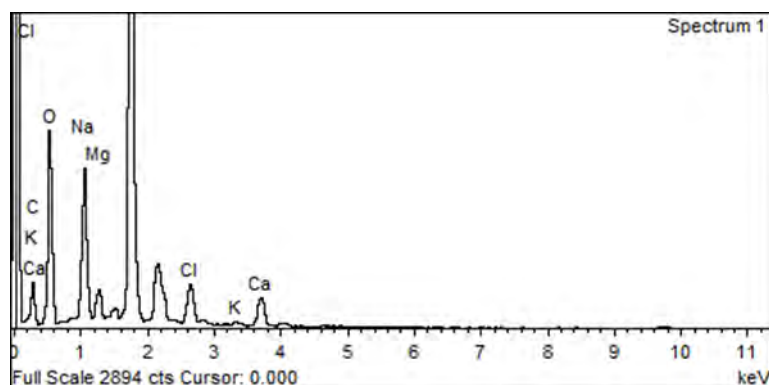
รูปที่ 3.2 การเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคที่สังเคราะห์ภายใต้แรงสั่นด้วยเสียง (ก) อนุภาคที่สังเคราะห์เสร็จใหม่ (ข) อนุภาคที่สังเคราะห์เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือน (ค) อนุภาคที่สังเคราะห์หลังจากการให้แรงสั่นด้วยเสียงเป็นเวลา 10 นาที (ง) อนุภาคที่สังเคราะห์หลังจากการให้แรงสั่นด้วยเสียงเป็นเวลา 20 นาที

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไปอนุภาคจะสามารถรวมตัวกันทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำอนุภาคมาให้แรงภายใต้การสั่นด้วยเสียงจะทำให้อนุภาคแตกออกเป็นขนาดเล็กอีกครั้ง

### 3.1.2.2. พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)







รูปที่ 3.3 EDS สเปกตรัมของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณธาตุต่างๆ ณ ตำแหน่งของอนุภาค

Element	Weight %	Atomic %
C	19.47	27.75
O	48.99	52.41
Na	16.24	12.09
Mg	3.18	2.24
Cl	5.99	2.89
K	0.54	0.24
Ca	5.59	2.39

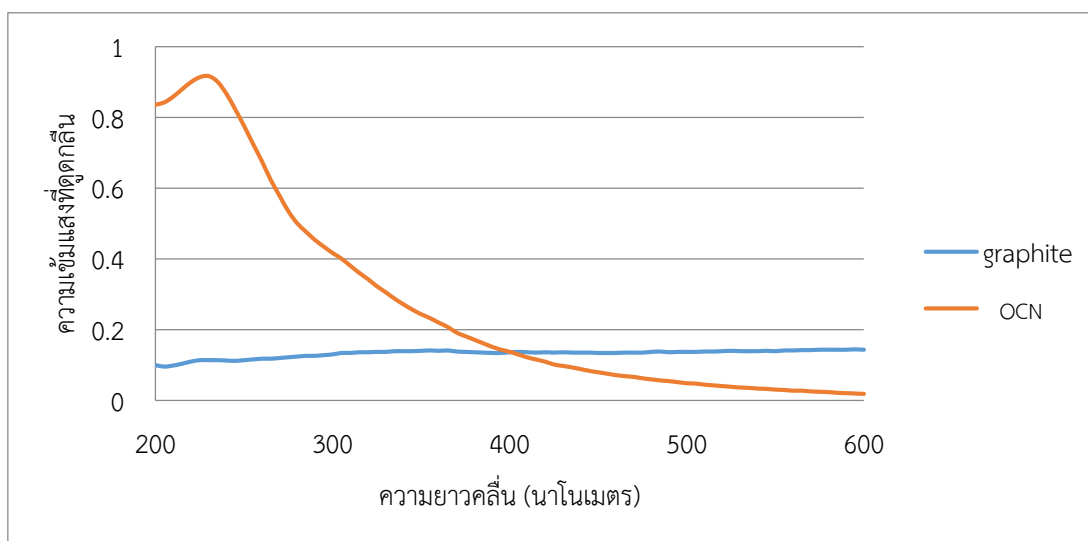
จากผลของ EDS จะเห็นว่าองค์ประกอบของอนุภาคทรงกลมที่ทำการวิเคราะห์มีปริมาณออกซิเจนมากถึง 48.99 % รองลงมาคือ คาร์บอน 19.47 % แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นประกอบไปด้วยธาตุออกซิเจนและคาร์บอนเป็นหลักซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของแกรไฟต์ได้เป็นแกรไฟท์ออกไซด์จริง และการที่มีปริมาณโซเดียมสูงเนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผู้วิจัยได้หยดตัวอย่างลงบนแผ่นกระจก ดังนั้นปริมาณโซเดียมที่ตรวจพบน่าจะมาจากกระจกหรือโซเดียมซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นเอง

อย่างไรก็ตามปริมาณธาตุที่วิเคราะห์ได้นี้เป็นองค์ประกอบที่บริเวณผิวของอนุภาคเท่านั้น จึงไม่ใช่อัตราส่วนที่แท้จริงของอนุภาค การที่มีปริมาณธาตุออกซิเจนสูงที่ผิวนี้ สอดคล้องกับความเป็นไปได้มากที่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ผิวด้านนอกจะมีมากกว่าภายในอนุภาค

### 3.1.2.3. วิเคราะห์ประมาณธาตุของอนุภาคด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุ CHN/O

จากผลการวิเคราะห์พบว่าอนุภาค OCN มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของปริมาณธาตุ คาร์บอน: ออกซิเจน: ไฮโดรเจน เป็น  $47.35 \pm 5.41: 42.56 \pm 2.52: 2.62 \pm 0.26$  หรือคิดเป็นอัตราส่วนโดยโมลเป็น  $1.0: 0.67: 0.66$  จะเห็นว่าอัตราส่วนของปริมาณธาตุคาร์บอนและออกซิเจนมีสูง แสดงถึงปริมาณคาร์บอนที่ถูกออกซิไดซ์มาก

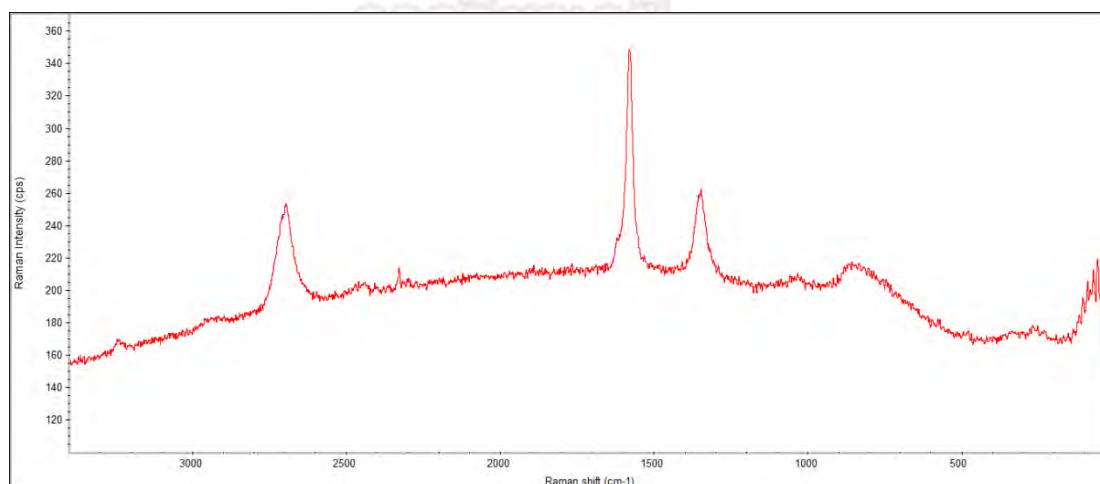
### 3.1.2.4. พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย UV-Visible Spectrometry



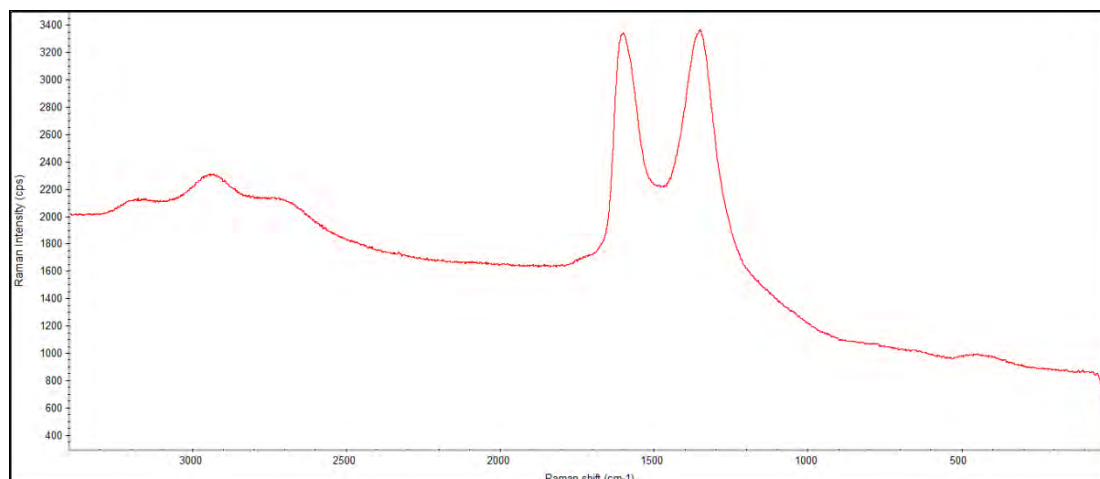
กราฟที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงที่ดูดกลืน (Absorbance) กับความยาวคลื่น (Wavelength) ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ (OCN) และแกรไฟต์

เนื่องจากแกรไฟต์ไม่กระจายตัวในน้ำทำให้ไม่สามารถวัดการดูดกลืนพลังงานที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ด้วยเครื่องมือที่มี ในขณะที่อนุภาคที่สังเคราะห์ได้สามารถกระจายตัวในน้ำ ทำให้สามารถดูดกลืนพลังงานในช่วง UV-visible ได้ (แม้ว่าอาจจะมึผลจากการกระเจิงของแสงบ้างแต่สามารถวัดได้) โดยพบสัญญาณการดูดกลืนมากที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 230 นาโนเมตร ซึ่งอธิบายได้จากการดูดกลืนแสงจากการเปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนในระบบ  $\pi$ - $\pi$  conjugation ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Arayachukeat<sup>11</sup>

### 3.1.2.5. พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย Raman spectroscopy



กราฟที่ 3.2 แสดงผล Raman Spectrum ของแกรไฟต์



กราฟที่ 3.3 Raman Spectrum ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้

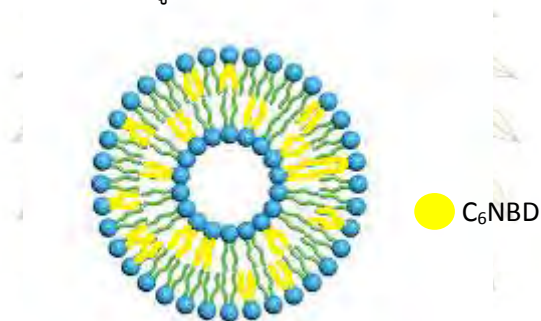
จาก Raman Spectrum จะเห็นว่าสารทั้งสองชนิดขึ้นพีคที่ตำแหน่ง chemical shift  $1350\text{ cm}^{-1}$  และ  $1600\text{ cm}^{-1}$  เหมือนกัน ซึ่งแสดงลักษณะของ D band และ G band ตามลำดับ โดย D Band คือผลจากการ vibrational ของคาร์บอนอะตอมที่มีไฮบริดเซชันแบบ  $sp^2$  ที่บิดเบี้ยวและ G Band คือพีคที่แสดง stretching vibrations ของอะตอมคาร์บอนที่มีไฮบริดเซชันแบบ  $sp^2$  แต่จะสังเกตได้ว่า ความเข้มสัญญาณ D band ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อแกรไฟต์ถูกออกซิไดซ์เป็นแกรไฟท์ออกไซด์ ทำให้ในแต่ละระนาบของแกรไฟท์มีออกซิเจน หมู่แอลกอฮอล์ หรือหมู่คาร์บอกซิลิก เข้าไปแทรกในโครงสร้างของคาร์บอน ทำให้รูปร่างไฮบริดเซชันของอะตอมคาร์บอนผิดเพี้ยนไป การที่ความเข้มสัญญาณของ D band เพิ่มมากขึ้นนั้นย่อมแสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้น่าจะถูกออกซิไดซ์จนเกิดเป็นสารใหม่เปลี่ยนแปลงไปจากสารเดิม

### 3.2 ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาคออกซิไดส์คาร์บอนระดับนาโน (OCN)

#### 3.2.1. ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง Liposome- $C_6$ NBD กับ OCN-DMPE ด้วยเทคนิค Förster resonance energy transfer (FRET) ที่เวลาต่างๆ

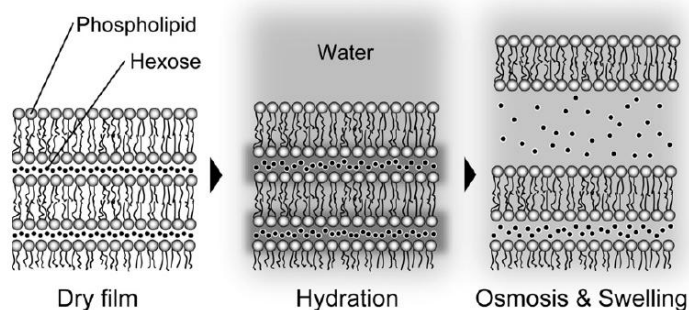
เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างอนุภาค OCN กับเยื่อไขมันสองชั้น ผู้วิจัยได้เลือกใช้เทคนิค Förster resonance energy transfer (FRET) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการศึกษาการเข้าใกล้กันของตัวรับพลังงานและตัวให้พลังงาน ใช้หลักในการถ่ายโอนพลังงานระหว่างโมเลกุลที่มีสีย้อม 2 ชนิดคือ ตัวให้พลังงาน (Donor Species) และตัวรับพลังงาน (Acceptor Species) ในระยะห่างไม่เกิน 10 นาโนเมตร<sup>18</sup> โดยพลังงานกระตุ้นของตัวให้พลังงานจะถูกถ่ายโอนไปยังตัวรับพลังงานด้วยอันตรกิริยาคู่เหนี่ยวนำ-คู่เหนี่ยวนำ (Induced dipole – Induced dipole Interaction) โดยคู่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของความเข้มสัญญาณการเรืองแสงของสีย้อมทั้ง 2 ชนิด กล่าวคือตัวให้พลังงานจะมีความเข้มสัญญาณลดลง เรียกว่า Quenching และความเข้มสัญญาณการเรืองแสงของตัวรับพลังงานจะเพิ่มมากขึ้น เรียกว่า Enhancing

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกเตรียมไลโปโซมเพื่อใช้ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างอนุภาค OCN กับเยื่อไขมันสองชั้น เนื่องจากไลโปโซมเป็นอนุภาคที่มีลักษณะเป็นถุงกลม ๆ ของสารไขมันชนิดแอมฟิพาติก (amphipathic) กล่าวคือมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยงานวิจัยในส่วนนี้ผู้วิจัยเตรียมไลโปโซมด้วยวิธีไฮเดรชัน<sup>20</sup> โดยใช้ Egg PC หรือ ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ที่แยกได้จากไข่แดง ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็น L- $\alpha$ -phosphatidylcholine เมื่อ Egg PC กระจายตัวอยู่ในน้ำ Egg PC จะเกิดการเรียงตัวเอาส่วนที่มีขั้ว (ส่วนที่ชอบน้ำ) เข้าหากันและส่วนไม่มีขั้ว (ไม่ชอบน้ำ) หันเข้าหาตัวมันเองเกิดเป็นไลโปโซม โดยจะอยู่ในลักษณะของการเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลไขมันซ้อนกันสองชั้น (เยื่อไขมันสองชั้น) และใช้ N-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-phytosphingosine (C<sub>6</sub>NBD) เป็นตัวให้พลังงาน C<sub>6</sub>NBD เป็นกรดไขมันที่มีการติดสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ตรงสายไฮโดรคาร์บอน มีความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 470 นาโนเมตรและคายพลังงานที่มีความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เมื่อผสม C<sub>6</sub>NBD กับ Egg PC จะเกิดการจัดเรียงตัวเกิดเป็นไลโปโซมที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในเยื่อไขมันสองชั้นในลักษณะดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 แบบจำลองไลโปโซมที่เกิดจากการติดสีฟลูออเรสเซนต์ไว้ภายในเยื่อไขมันสองชั้น

ไลโปโซมที่เกิดขึ้นจะมีทั้งที่เป็นเยื่อไขมันสองชั้นเพียงชั้นเดียวหรือ Unilamellar bilayer vesicles (ULVs) และ หลายๆชั้นหรือ Multilamellar bilayer vesicles (MLVs) แต่ผู้วิจัยได้เติมกลูโคสลงไประหว่างการฟิล์มบาง กลูโคสที่ใส่ไปจะไปทำหน้าที่เคลือบบน lipid bilayer แต่ละชั้น เมื่อทำการเติมน้ำลงไป (hydration) น้ำปริมาณมากจะสามารถซึมผ่านระหว่าง Lipid bilayer ในแต่ละชั้น ทำให้ระยะทางระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นแต่ละชั้นเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย จนเกิดเป็นไลโปโซมที่มีลักษณะเป็น Unilamellar bilayer vesicles<sup>20</sup>

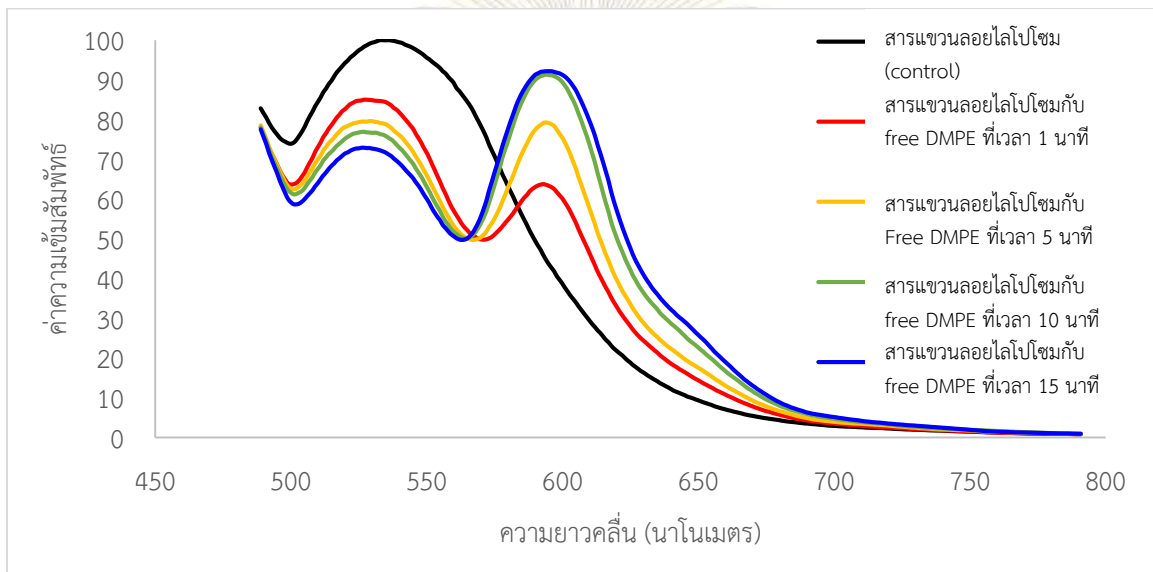


รูปที่ 3.5 การบวมตัวของเยื่อไขมันสองชั้นที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในตัวกลางที่เป็นน้ำจากวิธีการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธีไฮเดรชัน<sup>20</sup>

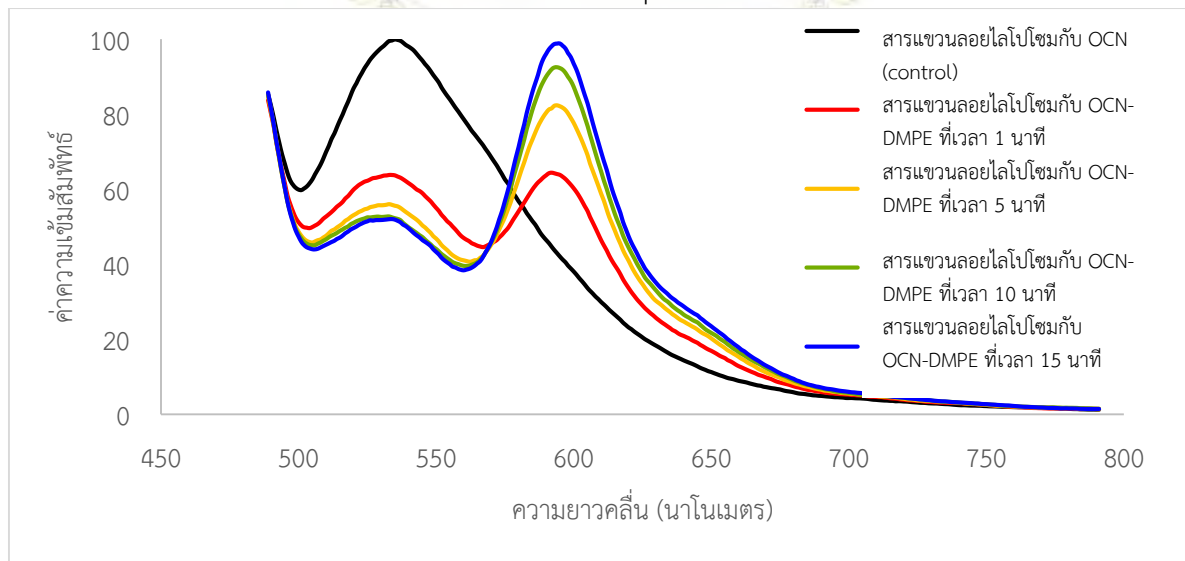


ผู้วิจัยเลือกใช้ 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DMPE-RhB) เป็นตัวรับพลังงาน<sup>14</sup> ซึ่งมีความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 550 นาโนเมตรและคายพลังงานที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยบรรจุตัวรับพลังงานไว้บนอนุภาคที่อัตราส่วนระหว่างอนุภาคต่อตัวรับพลังงานเป็น  $1 : 3.84 \times 10^{-4}$  โดยน้ำหนัก

งานวิจัยในส่วนนี้ผู้วิจัยได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการเรืองแสงของไลโปโซมที่ถูกติดสีด้วย C<sub>6</sub>NBD (Liposome-C<sub>6</sub>NBD) ที่ผสมกับตัวรับพลังงานอิสระ (free DMPE) หรือ อนุภาคที่บรรจุตัวรับพลังงาน (OCN-DMPE) ด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นกระตุ้น 470 นาโนเมตร และมีช่วงการศึกษาค่าตั้งแต่ 480-800 นาโนเมตร เป็นเวลา 15 นาทีได้ผลดังนี้



กราฟที่ 3.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสัมพัทธ์ (Relative Intensity) ของสารแขวนลอยไลโปโซมผสมสารละลาย DMPE (free DMPE) กับความยาวคลื่นที่เวลาต่างๆ

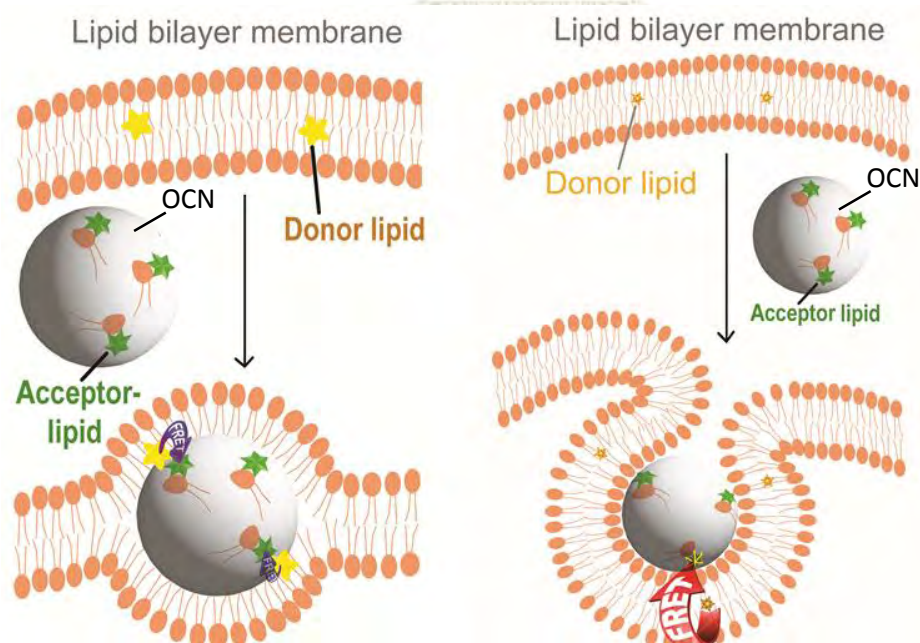


กราฟที่ 3.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสัมพัทธ์ (Relative Intensity) ของสารแขวนลอยไลโปโซมผสมอนุภาคที่บรรจุ DMPE-RhB (OCN-DMPE) กับความยาวคลื่นที่เวลาต่างๆ



จากกราฟที่ 3.4 และ 3.5 (โดยเส้นสีแดง สีส้ม สีเขียวและสีน้ำเงิน แสดงถึงระยะเวลาที่ผ่านไป 1, 5, 10 และ 15 นาทีตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงที่ตำแหน่ง 530 นาโนเมตรลดลงและพบสัญญาณการเรืองแสงที่ตำแหน่ง 600 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสัญญาณการคายพลังงานของ  $C_6NBD$  (ตัวให้พลังงาน) และ DMPE (ตัวรับพลังงาน) ตามลำดับ กล่าวคือเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร สารละลายผสมระหว่าง Liposome-  $C_6NBD$  กับ ตัวรับพลังงานอิสระ (free DMPE) มีความเข้มสัมพัทธ์ของสัญญาณลดลงเหลือ 72.16 ในขณะที่สารละลายที่ผสมด้วยตัวรับพลังงานบนอนุภาค (OCN-DMPE) มีความเข้มของสัญญาณเหลือ 51.54 และในทิศทางเดียวกันที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบความเข้มของสัญญาณสารละลายที่ผสมด้วย free DMPE และ OCN-DMPE เป็น 91.98 และ 97.32 ตามลำดับ เนื่องจากเมื่อให้พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร  $C_6NBD$  จะคายพลังงานที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรซึ่งเป็นพลังงานที่เหมาะสมในการกระตุ้น DMPE ให้คายพลังงานออกมาที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วย nonradiative long-range dipole-dipole coupling mechanism<sup>18</sup> จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า DMPE น่าจะสามารถเข้าไปใกล้  $C_6NBD$  ที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นในระยะทางที่ใกล้กันมากพอที่ทำให้เกิดการถ่ายโอนพลังงานระหว่างกันได้ DMPE-RhB ที่อยู่กับอนุภาค OCN มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มสัญญาณของทั้ง 2 ตำแหน่งมากกว่าและเร็วกว่า DMPE อิสระอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า อนุภาค OCN ที่บรรจุ DMPE-RhB สามารถพา DMPE-RhB เข้าไปใกล้ไลโปโซมที่มี  $C_6NBD$  ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการเข้าไปใกล้ของ DMPE อิสระ

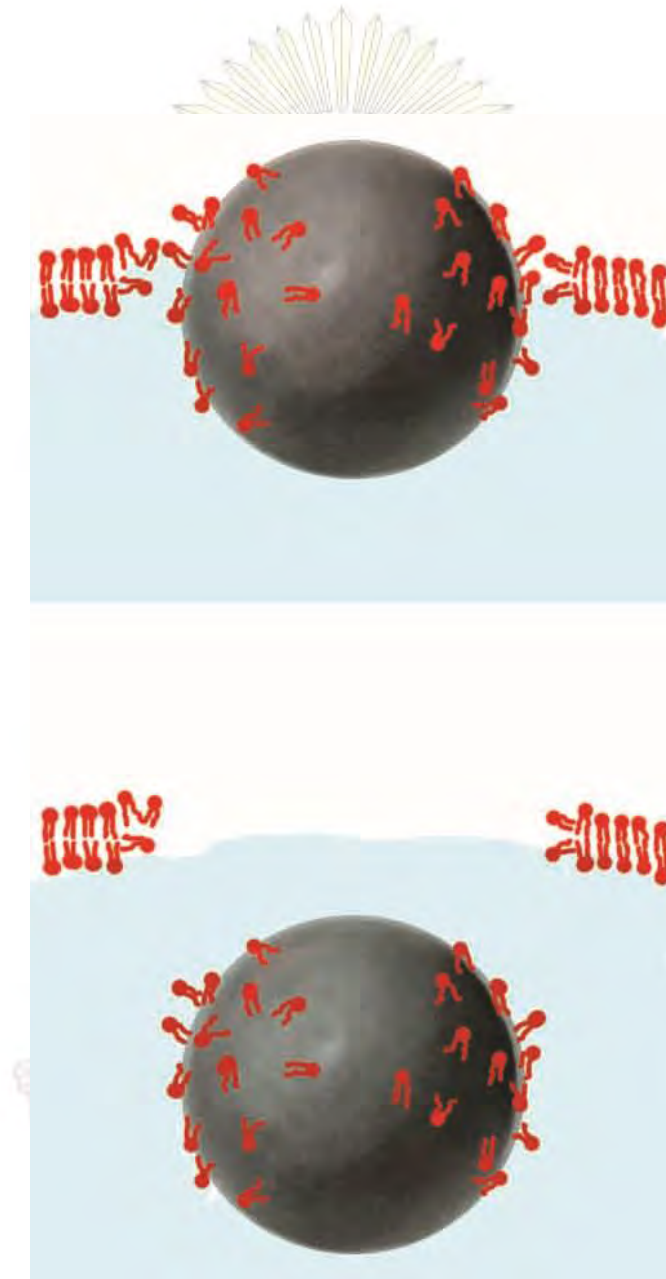
จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยคาดว่าอนุภาค OCN น่าจะพาตัวรับพลังงานเข้าสู่ไลโปโซมได้ 2 วิธีคือการแทรกผ่านเยื่อไขมันสองชั้นหรือเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีเอนโดไซโทซิส เนื่องจาก ตัวให้พลังงานที่แทรกอยู่ภายในระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นจะสามารถเกิดการถ่ายโอนพลังงานได้นั้นตัวรับพลังงานและตัวให้พลังงานจะต้องอยู่ในระยะห่างที่น้อยกว่า 10 นาโนเมตร ดังรูป



รูปที่ 3.6 แบบจำลองการถ่ายโอนพลังงานที่คาดว่าจะเกิดขึ้นระหว่าง  $C_6NBD$  (ตัวให้พลังงาน) สู่ DMPE-RhB (ตัวรับพลังงาน) โดยการพาตัวรับพลังงานเข้าสู่ไลโปโซมด้วยการแทรกผ่านเยื่อไขมันสองชั้น (ภาพซ้าย) หรือพาตัวรับพลังงานเข้าสู่ไลโปโซมด้วยการเกิดเอนโดไซโทซิส (ภาพขวา)

### 3.2.2 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซม

เพื่อเป็นการระบุสมมติฐานของแบบจำลองการเกิดอันตรกิริยากับไลโปโซมของอนุภาค OCN รวมทั้งตรวจสอบว่า OCN สามารถทำให้ไลโปโซมรั่วได้หรือไม่ โดยมีสมมติฐานว่าหากการ quench ในการทดลอง FRET ด้านบนเกิดตามรูปที่ 3.6 โอกาสที่ไลโปโซมจะรั่วดังรูปที่ 3.7 จะเป็นไปได้สูงมาก



รูปที่ 3.7 แบบจำลองการมีรูรั่วนเยื่อไขมันสองชั้นของไลโปโซม

ดังนั้นผู้วิจัยจึงออกแบบการทดลองโดยเตรียมไลโปโซมด้วยวิธี Electroformation<sup>13</sup> และวางแผนการทดลองดังนี้



รูปที่ 3.8 แผนการทดลองการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมภายใต้กล้อง fluorescence microscope (phase contrast mode)

ในภาพ ก จะเห็นว่าสีของไลโปโซมและสีของสารละลายตัวกลาง (medium) เป็นสีเดียวกัน เมื่อเติมสารละลายกลูโคสลงไป สารละลายกลูโคสจะเจือจางสารละลายตัวกลางทำให้สารละลายตัวกลางมีสีอ่อนลง โดยสารละลายกลูโคสจะไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อไขมัน 2 ชั้นเข้าไปด้านในของไลโปโซมได้ทำให้ไลโปโซมยังคงเป็นสีเดิม ดังรูป ข จากนั้นเติมส่วนของเหลวของอนุภาค OCN ลงไป ถ้าอนุภาค OCN สามารถสร้างรูรั่วบนเยื่อไขมันสองชั้นได้จริงดังแบบจำลองที่กล่าวมาข้างต้น (รูปที่ 3.7) สารละลายภายในไลโปโซมและสารละลายภายนอก (สารละลายตัวกลาง) จะเกิดการแพร่ไปหากันได้ จนกระทั่งเกิดความสมดุล สีของสารละลายภายในไลโปโซมและสารละลายภายนอกไลโปโซมจะปรากฏเป็นสีเดียวกันดังภาพ ค จะเป็นการยืนยันว่าอนุภาค OCN สร้างรูรั่วบนเยื่อไขมันสองชั้นจริง

### 3.2.2.1. การเตรียมไลโปโซมเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธี Electroformation<sup>13</sup>

วิธี Electroformation เป็นวิธีที่จะใช้เตรียมไลโปโซมประเภท unilamellar bilayer vesicles ขนาดตั้งแต่ 10-100 ไมโครเมตร ซึ่งถือว่าเป็นไลโปโซมขนาดใหญ่ (Giant liposome) ในงานวิจัยนี้ใช้ Indium Tin Oxide (ITO) ทั้งสองแผ่นเป็นอิเล็กโทรดซึ่งระหว่างอิเล็กโทรดจะถูกขึ้นด้วย Silicon chamber โดยฟิล์มไขมันจะอยู่บนขั้ว ITO ของอิเล็กโทรดแผ่นใดแผ่นหนึ่ง ทำการฉีดสารละลายซูโครสซึ่งเป็นสารละลายตัวกลาง (Medium) แล้วให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าไปที่ขั้ว ITO อิเล็กโทรด กระแสไฟฟ้าภายนอกนี้จะทำให้เกิด Electroosmotic vibration ของสารละลายตัวกลาง ส่งผลให้ฟิล์มไขมันเกิดการบวมแล้วพองตัวเป็นไลโปโซม ดังรูปที่ 3.9

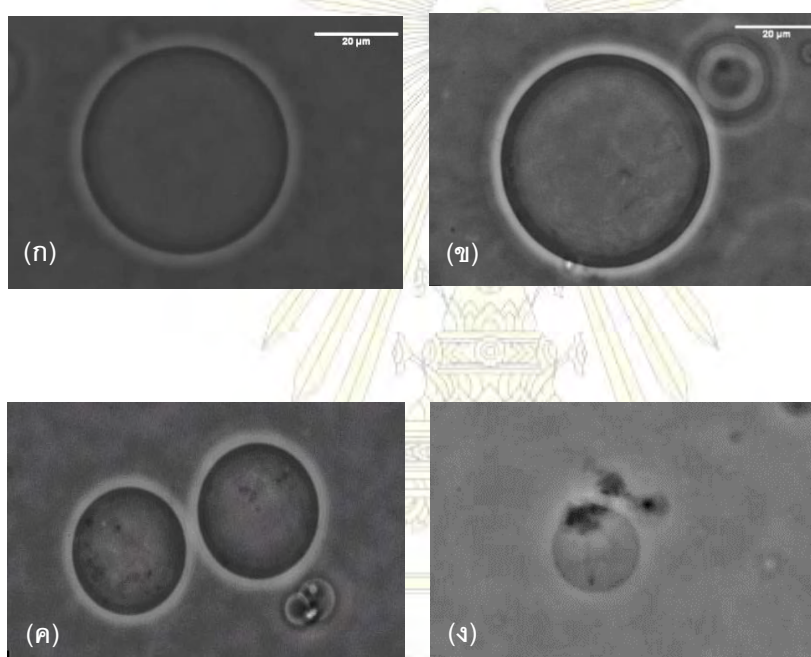


รูปที่ 3.9 ภาพถ่ายจากกล้อง fluorescence microscope ของไลโปโซมที่มีขนาดประมาณ 40 ไมโครเมตร ในตัวกลางที่เป็นสารละลายซูโครส

### 3.2.2.2. การวิเคราะห์โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมด้วยเทคนิคทาง microscopy

- สังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมด้วยกล้อง Fluorescence microscope (phase contrast mode)

ในส่วนนี้ผู้วิจัยได้ผสมสารละลายกลูโคสลงไปด้วย เนื่องจากความหนาแน่นของกลูโคสน้อยกว่าซูโครส สารละลายกลูโคสจะไปเจือจางสารละลายซูโครสที่เป็นตัวกลางทำให้มีสีอ่อนลง ส่วนโครงสร้างของไลโปโซมเป็นถุงไขมัน สารละลายกลูโคสจะไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อไขมัน 2 ชั้นเข้าไปด้านในของไลโปโซมได้ทำให้ไลโปโซมยังคงเป็นสีเดิม ส่งผลให้เวลาสังเกตภายใต้กล้อง fluorescence microscope (phase contrast mode) จะเห็นเป็นไลโปโซมสีเข้มกว่าสีของสารละลายตัวกลาง



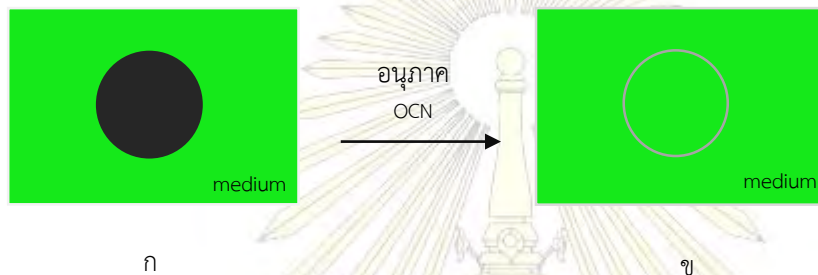
รูปที่ 3.10 ภาพจากกล้อง fluorescence microscope (ก) ไลโปโซมในสารละลายอ้างอิงที่ 0 นาที (ข) ไลโปโซมในสารละลายอ้างอิงที่ 60 นาที (ค) ไลโปโซมและอนุภาค OCN ในสารละลายวิเคราะห์ที่ 0 นาที (ง) ไลโปโซมและอนุภาค OCN ในสารละลายวิเคราะห์ที่ 60 นาที

ผลการสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมใต้กล้อง fluorescence microscope ในรูปที่ 3.10 จะได้ว่า เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ไลโปโซมในสารละลายอ้างอิง (ข) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี แต่จะเห็นว่าในสารละลายวิเคราะห์ที่มีสารละลาย OCN ผสมอยู่ เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที สีของไลโปโซมจางลงจนเป็นสีเดียวกับสารละลายตัวกลาง ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายภายในและภายนอกไลโปโซมเกิดการแลกเปลี่ยนกัน แสดงให้เห็นว่าอนุภาค OCN น่าจะสร้างรูรั่วบนเยื่อไขมันสองชั้น



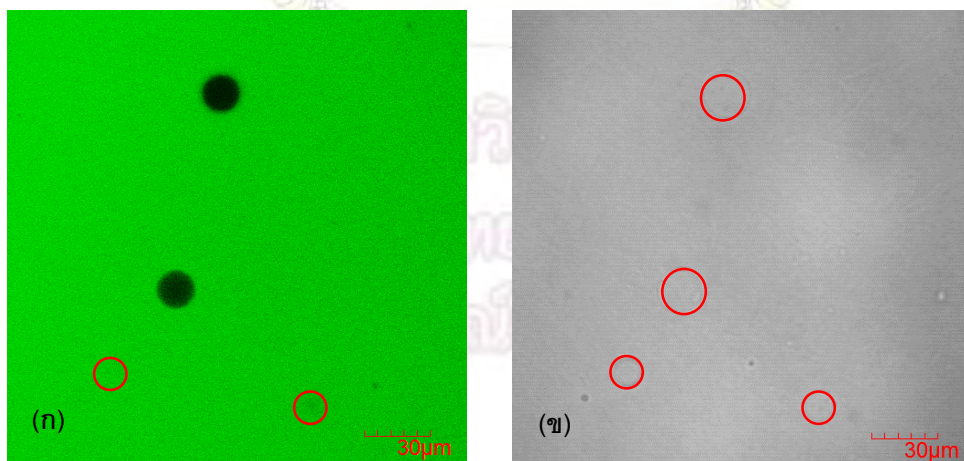
- สังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมด้วยกล้อง Confocal laser scanning microscope : fluorescence mode

เพื่อให้การสังเกตการรั่วของไลโปโซมทำได้ง่ายขึ้น ผู้วิจัยจึงออกแบบการทดลองให้เฉพาะสารละลายตัวกลางเป็นสีย้อมของ Calcein fluorescent dye เมื่อนำไปส่องด้วยกล้อง Confocal laser scanning microscope จะทำให้มองเห็นว่าสีของสารละลายตัวกลางเป็นสีเขียว ส่วนสีของไลโปโซมจะเป็นสีดำ ดังแสดงในภาพ ก และเมื่อเติมส่วนของเหลวของอนุภาค OCN ลงไปในสารละลาย ถ้าอนุภาค OCN สามารถสร้างรูรั่วบนเยื่อไขมันได้จริง สารละลายตัวกลางที่เป็นสีเขียวจะแพร่เข้าไปด้านในไลโปโซมได้จนสีของไลโปโซมกลายเป็นสีเขียว ดังภาพ ข



รูปที่ 3.11 แผนการทดลองการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมภายใต้กล้อง confocal laser scanning microscope

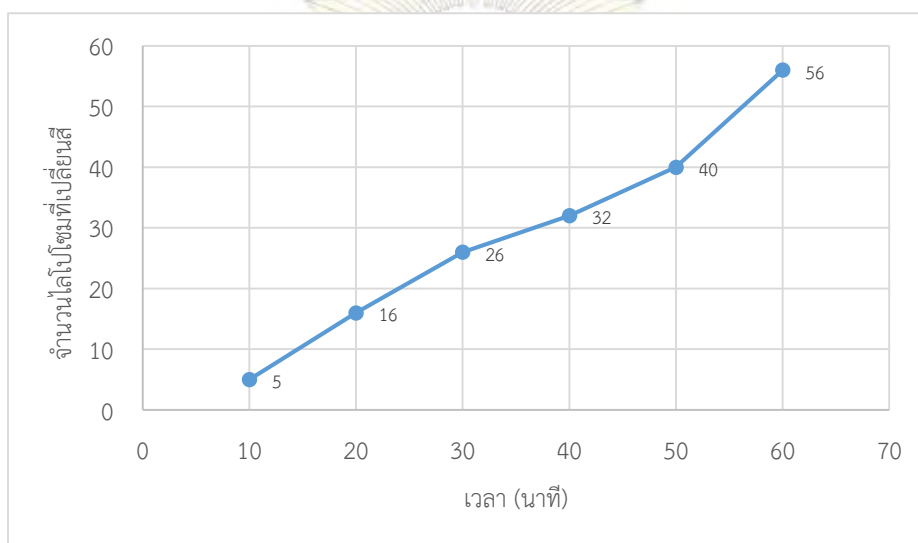
ผลการสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมใต้กล้อง confocal laser scanning microscope ในรูปที่ 3.12 จะเห็นได้ว่า ทั้งภาพ (ก) และ (ข) คือภาพเดียวกันแต่ใช้ Mode ต่างกัน ไลโปโซมในภาพ (ก) ได้เปลี่ยนสีไปเป็นสีเขียว เนื่องจาก สารละลาย Calcein ได้แพร่เข้าไปด้านในไลโปโซม



รูปที่ 3.12 ภาพจากกล้อง Confocal laser scanning microscope (ก) ภาพจาก Fluorescence mode เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที (ข) ภาพจาก Phase contrast mode เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที

จากผลดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า อนุภาค OCN น่าจะไปสร้างรูรั่วบนเยื่อไขมันของไลโปโซม ทำให้สารละลายภายในไลโปโซมเกิดการแลกเปลี่ยนกับสารละลายภายนอก (สารละลายตัวกลาง) จนเกิดความสมดุล สีของสารละลายในและนอกไลโปโซมจึงปรากฏเป็นสีเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก บนพื้นผิวอนุภาค OCN มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายทั้งพวกคาร์บอนิล, แอลกอฮอล์ จึงทำให้มีความสามารถในการดูดซับสารต่างๆไว้บนอนุภาคได้ เมื่ออนุภาค OCN เคลื่อนที่ไปใกล้ไลโปโซมมาก ไขมันที่เป็นโครงสร้างหลักของไลโปโซมจึงหลุดออกและถูกดูดซับไว้บนอนุภาค OCN จนทำให้เกิดรูรั่วบนเยื่อไขมันสองชั้น (รูปที่ 3.7)

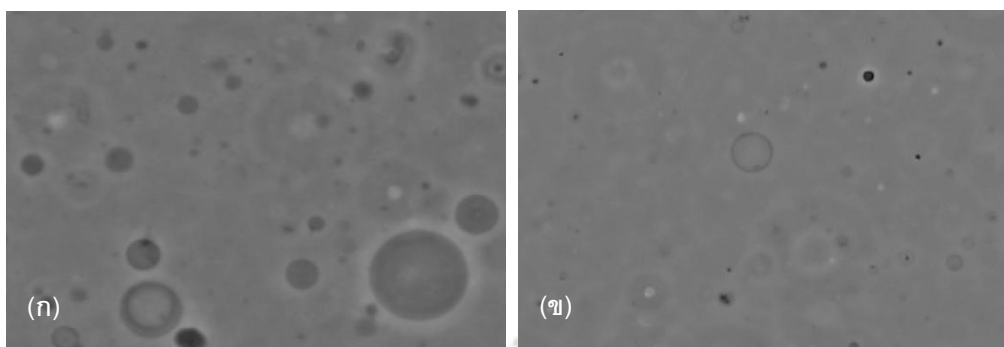
และเมื่อนับจำนวนไลโปโซมที่มีขนาด 5 – 30  $\mu\text{m}$  ที่เปลี่ยนสีเทียบกับเวลาจะเห็นได้ว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจำนวนไลโปโซมที่เปลี่ยนสีไปก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน



กราฟที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไลโปโซมที่เปลี่ยนสีเทียบกับเวลา

จากการนับจำนวนไลโปโซมที่เปลี่ยนสี แสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาผ่านไปอนุภาค OCN มีความสามารถในการเข้าสู่ไลโปโซมได้มากขึ้นเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้เมื่อนำสารแขวนลอยของไลโปโซมที่มีการเติม OCN และ ตั้งทิ้งไว้ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มาส่องด้วยกล้อง fluorescence microscope (phase contrast mode) อีกครั้ง จะเห็นได้ว่าไลโปโซมมีขนาดเล็กลงและจำนวนลดน้อยลง ดังรูปที่ 3.13

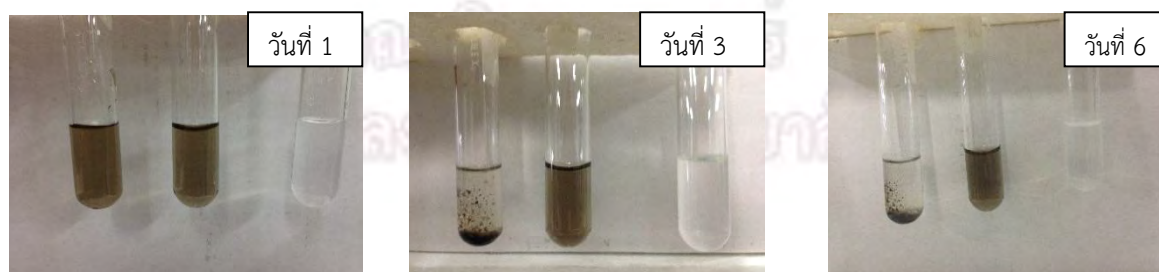


รูปที่ 3.13 ภาพจากกล้อง fluorescence microscope (ก) สารละลายวิเคราะห์ (สารแขวนลอยไลโปโซมผสมกับ ส่วนของเหลวของอนุภาค OCN) (ข) สารแขวนลอยไลโปโซม ที่ตั้งทิ้งไว้ 7 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก อนุภาค OCN มีความสามารถในการดูดซับสารต่างๆ เมื่อ อนุภาค OCN สร้างรูบนเยื่อ ไขมันสองชั้นบนไลโปโซมแล้ว เยื่อไขมันที่อยู่บริเวณส่วนที่เกิดรูจะหลุดออกจากโครงสร้างของไลโปโซมและถูกดูดซับ ไว้บนอนุภาค OCN เมื่อเวลาผ่านไปเยื่อไขมันถูกดูดซับไว้บนอนุภาค OCN มีมากขึ้น โครงสร้างไลโปโซมจึงไม่เสถียร และถูกทำลายไปในที่สุด

### 3.2.3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารแขวนลอยไลโปโซมกับส่วนของเหลวของอนุภาค OCN จากการ สังเกตด้วยตาเปล่า

เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสารละลายทั้ง 3 หลอดคือ สารละลายผสมระหว่างไลโปโซมกับอนุภาค OCN สารละลายผสมระหว่างน้ำกับอนุภาค OCN และสารละลายผสมระหว่างน้ำกับไลโปโซม เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 6 วันที่อุณหภูมิห้อง เพื่อพิสูจน์ว่า เมื่อเวลาผ่านไปอนุภาค OCN ทำลายไลโปโซมจริง โดยพบว่า ในวันที่ 3 ของการทดลองเกิดการตกตะกอนที่มีลักษณะดำขุ่นซึ่งคาดว่าเป็นไลโปโซมที่ถูกทำลายด้วยอนุภาค OCN จนเสื่อมสภาพ และเนื่องจากอนุภาค OCN มีความสามารถในการดูดซับสูงจึงทำให้ดูดซับตะกอนของไลโปโซมที่ เสื่อมสภาพไว้ จึงทำให้ตะกอนที่เกิดขึ้นมีสีดำ ดังแสดงในรูปที่ 3.14



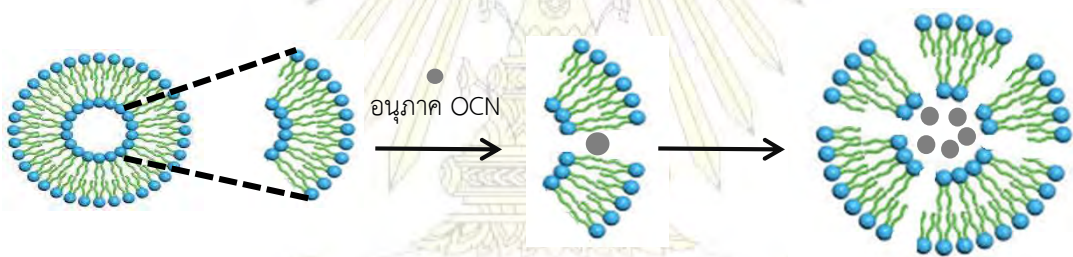
รูปที่ 3.14 การเปลี่ยนแปลงของสารละลายทั้ง 3 หลอดคือ สารละลายผสมระหว่างไลโปโซมกับอนุภาค OCN สารละลายผสมระหว่างน้ำกับ OCN และสารละลายผสมระหว่างไลโปโซมกับน้ำ เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ เป็น เวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

#### จากผลการทดลองสรุปได้ว่า

1. สามารถสังเคราะห์อนุภาค OCN จากแกรไฟต์ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาด  $37.7 \pm 4.6$  นาโนเมตร
2. จากการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นกับอนุภาค OCN โดยวิธี Förster resonance energy transfer (FRET) การสังเกตการเปลี่ยนสีของไลโปโซมภายใต้กล้อง fluorescence microscope และ confocal laser scanning microscope และการสังเกตด้วยตาเปล่า คาดว่า อนุภาค OCN น่าจะสร้างรูรั่วบนเยื่อไขมันสองชั้น
3. คาดว่าแบบจำลองกลไกการเข้าสู่ไลโปโซมของอนุภาค OCN น่าจะมีลักษณะดังรูปที่ 4.1



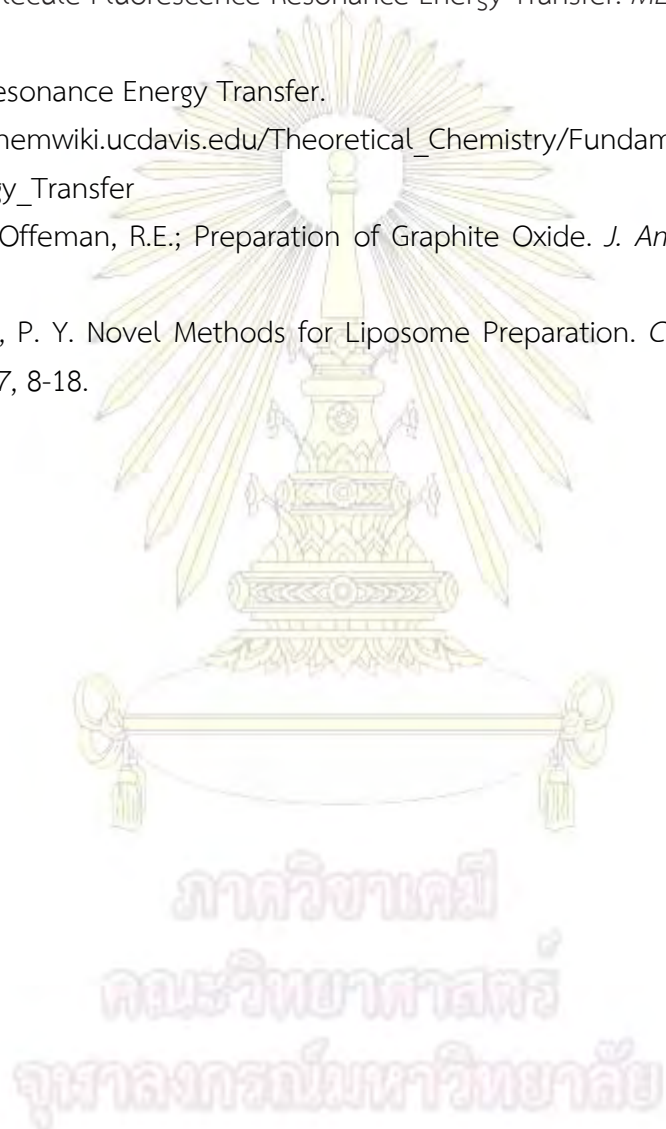
รูปที่ 4.1 แบบจำลองกลไกการเข้าสู่ไลโปโซมของอนุภาค OCN โดยอนุภาค OCN น่าจะเข้าไปใกล้ไลโปโซม และจุดซัพไขมันที่เป็นโครงสร้างหลักไว้บนอนุภาคจนเกิดเป็นรูรั่วบนเยื่อไขมันสองชั้น จากนั้นอนุภาค OCN จึงแทรกตัวผ่านรูรั่วเข้าสู่ไลโปโซมภายหลัง



### เอกสารอ้างอิง

1. Chadha, R.; Kapoor, VK.; Thakur, D.; Kuar, R.; Arora, P.; Jain, DVS. Drug Carrier Systems for Anticancer Agent: A Review. *JSIR*. **2010**, *67*, 185-197.
2. Caldorera-Moore, M.; Guimard, N.; Shi, L.; Roy, K. Designer nanoparticles: Incorporating Size, Shape and Triggered Release into Nanoscale Drug Carriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *7*(4), 479-495.
3. Verma, A.; Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small*. **2010**, *6*, 12-21.
4. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular Biology of the Cell. 4<sup>th</sup> ed. New York. Garland Science; **2002**.
5. K, Matsuzaki.; S, Yoneyama.; O, Murase.; K, Miyajima. Transbilayer Transport of Ions and Lipids Coupled with Mastoparan X Translocation. *Biochemistry*. **1996**, *35*, 8450–8456.
6. Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*. **2014**, *12*, 1-11.
7. Shimoni, O.; Yan, Y.; Wang, Y.; Caruso, F. Shape-Dependent Cellular Processing of Polyelectrolyte Capsules. *ACS nano*. **2013**, *7*, 522-530.
8. Hamada, T.; Morita, M.; Miyakawa, M.; Sugimoto, R.; Hatanaka, A.; Vestergaard, M. C.; Takagi, M. Size-Dependent Partitioning of Nano/Microparticles Mediated by Membrane Lateral Heterogeneity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13990–13996.
9. Schulz, M.; Olubummo, A.; Binder, W. H. Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes. *Soft Matter*. **2012**, *8*, 4849-4864.
10. Phospholipids.  
[Online]<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/biological-macromolecules-3/lipids-55/phospholipids-300-11433/> (accessed May 12, 2015).
11. Arayachukeat, S.; Palaga, T.; Wanichwecharungruang, P. S. Cluster of Carbon Nanospheres Derived from Graphene Oxide. *Appl. Mater. Interfaces*. **2012**, *4*, 6808-6815.
12. ธฤต สีนุเสกและ กิตติรัชต์ แสงรัตน์. การพัฒนาและสังเคราะห์ graphite oxide เพื่อใช้ในระบบส่งยา paclitaxel เข้าสู่เซลล์. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต. ภาควิชาเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2555
13. Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. Liposome Electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81*, 303-311.
14. Pornpattananangkul, D.; Fu, V.; Thamphiwatana, S.; Zhang, L.; Chen, M.; Vecchio, J.; Gao, W.; Huang, C.; Zhang, L. In Vivo Treatment of *Propionibacterium acnes* Infection with Liposome Lauric Acids. *Adv. Healthcare Mater.* **2013**, *2*, 1322-1328.

15. Swaay, D. V.; DeMello, A. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lap chip*. **2013**, *13*, 752-767.
16. K, Hiroshi.; S, Norio.; E, Kiyoslii.; M, Hiromi.; I, Yoshikazu.; K, Akira. Gene Delivery Using Liposome Technology. *Journal of Controlled Release*. **1999**, *62*, 269-277.
17. A, M. Theresa.; C, R. Pieter. Liposomal Drug Delivery Systems: Concept to Clinical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2013**, *65*, 36-48.
18. Ha, T. Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer. *METHOD*. **2001**, *25*(1), 78-86.
19. Fluorescence Resonance Energy Transfer.  
[Online][http://chemwiki.ucdavis.edu/Theoretical\\_Chemistry/Fundamentals/Fluorescence\\_Resonance\\_Energy\\_Transfer](http://chemwiki.ucdavis.edu/Theoretical_Chemistry/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer)
20. Hummer, W.S.; Offeman, R.E.; Preparation of Graphite Oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80* (6), 1339-1339.
21. Jadhav, S.; Patil, P. Y. Novel Methods for Liposome Preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2014**, *177*, 8-18.



## ประวัติผู้วิจัย

นางสาวกมลลักษณ์ สารสันติกุล เกิดเมื่อวันที่ 26 ตุลาคม พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์จากโรงเรียนจอมสุรางค์อุปถัมภ์ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 20/3 หมู่ 6 ตำบลพระขาว อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา รหัสไปรษณีย์ 13250 อีเมล Sath.kamonluck.chulalongkorn@gmail.com

นางสาวฐิติพร แสนสุรีย์รังสิกุล เกิดเมื่อวันที่ 2 พฤษภาคม พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์จากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 8/34 ซอยสวนสยาม 9 แยก 3 ถนนเสรีไทย แขวงคั่นนายาว เขตคั่นนายาว จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10230 อีเมล San.Titiporn.Chulalongkorn@gmail.com



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย