



การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่มีสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่มีสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง



โดย  
นางสาวศิริกัณฑ์พร น่วมคุณทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SELENIUM NANOPARTICLES  
FROM GARLIC EXTRACT WITH ANTI-CANCER PROPERTIES



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)

Department of BIOTECHNOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่มีสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง
โดย	นางสาวศิริกัณฑพร น่วมคุณทรัพย์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. นवलอนงค์ จิระกาญจนากิจ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย (ผู้รักษาการแทน)  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สาธิต นิรัตติชัย)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ชลเทพ อุตสาคร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(อาจารย์ ดร. นवलอนงค์ จิระกาญจนากิจ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ กิตตินิยม)

61401203 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : อนุภาคนาโนซีลีเนียม, สารสกัดกระเทียม, สารต้านมะเร็ง, ความเป็นพิษต่อเซลล์

นางสาว ศิริกันตพร น่วมคุณทรัพย์: การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียมที่มีสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์

สารสกัดกระเทียมมีสารที่เป็นตัวรีดิวซ์และตัวหุ้มสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมได้ แต่เป็นตัวรีดิวซ์ที่มีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ สามารถใช้ Ascorbic acid เสริมในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน  $Se^{4+}$  เป็น  $Se^0$  ให้เกิดอนุภาคนาโนสีส้มแดงแขวนลอยในสารละลาย การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะ การศึกษาในสภาวะต่างๆ คือ ช่วงเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ (24, 48 และ 72 h), ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (pH 6, pH 8 และ ไม่ปรับ pH) และสัดส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม (1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 และ 1:3:25) ซึ่งอนุภาคจากสภาวะต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้นำมาตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์มะเร็งตับ (HepG2), เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เทียบกับเซลล์ปกติจากปอด (MRC-5) ด้วยวิธี MTT assay และคำนวณค่า Selective index ในการประเมินการยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะจากผลพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคคือ 72 h ที่ให้ค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับ เท่ากับ  $155.79 \pm 21.15$  และ  $171.36 \pm 6.94$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และให้ค่า Selective index  $2.62 \pm 0.12$  และ  $2.45 \pm 0.18$  ตามลำดับ และอนุภาคที่สังเคราะห์ในสภาวะ ไม่ปรับ pH และ pH 6 ให้อนุภาคที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ไม่ทั้งสองชนิด ขณะที่สารสังเคราะห์ pH 8 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะ ส่วนการศึกษาอัตราส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม พบว่าสภาวะสังเคราะห์ที่ 1:3:25 ไม่ปรับ pH ในระยะเวลาสังเคราะห์ 72 h ให้ผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะและมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยให้ค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์ปกติ, เซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับ เท่ากับ  $417.04 \pm 15.51$ ,  $73.85 \pm 12.38$  และ  $32.83 \pm 5.22$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และมี Selective index ต่อ HepG2 และ HeLa เป็น  $12.93 \pm 1.90$  และ  $5.76 \pm 0.97$  ตามลำดับ ซึ่งเป็นสภาวะการสังเคราะห์ที่ผลฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด ค่า Selective index ของอนุภาคจากสภาวะนี้มีค่ามากกว่า Sodium selenite, Tamoxifen (TAM) และสารสกัดกระเทียม โดยสารละลายอนุภาคสีแดงคลุกดินแสงสูงสุดในช่วง 260-280 nm ด้วย UV -Vis spectrophotometer ผลจาก SEM และ EDS พบว่าอนุภาคมีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดประมาณ 1-20 nm และมีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบ การวิเคราะห์ด้วย FTIR พบ

กลุ่มฟังก์ชัน OH, C-H, C-O-H และ S=O มีส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม การวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วย Zeta potential พบว่าอนุภาคมีประจุเป็นลบ และให้ค่าศักย์ซีต้าเป็น  $-24.5 \pm 6.52$  mV และมีค่า PDI เท่ากับ 0.292 ซึ่งสามารถบอกได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมมีความเสถียรอยู่ในระดับปานกลาง (Moderately stable) มีกระจายตัวแบบ Monodispersed และสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคที่ใช้ 1:3:25 ไม่สามารถตรวจพบปริมาณตกค้างของ Sodium selenite ในสารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม แสดงถึงสารละลายน้ำทิ้งของปฏิกิริยามีสารตกค้างของซีลีเนียมในระดับที่ต่ำ ดังนั้นจึงเป็นสภาวะการสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีและมีมลพิษต่ำจาก Sodium selenite ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม



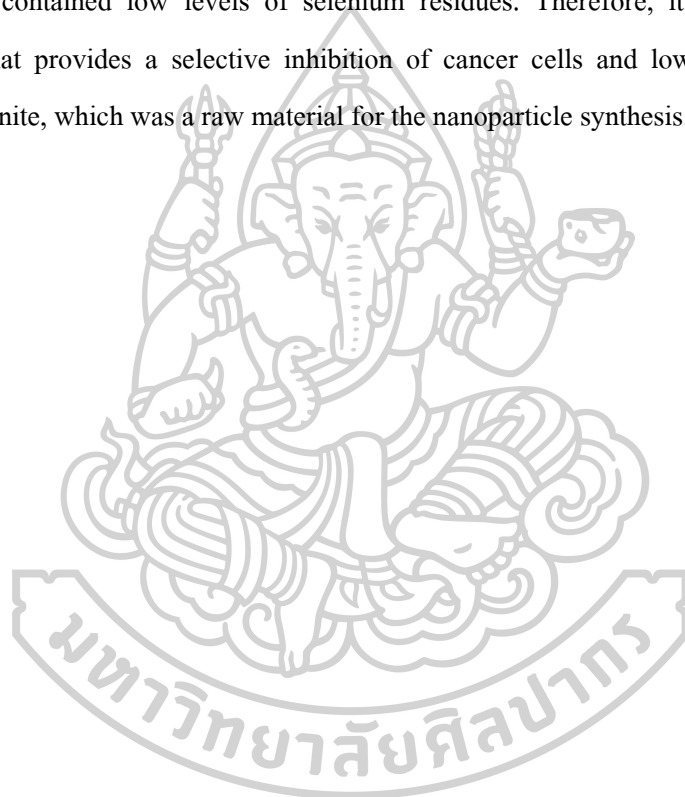
61401203 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Selenium nanoparticles, Garlic extract, Anti-cancer, Cytotoxicity

MISS SIRIKANTAPORN NUAMKHUNSAP : SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SELENIUM NANOPARTICLES FROM GARLIC EXTRACT WITH ANTI-CANCER PROPERTIES THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR KALYANEE JIRASRIPONGPUN

Garlic extract contains substances as reducing agents and capping agents for the synthesis of selenium nanoparticles (SeNPs), but with low reducing capacity. Ascorbic acid is normally used to stimulate the conversion of  $\text{Se}^{4+}$  to  $\text{Se}^0$ , giving orange-red particles suspended in the solution. Studies for synthesis condition of selenium nanoparticles with selectively cancer cells inhibition were performed under various conditions as reaction periods (24, 48 and 72 h), pH (pH 6, pH 8 and non adjust pH) and ratio of Sodium selenite : Ascorbic acid : Garlic extract (1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 and 1:3:25). The particles collected from each synthesis condition were tested for cancer cell inhibition using hepatocellular carcinoma (HepG2) and cervical cancer cells (HeLa) in comparison with lung normal cells (MRC-5), using MTT assay. The selective index were computed for selectively cancer cell inhibition assessment of the particles. Results revealed that optimal reaction period was 72 h, giving  $\text{IC}_{50}$  against HeLa and HepG2 at  $155.79 \pm 21.15$  and  $171.36 \pm 6.94$   $\mu\text{g/ml}$ , and provided selective index at  $2.62 \pm 0.12$  and  $2.45 \pm 0.18$  respectively. The particles synthesised under non-adjusted pH and pH 6 inhibited either HeLa and HepG2, while particles at pH 8 had no selective cancer cell inhibition activity. For the proportion of Sodium selenite: Ascorbic acid: Garlic extract used in the synthesis of selenium nanoparticles, It was found that the ratio of Sodium selenite: Ascorbic acid: Garlic extract at 1:3:25 with non-adjusted pH in the synthetic period of 72 h had a selective cancer cell inhibition with low cytotoxicity to normal cells. The  $\text{IC}_{50}$  of MRC-5, HeLa and HepG2 was  $417.04 \pm 15.51$ ,  $73.85 \pm 12.38$  and  $32.83 \pm 5.22$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively and giving selective index for HepG2 and HeLa at  $12.93 \pm 1.90$  and  $5.76 \pm 0.97$ , respectively, which was the best synthesis conditions. The selective index of particles from this synthesis condition was greater than Sodium selenite, Tamoxifen (TAM), and garlic extract. The orange-red color of the colloid solution from the synthesis exhibited the maximum absorbance in the range of 260-280 nm using a UV -Vis spectrophotometer. Results from SEM and EDS analysis revealed that the particles were spherical shape in the range of 1-20

nm, and were composed of selenium. The FTIR technique reported the functional groups including OH, C-H, C-O-H, and S=O. These functional groups were involved in the synthesis of selenium nanoparticles. The stability of the selenium nanoparticles was analyzed by Zeta potential. It was found that the zeta potential was  $-24.5 \pm 6.52$  mV and the PDI value was 0.292, which could indicate that the nanoparticles had a negative surface charge, moderate stable, and had monodispersed particles distribution. The analysis of Sodium selenite residues in the solution of selenium nanoparticle synthesis reaction was un-measurable. It indicated that the reaction wastewater contained low levels of selenium residues. Therefore, it is a suitable synthesis condition that provides a selective inhibition of cancer cells and low-level of pollutants from Sodium selenite, which was a raw material for the nanoparticle synthesis.





## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริพร พงศ์ทองผาสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือและแนะนำตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.ชลเทพ อุสาธุ ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์และขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ กิตตินิยม ที่กรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ร่วมถึงให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ออกมาสมบูรณ์

ขอขอบคุณบริษัทชาวละอองเฝ้าฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดกระเทียม สำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2565 ที่ช่วยสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และอำนวยความสะดวกในการดำเนินเอกสาร

ขอบคุณเพื่อน พี่และน้อง ในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ และสุดท้ายขอบคุณครอบครัวที่เป็นแรงสนับสนุนและกำลังใจเสมอมา

นางสาว ศิริกัณฑพร น่วมคุณทรัพย์



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญรูป .....	๗
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 .....	4
เอกสารที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1 ซิลิเนียม .....	4
2.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมด้วยสารสกัดพืช .....	5
2.2.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียม .....	7
2.2.1.1 ความเข้มข้นสารหุ้ม.....	7
2.2.1.2 pH.....	8
2.3 การศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนซิลิเนียม .....	10
2.3.1 สมบัติทางกายภาพ.....	10

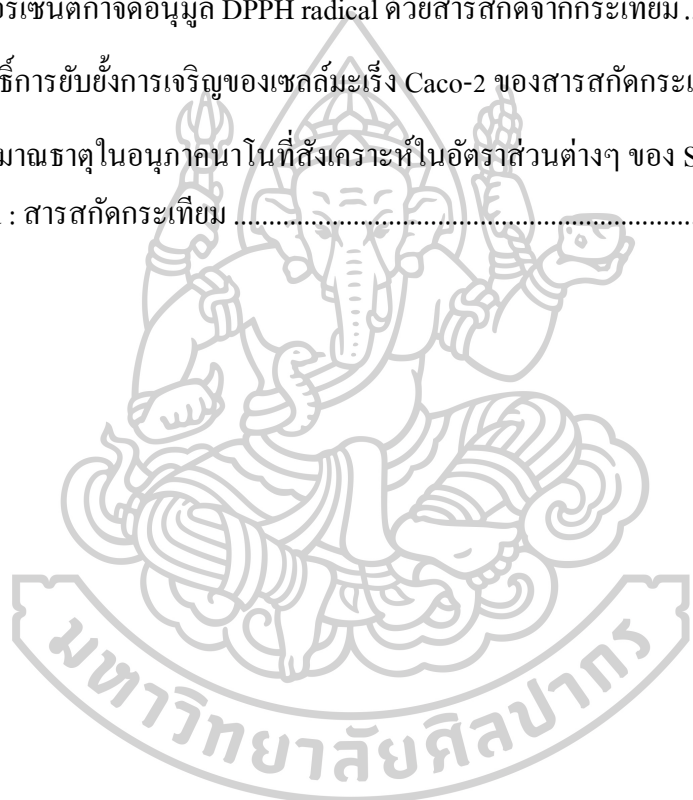
2.3.1.1	ค่าดูดกลืนแสง .....	10
2.3.1.2	สัณฐานของอนุภาคนาโนซีลีเนียม .....	13
2.3.1.3	ธาตุองค์ประกอบ.....	14
2.3.1.4	การเกิดปฏิสัมพันธ์ของธาตุโลหะและสารสกัดพืช .....	15
2.3.1.5	Zeta potential .....	17
2.3.2	สมบัติทางชีวภาพ .....	17
2.4	พืชที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
2.4.1	กระเทียม.....	24
2.5	ยาต้านมะเร็ง Tamoxifen.....	27
2.6	การวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียม.....	28
บทที่ 3	.....	30
วิธีการทดลอง	.....	30
3.1	วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	30
3.1.1	เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์.....	30
3.1.2	สารเคมี.....	31
3.1.3	พืชที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
3.1.4	Cell culture.....	32
3.2	การศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม.....	33
3.2.1	เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม .....	33
3.2.2	ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม .....	34
3.2.3	สัดส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ใช้ในการ สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม.....	34
3.3	ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของ Sodium selenite, Garlic extract, Tamoxifen และ อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (SeNPs-1:3:25) .....	35

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม .....	35
3.5.1 UV -Vis spectrophotometer .....	36
3.5.2 Scanning Electron Microscope (SEM).....	36
3.5.3 Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) .....	36
3.5.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	36
3.5.5 Zeta potential และวัดค่า PDI.....	37
3.6 วิเคราะห์ทางสถิติ.....	37
บทที่ 4 .....	38
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	38
4.1 เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม .....	38
4.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม .....	43
4.3 สัดส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม.....	45
4.4 ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของ Sodium selenite, Garlic extract, Tamoxifen และอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (SeNPs-1:3:25) .....	52
4.5 วิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมตกค้างในสารละลายจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม .....	56
บทที่ 5 .....	58
สรุปผลการทดลอง .....	58
รายการอ้างอิง .....	60
ภาคผนวก ก.....	69
วิธีการเตรียมสาร .....	69
ภาคผนวก ข.....	70
การวิเคราะห์ผลการทดลอง .....	70
ประวัติผู้เขียน .....	75

## สารบัญตาราง

### หน้า

ตารางที่ 1 อนุภาคนาโนโลหะ Ag, Zn, Cu และ Fe ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง HepG2, Caco และ T47D .....	19
ตารางที่ 2 ค่า PDI, Zeta potential ขนาด ความสามารถต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์	20
ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์กำจัดอนุมูล DPPH radical ด้วยสารสกัดจากกระเทียม .....	25
ตารางที่ 4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Caco-2 ของสารสกัดกระเทียมสายพันธุ์ต่าง ๆ	26
ตารางที่ 5 ปริมาณธาตุในอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม .....	49



## สารบัญรูป

### หน้า

รูปที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม .....	6
รูปที่ 2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนด้วย UV-VIS และขนาดอนุภาคของ PEC-SeNPs ที่อัตราส่วนการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน (1:40, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, และ 4:3).....	8
รูปที่ 3 UV-VIS spectra สำหรับอนุภาคนาโนเงินที่ปริมาตรสารสกัดมะขามป้อมต่างๆ .....	8
รูปที่ 4 UV-Vis spectra สำหรับอนุภาคนาโนเงินที่ pH ต่างๆ .....	9
รูปที่ 5 a) สีของสารละลายปฏิกิริยาเริ่มต้น b) สีของสารละลายอนุภาคนาโนซีลีเนียม c) สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม จากงานของ Anu et al. (2016) และ d) สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจากงานของ Ezhuthupurakkal et al. (2017).....	11
รูปที่ 6 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สัมพันธ์กับสีและขนาดอนุภาค .....	12
รูปที่ 7 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ช่วงเวลาต่างกัน .....	12
รูปที่ 8 ฐานวิทยาของอนุภาคจากการส่องด้วยกล้อง SEM.....	13
รูปที่ 9 ลักษณะของอนุภาคนาโนที่วิเคราะห์ด้วย TEM.....	14
รูปที่ 10 สเปกตรัม EDAX ของอนุภาคที่สังเคราะห์.....	15
รูปที่ 11 FTIR spectra, a) สารสกัดกระเทียม b) อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ .....	16
รูปที่ 12 ประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมต่อความมีชีวิตของเซลล์ HeLa .....	27
รูปที่ 13 การทำงานของยากุ่ม SERMS ในการแย่งจับ estrogen receptor .....	28
รูปที่ 14 ลักษณะเซลล์มะเร็งระดับของมนุษย์ (HepG2).....	32
รูปที่ 15 ลักษณะเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (HeLa) .....	32
รูปที่ 16 ลักษณะเซลล์ปกติจากปอดของมนุษย์ (MRC-5).....	33
รูปที่ 17 สารละลายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่ม 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C) และ 72 h (D) .....	39
รูปที่ 18 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มต่างๆ .....	39

รูปที่ 19 ค่า IC <sub>50</sub> ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มต่างกันต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย IC <sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (n=3).....	41
รูปที่ 20 ผลวิเคราะห์ FTIR ของสารสกัดกระเทียม (A) และอนุภาคนาโนซีลีเนียม (B).....	42
รูปที่ 21 สารละลายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ไม่ปรับ pH (A), pH 6 (B) และ pH 8 (C).....	44
รูปที่ 22 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ปรับ pH 6, 8 และไม่ปรับ pH ที่เวลาบ่ม 72 h .....	44
รูปที่ 23 ค่า IC <sub>50</sub> ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ปรับ pH ต่างกันที่เวลาบ่ม 72 h ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย IC <sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (n=3).....	45
รูปที่ 24 สารละลายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ 1:2:12 (A), 1:2:19 (B), 1:3:19 (C) และ 1:3:25 (D).....	46
รูปที่ 25 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม.....	46
รูปที่ 26 ลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ 1:2:12 (A), 1:2:19 (B), 1:3:19 (C) และ 1:3:25 (D) จาก Scanning Electron Microscope (SEM).....	48
รูปที่ 27 ผลวิเคราะห์ EDS ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม.....	49
รูปที่ 28 วิเคราะห์ Zeta potential ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม.....	50
รูปที่ 29 ค่า IC <sub>50</sub> ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย IC <sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (n=3).....	52

รูปที่ 30 ค่า IC<sub>50</sub> ของ Tamoxifen, สารสกัดกระเทียมและ Sodium selenite ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย IC<sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (n=3).....55

รูปที่ 31 ค่า IC<sub>50</sub> ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (SeNPs-1:3:25) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย IC<sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (n=3).....56

รูปที่ 32 ผลของปริมาณซีลีเนียมตกค้างในสารละลายจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ของแต่ละสภาวะการสังเคราะห์จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (n=3).....57





## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

อนุภาคนาโนเป็นอนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-100 nm ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างจากการเป็นสารทั่วไป โดยอนุภาคนาโนสามารถสังเคราะห์ขึ้นจากโลหะหลากหลายชนิด เช่น ทอง เงิน ทองแดง สังกะสี ซีลีเนียม ฯลฯ เพื่อใช้งานอย่างกว้างขวางในด้านเวชศาสตร์ เนื่องจากอนุภาคนาโนโลหะมีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ทั้งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ และยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยอนุภาคที่เล็กมากในระดับนาโนเมื่อเทียบกับเซลล์หรือจุลินทรีย์ ซึ่งมีขนาดอยู่ในระดับไมโคร สามารถแพร่ผ่านเข้าเซลล์และออกฤทธิ์ได้ดี (Nikalje, 2015) ทำให้ปัจจุบันมีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนสำหรับเป็นวัสดุทางการแพทย์ ยา หรืออาหารเสริม อย่างกว้างขวาง ซึ่งการสังเคราะห์อนุภาคนาโนนั้น สามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีทางกายภาพหรือเคมี ที่เป็นวิธีที่สะดวก แต่มีข้อจำกัดคือเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูงและไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีการใช้วิธีทางชีวภาพ ซึ่งจัดเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้จุลินทรีย์โดยอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ หรือใช้สารองค์ประกอบจากพืชไปรีดิวซ์โลหะให้เป็นอนุภาคนาโน ซึ่งการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยใช้สารสกัดพืชมีข้อดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ เนื่องจากประเทศไทยมีพืชหลากหลายชนิด มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์และยังทำหน้าที่หุ้มอนุภาคนาโนให้เกิดความเสถียรได้ ซึ่งสารสกัดกระเทียมสดมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี อย่างไรก็ตาม สารสกัดที่ผ่านการทำให้แห้งหรือเก็บไว้นานจะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเสื่อมลง (Petrovic *et al.*, 2018) รวมทั้งสารสกัดกระเทียมที่ผ่านการบริโภคในทางเดินอาหารจะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเท่าการฉีดเข้าสู่ร่างกายในหนูทดลอง (Li *et al.*, 2018) ประกอบกับมีรายงานการใช้ Sodium selenite ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง ด้วยการให้ทางเส้นเลือดในระดับปลอดภัยที่ร่างกายรับได้ (maximum tolerated dose (MTD)) ที่ 10.2 mg/m<sup>2</sup> ส่งผลให้มีครึ่งชีวิตของ Sodium selenite ในพลาสมา 18.25 h ที่ลดมะเร็งลงได้ (Brodin *et al.*, 2015) และพบว่ากระเทียมที่มีปริมาณซีลีเนียมสูงหรือมีสารประกอบ Organoselenium มาก จะสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้มากขึ้นกว่ากระเทียมสดที่มี organosulfur ในปริมาณที่เท่ากัน (Tsubura *et al.*, 2011) ดังนั้น การพัฒนาอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจึงอาจให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งคงอยู่ได้ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาหรืออาหารเสริมป้องกันมะเร็ง

โลหะซีลีเนียมเป็นแร่ธาตุโลหะที่สนใจนำมาสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม เพื่อพัฒนาเป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง เนื่องจาก Sodium selenite ที่อยู่ในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์มีบทบาทป้องกันและรักษามะเร็งได้ (Kieliszek *et al.*, 2017; Radomska *et al.*, 2021) การพัฒนาให้ได้อนุภาค

นาโนซีลีเนียมยังอาจเกิดประโยชน์จากซีลีเนียมต่อร่างกาย เนื่องจากการขาดแคลนซีลีเนียมมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันร่างกายให้ลดลง รวมทั้งซีลีเนียมเป็นธาตุสำคัญในสารองค์ประกอบของซีลีโนโปรตีนที่มีบทบาทด้านอนุมูลอิสระ เช่น Glutathione peroxidase อย่างไรก็ตาม อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้น ควรมีความปลอดภัย สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ การศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (SeNPG) ของ *Sribenjarat et al.* (2020) พบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเล็ก 11-70 nm มีสารองค์ประกอบของซีลีเนียมและสารสกัดกระเทียม ซึ่งอนุภาคแขวนลอยดีและเสถียรดี โดยมี Zeta potential ที่ -23.8 mV และมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* ได้ดีอีกทั้งไม่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (MRC-5) ทำให้มีความสนใจพัฒนาการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อไป อย่างไรก็ตาม Sodium selenite ที่หลงเหลือจากการสังเคราะห์ในสารแขวนลอยของอนุภาคนาโน หากปล่อยทิ้งสู่สภาพแวดล้อม อาจส่งผลกระทบต่อน้ำและดินได้ โดยปริมาณซีลีเนียมในดินไม่ควรเกิน 390 mg/kg และมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งของกระทรวงอุตสาหกรรมกำหนดให้มีปริมาณซีลีเนียมในน้ำทิ้งได้ไม่เกิน 0.02 mg/L (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2560) ดังนั้น การศึกษาพัฒนาอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม จึงมีวัตถุประสงค์หาสภาวะการสังเคราะห์ให้ได้อนุภาคที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะ ขณะที่สามารถลดการตกค้างของ Sodium selenite ในสารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์ โดยทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์ และสัดส่วนของ Sodium selenite: Ascorbic acid : Garlic extract แล้วคัดกรองสภาวะที่เหมาะสมด้วยการ ประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะ โดยใช้เซลล์มะเร็งตับ (HepG2), เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เทียบกับเซลล์ปกติจากปอด (MRC-5) ด้วยวิธี MTT assay แล้วนำอนุภาคที่มีศักยภาพดี ไปตรวจสอบการเป็นอนุภาคนาโนด้วย UV-visible spectrometer และศึกษาลักษณะของอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วย SEM, EDX, FTIR และ Zeta potential รวมทั้งตรวจปริมาณตกค้างของ Sodium selenite ในสารละลายการสังเคราะห์ เพื่อไม่ให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อมจากน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ภายใต้สภาวะสังเคราะห์ที่ไม่ก่อพิษต่อสิ่งแวดล้อม

### 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

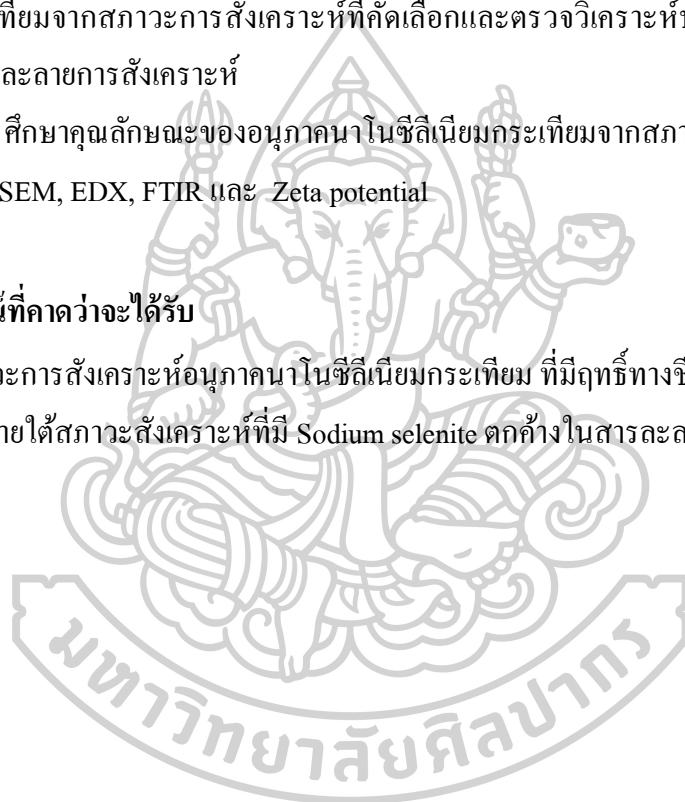
1.3.1 ศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม โดยศึกษาเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม, ความเป็นกรด-ด่างในการสังเคราะห์อนุภาคนาโน และสัดส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : Garlic extract แล้วคัดกรองสภาวะสังเคราะห์ โดยตรวจสอบการเป็นอนุภาคนาโนด้วย UV-visible spectrometer

1.3.2 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เทียบกับความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติจากปอด (MRC5) ด้วยวิธี MTT assay ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจากสภาวะการสังเคราะห์ที่คัดเลือกและตรวจวิเคราะห์ปริมาณ sodium selenite ตกค้างในสารละลายการสังเคราะห์

1.3.3 ศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจากสภาวะการสังเคราะห์ที่คัดเลือก ด้วย SEM, EDX, FTIR และ Zeta potential

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ภายใต้สภาวะสังเคราะห์ที่มี Sodium selenite ตกค้างในสารละลายในระดับต่ำ



## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ซีลีเนียม

ซีลีเนียม เป็นธาตุที่พบได้น้อยในรูปของสารประกอบในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดิน น้ำและสิ่งมีชีวิต ซีลีเนียมมีหลาย Oxidation status ทั้ง -2 (Selenide), 0 (Elemental selenium), +4 (Selenite), และ +6 (Selenate) ซึ่งมีสมบัติทางเคมีที่ต่างกัน คือ Elemental selenium ไม่ละลายน้ำ มีขนาด  $< 0.45 \mu\text{m}$  ขณะที่ Selenates และ Selenites มีอิเล็กตรอนมากกว่าจึงเป็นไอออนประจุลบที่ละลายในน้ำได้ และพบได้บ่อยที่สุด โดย Selenites มีความเสถียรภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนน้อย นอกจากนี้ซีลีเนียมยังพบได้หลายรูปแบบทั้งอนินทรีย์และอินทรีย์ โดยซีลีเนียมอนินทรีย์สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นอินทรีย์ได้จากเมตาโบลิซึมของสิ่งมีชีวิตเป็นสารหลายรูปแบบ เช่น Selenocysteine, Selenomethionine ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับมนุษย์ (Go mez-Ariza *et al.*, 1999)

ซีลีเนียมเป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ แต่ได้รับจากการบริโภคอาหาร ซีลีเนียมเข้าสู่ร่างกายและถูกดูดซึมได้ดีที่ลำไส้เล็ก และถูกเก็บสะสมไว้ในตับและไตได้มากเป็น 4-5 เท่าของซีลีเนียมที่อยู่ในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่ออื่นๆ ซีลีเนียมที่เข้าสู่ร่างกายมักพบในรูป Selenomethionine ซึ่งจะถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดอะมิโน Selenocysteine และถูกนำไปประกอบเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนที่เรียกว่า Selenoprotein ที่มีบทบาทต่อร่างกาย เช่น Glutathione Peroxidases, Thyroid Hormone Deiodinases และ Thioredoxin Reductases เป็นต้น โดยเอนไซม์เหล่านี้มีความสำคัญในระบบต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์และระบบสืบพันธุ์ (Allan *et al.*, 1999) บทบาทที่สำคัญที่สุดของซีลีเนียมคือฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยเป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ต่างๆ ที่มีบทบาทสำคัญในการทำงานต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ Glutathione peroxidase ซึ่งตอบสนองต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และไขมันที่เป็นอันตรายอื่นๆ และ ฟอสโฟไลปิดไฮดรอกไซด์ เพื่อป้องกันอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายยับยั้งการเสียหายของ DNA และการพัฒนาเกิดสารก่อมะเร็ง โดยซีลีเนียมจะรวมเข้ากับเอนไซม์ใน Selenocysteine จากการมีความไวในการทำปฏิกิริยาและแทนที่กำมะถันได้ดีกว่า (Meister and Anderson, 1983) มีการใช้ซีลีเนียมในรูปแบบอินทรีย์และอนินทรีย์ของ Sodium selenite, Selenium chloride, Selenomethionine และ Selenocysteine มาเป็นอาหารเสริม และกำหนดให้มีปริมาณซีลีเนียมที่ควรได้รับต่อวัน อยู่ที่ 70-200  $\mu\text{g/day}$  สำหรับผู้ใหญ่ การขาดแคลนซีลีเนียมส่งผลกระทบต่ออาการเกิดโรคหลายชนิด ซึ่งอาจพัฒนาและทำให้รุนแรงขึ้น เช่น ภาวะซีดเรื้อรัง, โรคหลอดเลือดหัวใจ, เนื้องอกผิดปกติ, ความผิดปกติของต่อมไทรอยด์ นอกจากนี้พบความสัมพันธ์กับ

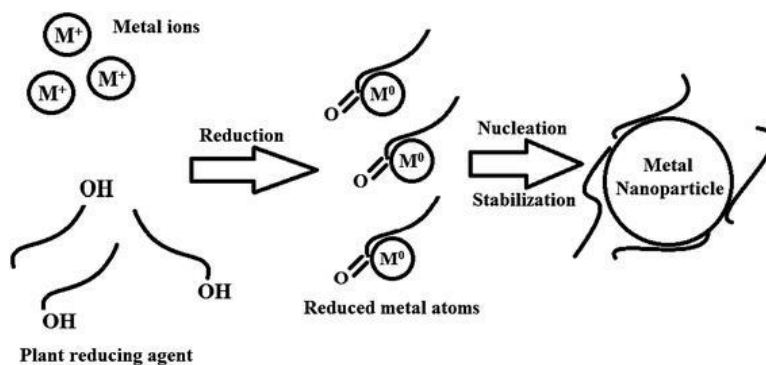
ปริมาณไวรัสในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส Influenza, HIV, Ebola และ COVID-19 โดย Kieliszek and Lipinski (2020) ได้รายงานว่ามีซีลีเนียมในรูปแบบของ Sodium selenite (ไม่ใช่ Selenate) จะ Oxidize thiol groups ของ Disulfide isomerase ที่เป็นโปรตีนของไวรัส ทำให้ไม่สามารถแทรกผ่านเข้า Cell membrane ได้ส่งผลให้สามารถป้องกันการติดเชื้อ COVID-19 ได้ อีกทั้งยังมีการรายงานเกี่ยวกับความสามารถของซีลีเนียมในการชะลอการแก่ชรา (Cai *et al.*, 2019) และมีรายงานว่าซีลีเนียมที่อยู่ในรูปของ +4 (Selenite) จะมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีกว่า +6 (Selenate) โดย Selenite จะป้องกันการเกิด Parafibrin ที่มีสมบัติตอบสนองต่อตรวจจับเซลล์แปลกปลอมและทำลายทิ้งด้วยระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ลดความเสี่ยงการพัฒนาก้อนมะเร็งได้ (Lipinski, 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานโดย Luo *et al.* (2013) เกี่ยวกับฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งของซีลีเนียม ว่าเป็นผลจากซีลีเนียมทำให้เซลล์มะเร็งตาย จากปฏิกิริยาของซีลีเนียมและไทออล ทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันที่ให้ปริมาณ ROS เพิ่มขึ้น แล้วยับยั้งการเจริญและก่อให้เกิดการตายแบบ Apoptosis ของเซลล์มะเร็ง ดังมีการเสนอในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ อย่างไรก็ตามการได้รับซีลีเนียมในปริมาณมากเกินไป เช่น 400 µg/day เป็นเวลานานจะเกิดผลเสีย เป็นพิษต่อร่างกาย อาการเริ่มแรกของการเป็นพิษจากซีลีเนียมคือ กลืนลมหายใจเหมือนกระเทียม ในกรณีเรื้อรังส่งผลให้ผมร่วง เล็บร่อน บาง ผิวง่ายเป็นผื่น ผื่นเปลี่ยนสีและมีความผิดปกติของระบบประสาทในที่สุด ซึ่งความเป็นพิษเฉียบพลันของซีลีเนียมเพียงเล็กน้อย ทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ (Arthur, 1991) ดังนั้น การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจึงมีข้อควรระวังเรื่องความปลอดภัยของอนุภาคที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ต้องการ โดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ

## 2.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วยสารสกัดพืช

สารสกัดพืชทำหน้าที่เป็น Reducing agent และ Capping agent ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม จากการที่พืชมีสารประกอบหลายชนิดทั้ง Phenolics และ Flavonoids ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถรีดิวซ์ Selenite ให้เป็นธาตุซีลีเนียมได้ (Li *et al.*, 2007; Ramamurthy *et al.*, 2013) ดังรูปที่ 1 การพัฒนาสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดพืชมีรายงานการใช้พืชหลากหลายชนิด เช่น 1) สารสกัดพืชจากใบพริกหวาน (*Capsicum annuum*) ที่รีดิวซ์  $\text{SeO}_3^{-2}$  ได้เป็นสารสีแดงที่บ่งบอกถึงการเกิดเป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียม ขนาด 12 nm (Li *et al.*, 2007) 2) สารสกัดใบของ *Terminalia arjuna* (Prasad and Selvaraj, 2014) 3) สารสกัดจากใบและต้นของ *Leucas lavandulifolia* Sm. (Kirupagaran *et al.*, 2016) 4) สารสกัดบรอกโคลี (Kapur *et al.*, 2017) 5) สารสกัดใบมะนาวที่ให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมเป็นสีแดงอ่อน (Prasad *et al.*, 2013) 6) สารสกัดจากผลองุ่นแดงแห้งของ *Vitis vinifera* ที่ให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมทรงกลมขนาด 3-18 nm (Sharma *et al.*,



2014) 7) Polysaccharides ที่สกัดจากสาหร่าย *Undaria pinnatifida* ที่ให้ SeNPs ที่มีความเสถียร (Chen *et al.*, 2008) 8) สารสกัดจากดอกเฟื่องฟ้า *Bougainvillea spectabilis* Willd (Deepa and Ganesan, 2013) และ 9) สารสกัดจากเมล็ดของ Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) หรือลูกชั้ด (Ramamurthy *et al.*, 2013) ต่างถูกนำมาสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียมได้เช่นกัน โดยสารพืชเหล่านี้ทำหน้าที่เป็น capping agent ในการสังเคราะห์ให้ได้อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่มีขนาดแตกต่างกัน ตั้งแต่ 80 nm ถึง 5  $\mu$ m และได้สัญญาณที่แตกต่างกัน ซึ่งชนิดสารสกัดพืชที่แตกต่างกัน และสภาวะการสังเคราะห์ที่ต่างกัน ทั้งความเข้มข้นสารพืช pH เวลา และอุณหภูมิ ต่างมีผลให้ได้อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่มีสัญญาณและฤทธิ์แตกต่างกันได้ (Yallapu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) เช่น พบว่าการให้ความร้อน 70°C เป็นเวลา 10 h มีผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคนาโน และอาจเปลี่ยนโครงสร้างอนุภาคนาโนจากทรงกลมเป็นแท่งนาโน (nonorod) ได้ (Zhang *et al.*, 2012) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากพืชมักใช้  $H_2SeO_3$  (Seleneous acid) และมีสภาวะการสังเคราะห์แตกต่างกัน คือ Sharma *et al.* (2014) ได้ใช้การ reflux สารละลายพืชที่มี Seleneous acid ให้เกิดเป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียม ส่วน Deepa and Ganesan (2013) ใช้เพียงการกวนสารละลายพืชกับ Seleneous acid ที่อุณหภูมิ 36 °C ที่ 250 rpm เป็นเวลา 5 วัน ขณะที่ Prasad *et al.* (2013) ใช้สภาวะคล้ายกันแต่กวนที่ 200 rpm ที่ 30 °C ในที่มีดเป็นเวลา 1 วัน ส่วน Ramamurthy *et al.* (2013) และ Chen *et al.* (2008) ได้ใช้สภาวะกระตุ้นด้วยการใส่ Ascorbic acid ในสารละลายพืชที่มี Seleneous acid ให้เกิดสีแดงอิฐเกิดขึ้น เห็นได้ว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องศึกษาปรับให้มีความเหมาะสม เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กและมีความเสถียร เนื่องจากขนาดอนุภาคที่เล็กส่งผลให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก และเกิดปฏิกิริยาบริเวณพื้นผิวได้ดี (Wang *et al.*, 2006)



รูปที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

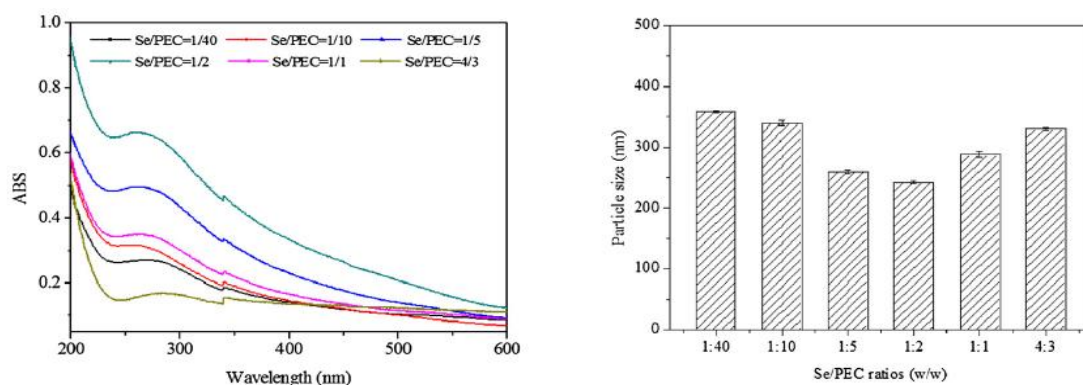
ที่มา : Keat *et al.* (2015)

## 2.2.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมให้ได้ขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็กและมีความเสถียร มีปัจจัยหลายอย่างเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์อนุภาคนาโน เช่น ความเข้มข้นสารหุ้มหรือพีซี pH และ อุณหภูมิ ที่อาจส่งผลให้ได้อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีลักษณะและฤทธิ์ที่ต่างกัน (Shah *et al.*, 2015)

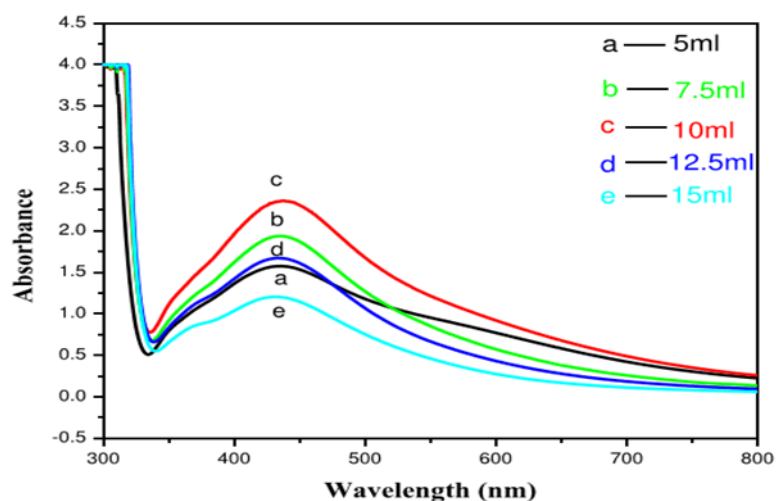
### 2.2.1.1 ความเข้มข้นสารหุ้ม

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมมักทำโดยการรีดิวซ์ Selenious acid ด้วยสารพีซีที่มีสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ โดยอาจมีการกระตุ้นด้วย Ascorbic acid หรือไม่ก็ได้ การใส่สารพีซีหรือสารที่มีสมบัติเป็นสารหุ้มจะทำให้อนุภาคมีความเสถียรขึ้น เนื่องจากอนุภาคของซีลีเนียมหลังการรีดิวซ์เป็น  $Se^0$  ที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ให้เกิดการเกาะกลุ่มจับกัน จึงจำเป็นต้องหุ้มให้อนุภาคลดปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคและให้อนุภาคเกิดการกระจายตัวดี ซึ่งเป็นลักษณะที่ต้องการที่บ่งบอกความเสถียรของอนุภาค โดยสารสกัดพืชมักมีบทบาททำให้เกิดความเสถียรของอนุภาคได้ นอกจากนี้อาจใช้ Polymer หรือ Surfactant เป็นสารหุ้มได้ ซึ่งยังสามารถส่งผลต่อประจุบนอนุภาคได้เช่นกัน พบว่า Poly-L-lysine และ Cetyltrimethyl ammonium bromide ทำให้อนุภาคซีลีเนียมเป็นประจุบวก ขณะที่ Polyacrylic acid และ Neutral polyvinylpyrrolidone ทำให้อนุภาคซีลีเนียมเป็นประจุลบ ซึ่งปริมาณของสารหุ้มที่มากขึ้นสามารถส่งผลให้ฤทธิ์ทำลายเชื้อก่อโรคพืชสูงขึ้น (Vrandecic *et al.*, 2020) นอกจากนี้ปริมาณสารหุ้มยังมีบทบาทต่อความเสถียรและขนาดของอนุภาคด้วย ซึ่ง Qiu *et al.* (2018) ศึกษาปรับสัดส่วนของ Se และ Pectin ในช่วงต่างๆ พบว่าที่ สัดส่วน 1:2 เป็นสัดส่วนเหมาะสมให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมเกิดขึ้นเป็นปริมาณมาก อนุภาคมีความเสถียร และมีขนาดเล็ก ดังรูปที่ 2 โดยสารหุ้มที่มากเกินไป หรือ ซีลีเนียมที่มากเกินไปจะทำให้มีขนาดใหญ่ได้ อย่างไรก็ตาม อนุภาคที่มีขนาดเล็กจะเป็นที่ต้องการมากกว่า ทำนองเดียวกัน การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจาก  $AgNO_3$  และสารสกัดมะขามป้อมซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้ง Reducing agent และ Stabilizing agent จะให้ฟิสิกส์แปรผันเด่นชัดเมื่อใช้ปริมาตรสารสกัดที่เหมาะสมที่สุดคือ 10 ml ที่ให้ปริมาณอนุภาคมากที่สุด ดังรูปที่ 3 (Ramesh *et al.*, 2015)



รูปที่ 2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนด้วย UV-VIS และขนาดอนุภาคของ PEC-SeNPs ที่อัตราส่วนการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน (1:40, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, และ 4:3)

ที่มา : Qiu *et al.* (2018)



รูปที่ 3 UV-VIS spectra สำหรับอนุภาคนาโนเงินที่ปริมาตรสารสกัดมะขามป้อมต่างๆ

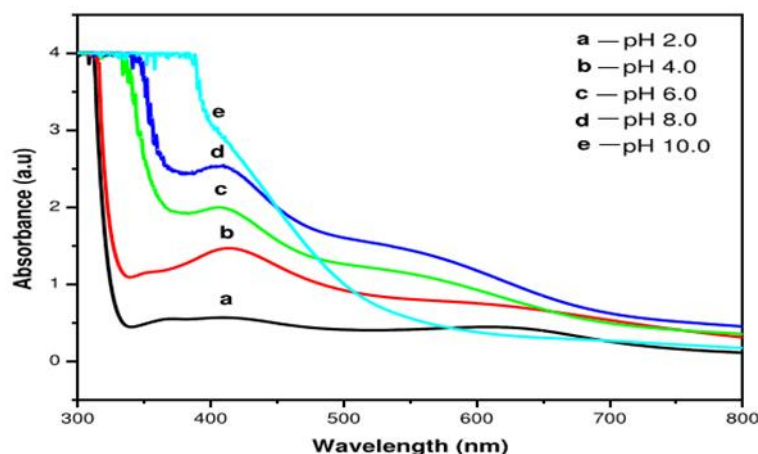
ที่มา : Ramesh *et al.* (2015)

### 2.2.1.2 pH

pH ช่วง 5-7 มีผลต่อขนาดและสัณฐานของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์จากการใช้ Selenosulphate เป็นแหล่ง Selenium และ Gallic acid เป็นสารหุ้ม พบว่ามีผลให้ขนาดทรงกลมที่ใหญ่เปลี่ยนเป็นขนาดนาโนที่มีลักษณะเป็นเส้นใยขนาด 50-75 nm โดย pH 5 ให้สารละลายปฏิกิริยาของ Gallic acid เป็นสีเหลืองส้ม ขณะที่ pH 7 สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนของขนาดและสัณฐานของอนุภาค (Barnaby *et al.*, 2011) แสดงถึง pH ที่เป็นกรดอ่อนหรือกลางจะให้อนุภาคนาโนขนาดเล็กลง pH มีผลต่อการก่อตัวของอนุภาคนาโนเงินและความเสถียรของ



อนุภาค การประเมินโดยการศึกษาดูด้วย UV-Visible Spectroscopy พบว่าค่า pH เริ่มต้นของสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  เป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากการใช้สารสกัดมะขามป้อม ซึ่งการศึกษาดูปฏิกิริยาที่ pH ต่าง ๆ คือ 2, 4, 6, 8 และ 10 โดยใช้สารสกัดจากมะขามป้อม 10 ml ร่วมกับ 1 mM  $\text{AgNO}_3$  พบว่าภายใต้สภาวะที่มีสภาพเป็นกรดสูงมาก (ค่า pH 2) เป็นสภาวะไม่เหมาะสม เนื่องจาก pH ที่เป็นกรดไม่เอื้ออำนวยต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน ขณะที่สภาวะ pH 4, 6 และ 8 ให้พีคที่แสดงถึงการเกิดอนุภาคนาโนเงินเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามที่ pH 10 ให้พีคของ spectrum ที่แคบลงแสดงว่าอนุภาคนาโนเงินมีเสถียรภาพน้อยลงที่สภาวะความเป็นด่างสูงดังรูปที่ 4 (Ramesh *et al.*, 2015) ดังนั้น pH การเกิดปฏิกิริยาจึงมีผลต่อปริมาณอนุภาคและความเสถียรของอนุภาค



รูปที่ 4 UV-Vis spectra สำหรับอนุภาคนาโนเงินที่ pH ต่างๆ

ที่มา : Ramesh *et al.* (2015)

pH ของสารละลายในการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมจะมีความสามารถดีวซ์ของสารพืชและความเสถียรของสารพืช ซึ่งส่งผลถึงคุณสมบัติของอนุภาคนาโนซิลิเนียมต่อไปได้ โดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมไม่มีผลเกี่ยวกับ pH ไว้ Durairaj *et al.* (2009) ศึกษาพบว่ากระเทียมสดมี pH 5.8 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดี และการปรับ pH สูงขึ้นไป pH 6-9 ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียลดลง ทำนองเดียวกันกับงานของ Sribenjarat *et al.* (2020) พบว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมที่สังเคราะห์ที่ pH 4, 6, 8 และ 10 และไม่ปรับ pH ให้สารละลายสีแดงอมส้ม ยกเว้นที่ pH 10 ให้สีส้มอ่อน เมื่อวิเคราะห์สเปกตรัมพบว่า ที่ไม่ปรับ pH จะมีพีคให้เห็นชัด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่ pH 10 และผลของการวิเคราะห์ SEM พบว่ามี

แนวโน้มที่ pH 10 ให้อนุภาคขนาดเล็กกว่าที่ pH อื่น ๆ นอกจากนี้ Sribenjarat *et al.* (2020) ได้ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่สังเคราะห์ด้วย DPPH assay พบว่า อนุภาคจากการสังเคราะห์ในสภาวะต่างมีฤทธิ์ต้าน DPPH เลือมลง ซึ่งอาจเป็นผลจากสารสกัดกระเทียมเลื่อมฤทธิ์ในสภาวะสารละลายการเกิดปฏิกิริยาที่มี Sodium selenite เป็นต่าง ดังรายงานของ Wang *et al.* (2014) ที่ว่ากระเทียมจะไม่เลื่อมฤทธิ์ที่ pH 5-6 แต่จะเสียดสภาพที่ pH สูงหรือต่ำ หรือที่อุณหภูมิมากกว่า 40 °C

## 2.3 การศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

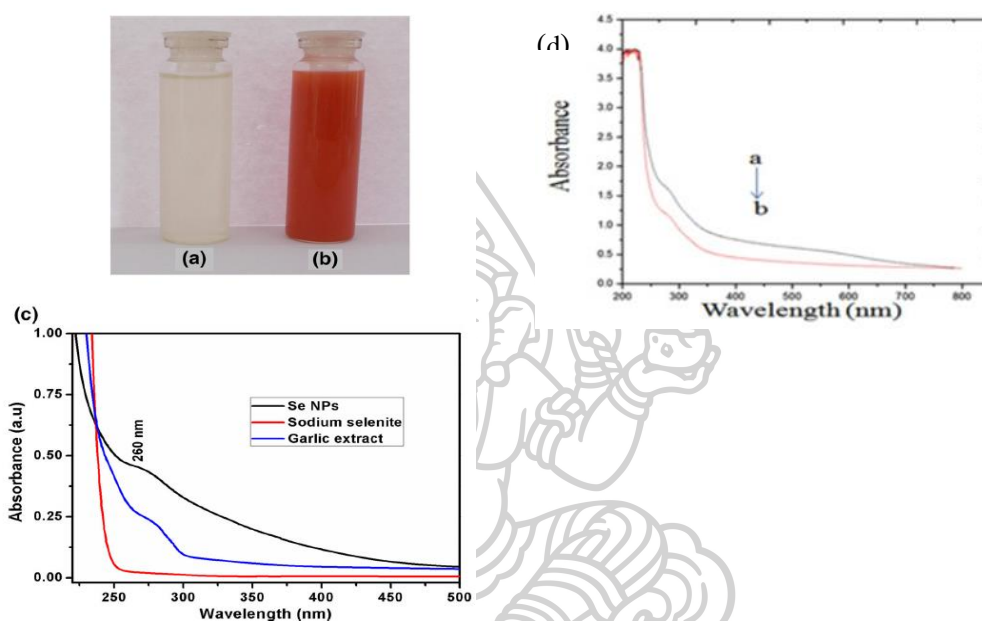
### 2.3.1 สมบัติทางกายภาพ

#### 2.3.1.1 ค่าดูดกลืนแสง

ความแตกต่างกันของอนุภาคนาโนขึ้นกับสารองค์ประกอบ ขนาดและรูปร่าง ซึ่งมีสมบัติต่อการดูดกลืนแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโน ซึ่งทองคำแบบก้อนจะมีสีเหลือง แต่ถ้าถูดย่อยหรือตัดให้ขนาดของทองคำเล็กลงไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งมีขนาดอนุภาคเล็กมากในระดับนาโนเมตร จะส่งผลให้อนุภาคของทองคำนั้นมีขนาดเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่มากกระทบมาก จึงทำให้เกิดปรากฏการณ์เชิงแสงที่เรียกว่า เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance) ซึ่งจะส่งผลให้อนุภาคนาโนของทองคำนั้นดูดกลืนสเปกตรัมของแสงในช่วงสีเขียว ความยาวคลื่นประมาณ 520 nm จึงทำให้เห็นอนุภาคนาโนของทองคำเป็นสีแดงทับทิม แทนที่จะเป็นสีเหลืองเหมือนกับตอนที่เป็นก้อน ดังนั้นเมื่อวัตถุมีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตรแล้ว คุณสมบัติช่วงสเปกตรัมที่ถูกดูดกลืนของวัตถุนาโนจะเปลี่ยนไป โดยช่วงความยาวคลื่นของแถบดูดกลืนของวัตถุนาโนจะเป็นช่วงความยาวคลื่นที่สั้นลงกว่าเดิม คือมีแนวโน้มไปสู่ช่วงแถบสเปกตรัมสีน้ำเงิน และพบว่าช่วงความยาวคลื่นที่ถูกดูดกลืนนี้แปรผันตรงตามขนาดของวัตถุนาโน ตัวอย่างเช่น อนุภาคนาโนของสารกึ่งตัวนำแคดเมียมเซลิไนด์ (CdSe) จะมีช่วงสเปกตรัมที่ถูกดูดกลืนที่สั้นลงตามขนาดรัศมีของอนุภาคนาโน คือยังมีขนาดเล็กก็ยังมีช่วงความยาวคลื่นของสเปกตรัมที่ถูกดูดกลืนสั้นลง (ชมภูสอ, 2556)

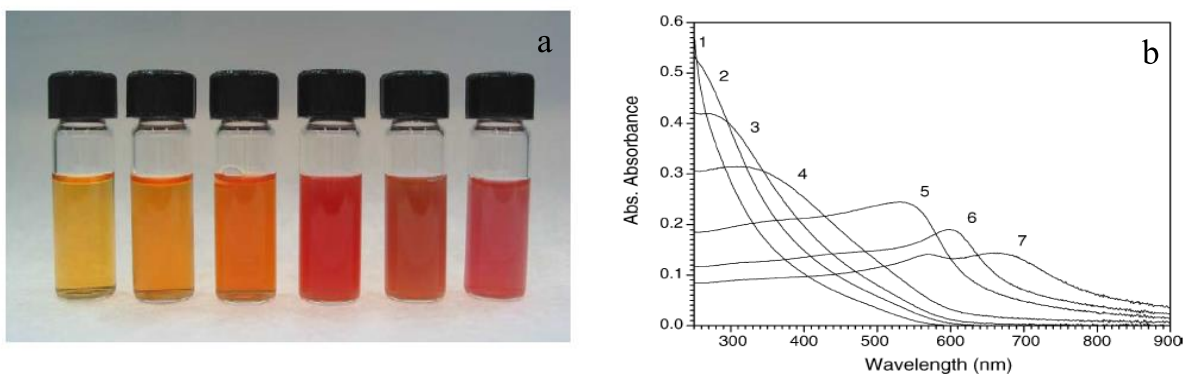
อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม ที่สังเคราะห์โดย Anu *et al.* (2016) โดยใช้ 10 mM Sodium selenite ภายใต้สภาวะกวนที่ 120 rpm เป็นเวลา 5-7 วัน อุณหภูมิ 36°C ทำให้เกิดปฏิกิริยาให้สารละลายจากไม่เกิดสี (รูปที่ 5 a) เปลี่ยนเป็นสีส้ม-แดง ที่แสดงถึงการเกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียม (รูปที่ 5 b) อนุภาคนาโนให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมอยู่ที่ 260 nm เมื่อวิเคราะห์ด้วย UV -Vis spectrophotometer (UV-2300 TECHCOMP) ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-800 nm (รูปที่ 5 c) ขณะที่สารละลายซีลีเนียมดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นน้อยกว่า

250 nm และสารละลายกระเทียมให้พีคการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งให้ลักษณะทำนองเดียวกันกับงานของ Ezhuthupurakkal *et al.* (2017) ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 200-300 nm ที่บ่งบอกการเป็นอนุภาคนาโนที่ดูดกลืนแสงช่วง UV ดังรูปที่ 5d (a คือเวลาสังเคราะห์อนุภาคที่ 12 h และ b คือเวลาสังเคราะห์ที่ 24 h) จะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมไม่ได้ให้พีคสเปกตรัมเด่นชัดเหมือนอนุภาคนาโนพืชอื่นๆ



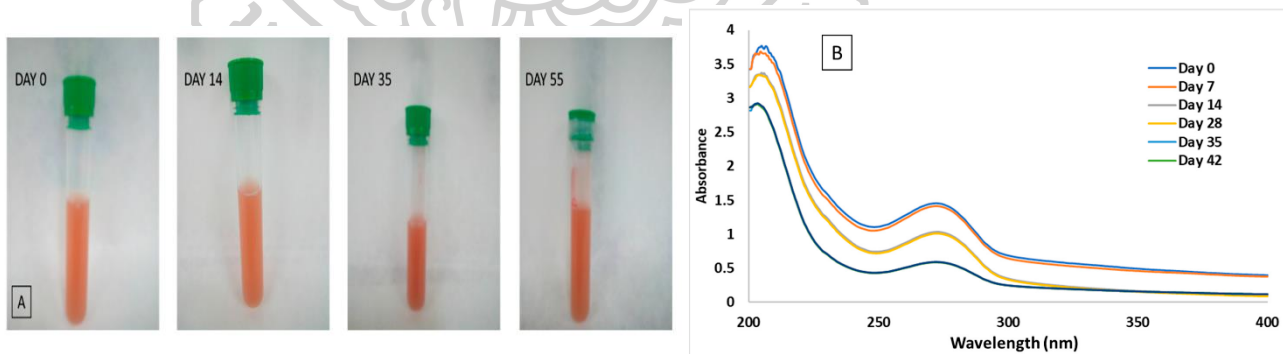
รูปที่ 5 a) สีของสารละลายปฏิกิริยาเริ่มต้น b) สีของสารละลายอนุภาคนาโนซีลีเนียม c) สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม จากงานของ Anu *et al.* (2016) และ d) สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจากงานของ Ezhuthupurakkal *et al.* (2017)

ผลการศึกษาของ Lin and Wang (2005) โดยใช้ Selenite precursor ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) เป็นสารตั้งต้น Sodium thiosulfate,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  เป็น Reducing agent และ Sodium dodecylsulfate เป็น Colloidal particle stabilizer ด้วยการ ใช้ Thiosulfate ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันและเวลาทำปฏิกิริยาภายใน 6 h พบว่าความเข้มข้นของ Sodium thiosulfate,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ที่มากขึ้น มีผลให้ขนาดของอนุภาคเล็กลง โดยสารละลายสีเหลืองส้มจะให้ขนาดอนุภาคประมาณ 20 nm และเมื่อเกิดการเจริญของอนุภาคตามเวลาจะทำให้สารละลายมีสีเข้มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสง ที่อนุภาคที่มีขนาดใหญ่จะให้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นมากขึ้น ดังรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าค่าดูดกลืนแสงสามารถใช้ทำนายความเสถียร และขนาดของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ดีจากการเปลี่ยนแปลงของสี จึงจำเป็นต้องสังเกตทั้งสีและสเปกตรัมของอนุภาคที่ได้



รูปที่ 6 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สัมพันธ์กับสีและขนาดอนุภาค  
 a) สีสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ขนาดแตกต่างกัน 6 ขนาดเรียงจากซ้ายไปขวา  
 คือ  $20.0 \pm 6.1$ ,  $70.9 \pm 9.1$ ,  $101.6 \pm 9.8$ ,  $146.1 \pm 23$ ,  $182.2 \pm 33.2$  และ  $240.4 \pm 32.2$  nm ตามลำดับ  
 b) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคอลลอยด์อนุภาคนาโนซีลีเนียมแสดงถึงขนาดอนุภาคที่แตกต่าง  
 กันของเส้นที่ 1-7 คือ  $18.1 \pm 6.7$ ,  $48.2 \pm 5.9$ ,  $70.9 \pm 9.1$ ,  $101.6 \pm 9.8$ ,  $146.1 \pm 23$ ,  $182.8 \pm 33.2$  และ  
 $240.4 \pm 32.2$  nm ตามลำดับ  
 ที่มา : Lin and Wang (2005)

นอกจากนี้อาจประเมินความเสถียรของอนุภาคจากการดูดกลืนแสงของอนุภาคที่เก็บที่  $4^{\circ}\text{C}$  ตามเวลาซึ่งพบว่าสเปกตรัมของอนุภาคจะลดลงที่เวลาการเก็บอนุภาคนานขึ้น เป็นผลจากการรวมกันของอนุภาคขนาดต่างๆ จากการที่สารหุ้มเสื่อมหายไปตาม (Mellinas *et al.*, 2019)

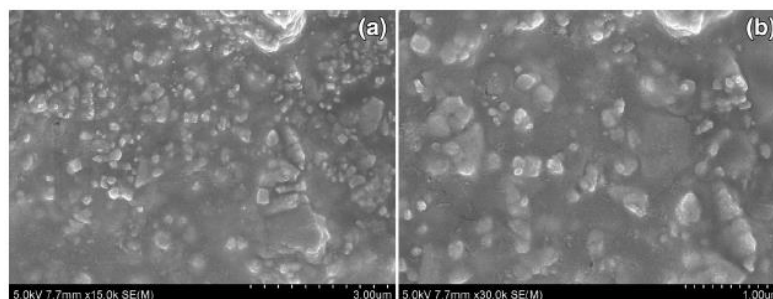


รูปที่ 7 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ช่วงเวลาต่างกัน  
 ที่มา : Mellinas *et al.* (2019)

### 2.3.1.2 ลักษณะของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

ลักษณะของอนุภาคนาโนสามารถศึกษาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) หรือกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope : TEM) โดย SEM เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ศึกษาพื้นผิวของตัวอย่าง ขณะที่ TEM ใช้ศึกษารายละเอียดองค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบ โครงสร้างภายใน รวมทั้งขนาดและลักษณะรูปร่างของอนุภาค อาศัยการยิงลำอิเล็กตรอนทะลุผ่านตัวอย่างที่มีความบางขนาดน้อยกว่า 100 นาโนเมตร ซึ่งลำอิเล็กตรอนที่ทะลุและเลี้ยวเบน ผ่านตัวอย่างจะถูกนำมาสร้างเป็นภาพด้วยการโฟกัสและขยายด้วยเลนส์แม่เหล็ก และฉายลงบนฉากรับภาพ สามารถศึกษาทั้งตัวอย่างทางชีวภาพและวัสดุศาสตร์ ภาพที่ได้เป็นภาพ 2 มิติ สามารถขยายภาพได้ 200,000 – 500,000 เท่า SEM ใช้ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยา เช่น ลักษณะรูปร่าง ลวดลายเป็นผิวตัวอย่าง ตลอดจนขนาดของตัวอย่างโดยลำอิเล็กตรอนจะส่องกราดไปบนผิวของวัตถุ และสามารถศึกษาทั้งตัวอย่างทางชีวภาพและวัสดุศาสตร์ ภาพที่ได้มีลักษณะเป็นภาพ 3 มิติ กำลังขยาย 20-800,000 เท่า และ SEM อาจมีเครื่องวิเคราะห์ธาตุเชิงพลังงาน (Energy dispersive x-ray spectrometer: EDS) ที่สามารถศึกษา ชนิด ปริมาณ และการกระจายขององค์ประกอบธาตุของวัสดุหรือสารมลทินบนพื้นผิว ของวัสดุที่นำมาศึกษาได้ เครื่องนี้สามารถวิเคราะห์ธาตุได้ตั้งแต่ Boron (B) ถึง Uranium (U) โดยการวิเคราะห์สามารถ แสดงผลเป็นชนิดและปริมาณของธาตุ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุง และพัฒนางานวิจัย งานในกระบวนการผลิต งานวิเคราะห์ความเสียหายของวัสดุ งานแก้ไขปัญหาอุตสาหกรรม และงานควบคุมคุณภาพของวัสดุได้เป็นอย่างดี

Anu *et al.* (2016) สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจาก Sodium selenite และสารสกัดกระเทียม ด้วยการหยดสารสกัดกระเทียมปริมาตร 2 ml ลงใน 10 mM Sodium selenite ปริมาตร 20 ml ภายใต้สภาวะกวนที่ 120 rpm เป็นเวลา 5-7 วัน อุณหภูมิ 36 °C ตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาของอนุภาคด้วย SEM รูปที่ 8 บ่งบอกถึงพื้นผิวอนุภาคนาโนซีลีเนียมเมื่อส่องด้วยกล้อง SEM



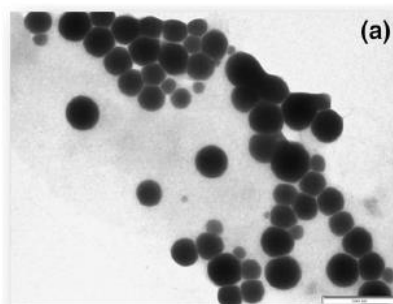
รูปที่ 8 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของอนุภาคจากการส่องด้วยกล้อง SEM

ที่มา : Anu *et al.* (2016)



และเมื่อวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคด้วย TEM พบว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมที่สังเคราะห์ขึ้น มีขนาดอยู่ระหว่าง 40-100 nm มีลักษณะเป็น Monodispersed และรูปร่างทรงกลม ดังแสดงในรูปที่

9



รูปที่ 9 ลักษณะของอนุภาคนาโนที่วิเคราะห์ด้วย TEM

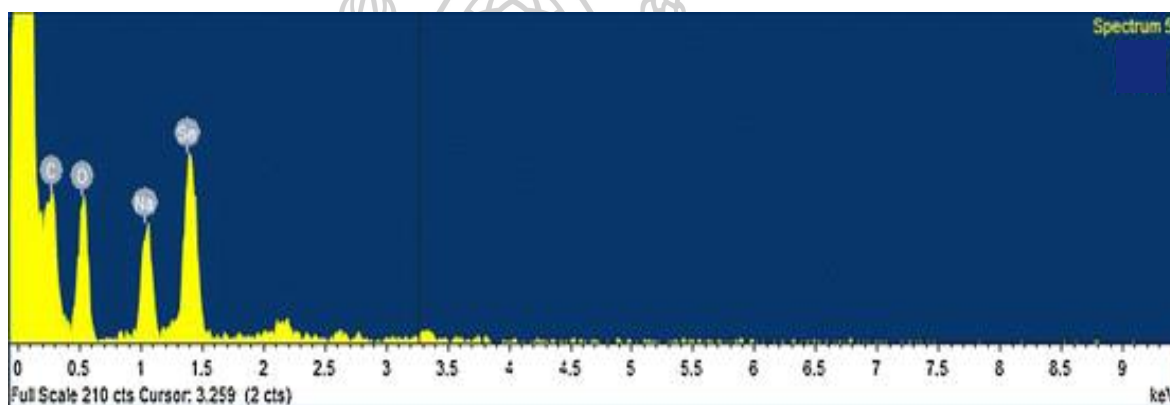
ที่มา : Anu *et al.* (2016)

นอกจากนี้ อนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมที่สังเคราะห์ขึ้น โดย Ezhuthupurakkal *et al.* (2017) ก็พบมีลักษณะทรงกลม ขนาด 205 nm เมื่อวิเคราะห์ด้วย Dynamic light scattering (DLS)

### 2.3.1.3 ธาตุองค์ประกอบ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีสามารถใช้ Energy Dispersive Spectroscopy (EDS/EDX) ที่เป็นสเปกโตรเมตรีรังสีเอกซ์แบบกระจายพลังงานที่ใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์ธาตุทั้งทางด้านวัสดุศาสตร์ ด้านชีวภาพ ภายภาพ และ อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ที่มีชิ้นส่วนขนาดเล็ก โดยหลักการของ EDS เมื่อตัวอย่างที่ต้องการศึกษาถูกชนด้วยลำอิเล็กตรอนทำให้สามารถเกิดการแตกตัวเป็นไอออน (Ionization) ด้วยการผลัดให้อิเล็กตรอนของตัวอย่างให้หลุดออกจากอะตอม ดังนั้น เพื่อเป็นการรักษาเสถียรภาพ อิเล็กตรอนที่อยู่วงโคจรชั้นถัดไปจะลงเข้ามาแทนที่ และปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปรังสีเอกซ์ (X-ray) ซึ่งเรียกรังสีเอกซ์แบบแคแรกเทอริสติก (Characteristic X-ray) โดยพลังงานของรังสีเอกซ์ ชนิดนี้มีค่าเฉพาะตามชนิดของธาตุ จากนั้นเมื่รังสีเอกซ์เข้าสู่หัววัดชนิด Silicon drift detectors (SSD) หัววัดจะสร้างสัญญาณไฟฟ้าซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับพลังงานของรังสีที่ตกกระทบ และจะนำสัญญาณที่ได้ มาวิเคราะห์หาความสูงของสัญญาณส่งไปยังระบบคอมพิวเตอร์ เพื่อประเมินและรายงานผลเป็นค่าสเปกตรัมรังสีเอกซ์ต่อไป นอกจากเทคนิค EDS จะสามารถวิเคราะห์ธาตุในเชิงคุณภาพ (Qualitative element analysis) ว่าตัวอย่างที่ต้องการศึกษามีธาตุชนิดใดประกอบอยู่ โดยสามารถวิเคราะห์ธาตุในเชิงปริมาณ (Quantitative element analysis) ซึ่งสามารถบอก % ของธาตุที่วิเคราะห์ที่มีอยู่ได้เช่นกัน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจาก sodium selenite และสารสกัดกระเทียม โดย Anu *et al.* (2016) เมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบหรือคุณสมบัติทางเคมีของอนุภาคด้วย EDAX ดังแสดงในรูปที่ 10 ซึ่งให้เห็นถึงธาตุอะตอมของ Se, Carbon, Oxygen และ Sodium ที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคนาโนซีลีเนียม โดยมีปริมาณ Se สูงถึง 55% ในอนุภาคนาโนซีลีเนียม ส่วน Satgurunathan and Bhavan (2017) วิเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมด้วยวิธี EDX พบมีธาตุ Se 80%, O 8.1%, P 5.96%, Ca 2.91% และ Na 2.36% ส่วน Kalishwaralal *et al.* (2016) รายงานการมี Se 75.14%, S 24.86% ที่แสดงสัดส่วนอะตอม S/Se เพิ่มสูงขึ้นเมื่ออนุภาคเล็กลง และเป็นผลทำให้สัดส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของอนุภาคเพิ่มขึ้น แสดงถึงการมีปริมาณสารหุ้มที่เป็นโมเลกุล thiol เพิ่มขึ้นที่ลดการเกาะจับกันของอนุภาคนาโน



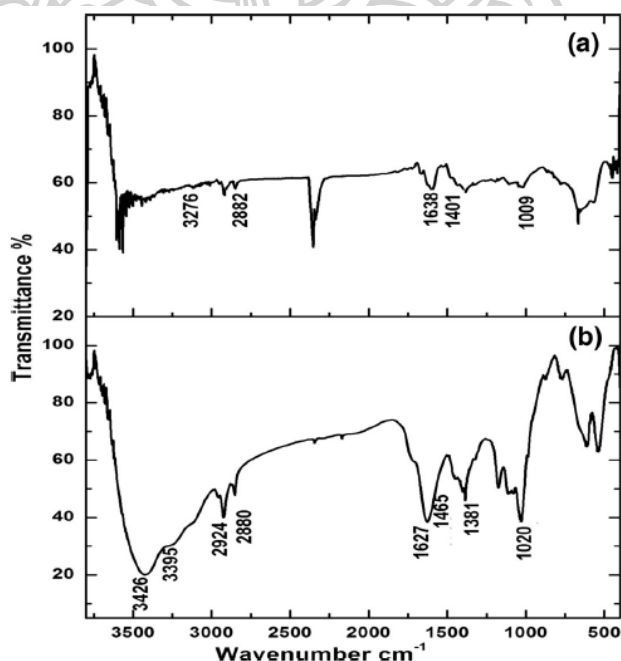
รูปที่ 10 สเปกตรัม EDAX ของอนุภาคที่สังเคราะห์  
ที่มา : Anu *et al.* (2016)

#### 2.3.1.4 การเกิดปฏิสัมพันธ์ของธาตุโลหะและสารสกัดพืช

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็นแถบพลังงาน (Spectrum) โดยมีความยาวคลื่นตั้งแต่ในช่วงของคลื่นวิทยุ คลื่นไมโครเวฟ คลื่นอินฟราเรด คลื่นในช่วงที่ตามองเห็น (Visible) ไปจนถึงคลื่นอัลตราไวโอเล็ต สำหรับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงอินฟราเรด จะมีเลขคลื่นในช่วง  $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  หรือมีความยาวคลื่นในช่วง  $15.4\text{--}2.5\text{ }\mu\text{m}$  ซึ่งเมื่อแสงอินฟราเรดตกกระทบ โมเลกุลสารพอลิเมอร์จะเกิดแรงกระทำ (Interaction) ระหว่างแสงกับโมเลกุลสาร โดยที่แสงอินฟราเรดในบางช่วงที่ซึ่งมีความถี่ตรงกันกับความถี่ของการสั่นของพันธะใน โมเลกุลพอลิเมอร์จะถูกดูดกลืนไป เรียกว่าเกิดเรโซแนนซ์ (Resonance) ดังนั้นความเข้มของแสงอินฟราเรดที่ทะลุผ่านสารตัวอย่าง (Transmitted Infrared) จึงมีความเข้มแสงลดลงในบางช่วงของความถี่ทั้งหมดของอินฟราเรด ได้ผลเป็นสเปกตรัม

ฟิสิกส์ที่แสดงถึงการดูดกลืนแสงในช่วงความถี่ต่างๆ ที่มีความสูงของฟิสิกส์ หรือปริมาณแสงที่ทะลุผ่านสารตัวอย่าง ที่หลากหลาย และเป็นจำนวนหลายฟิสิกส์ ทั้งนี้เนื่องจากในโมเลกุลของสารอินทรีย์จะมีพันธะมากกว่า 1 พันธะ และแต่ละพันธะจะมีการสั่น (Vibration) ในความถี่ที่ต่างกันและมีรูปแบบของการสั่น ได้หลายรูปแบบ เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง (Nondestructive) คือไม่มีการเปลี่ยนแปลง คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างหลังการวัด นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก และมีความปลอดภัยสูงสามารถวัดตัวอย่างได้ทั้งในรูปของแข็งและของเหลว

การวิเคราะห์สารที่ใช้ในการก่อตัวของอนุภาคโดยการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรดด้วย FTIR แสดงผลในช่วงความยาวคลื่น  $500\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  ดังรูปที่ 11 พบว่า Spectrum ของสารสกัดกระเทียมที่ความยาวคลื่น  $2882, 1628, 1401$  และ  $1009\text{ cm}^{-1}$  เลื่อนเป็น  $2880, 1638, 1410$  และ  $1023\text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ ใน Spectrum ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงบ่งบอกถึงการที่สารสกัดกระเทียมรีดิวซ์ Sodium selenite ไปเป็นซีลีเนียม อีกทั้งค่าการดูดกลืนแสงที่  $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงการมีสารในกลุ่ม OH และ NH มีบทบาทก่อการเกิดตัวของอนุภาค (Anu *et al.*, 2016) ทำนองเดียวกัน SeNPs กระเทียมของ Ezhuthupurakkal *et al.* (2017) พบตำแหน่งที่  $1230.2, 1065.3, 672.4$  and  $516.8\text{ cm}^{-1}$  จาก FT-IR spectra ที่ระบุบอกการเป็นสารประกอบ Organosulfur



รูปที่ 11 FTIR spectra, a) สารสกัดกระเทียม b) อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์

ที่มา : Anu *et al.* (2016)



### 2.3.1.5 Zeta potential

Zeta potential คือ ความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบอนุภาคและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ อนุภาคเกิดขึ้นในกระบวนการโคแอกกูเลชันฟล็อกกูเลชัน มีหน่วยเป็น mV เป็นค่าที่ใช้บอกแนวโน้มว่าอนุภาคจะมีการเกาะตัวกันเป็นก้อนหรือไม่ เช่น เมื่อมีการปรับค่า pH อนุภาคแขวนลอยจะเสถียรเมื่อศักย์ซีต้ามามีค่ามากกว่า + 30 mV หรือ น้อยกว่า -30 mV การวิเคราะห์หาค่าศักย์ซีต้าม์ของอนุภาค เพื่อศึกษาคุณสมบัติการกระจายตัวในระดับคอลลอยด์ของอนุภาค ซึ่งค่าศักย์ซีต้าม์ที่  $\pm 0-10$  mV,  $\pm 10-20$  mV,  $\pm 20-30$  mV และ  $> \pm 30$  mV จะบอกได้ว่าอนุภาคนาโนคอลลอยด์มีความเสถียรในระดับ Highly unstable, Relatively stable, Moderately stable และ Highly stable ตามลำดับ (Bhattacharjee, 2016) นอกจากนี้ค่า PDI (polydispersity index) ยังเป็นที่บอกการกระจายตัวของอนุภาค เมื่อค่า PDI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 พิจารณาว่ามีความเป็น Monodisperse สูง และค่าที่อยู่ในช่วง 0.1-0.4 มีความเป็น Monodisperse ปานกลาง ในขณะที่ค่า PDI มากกว่า 0.4 มีความเป็น Monodisperse ต่ำ ซึ่งการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากพืชต่างๆ พบว่าให้ค่า Zeta potential เป็นลบที่มีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ -14.2 ถึง -36.9 และมีค่า PDI ตั้งแต่ 0.2-1 โดยมีรายงาน PDI ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่สังเคราะห์โดย (Ezhuthupurakkal *et al.*, 2017) ที่ 0.234 ซึ่งยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่มีผลกระทบ ทำให้ไม่สามารถประเมินความสัมพันธ์ของ Zeta potential, PDI และขนาดของอนุภาคได้

### 2.3.2 สมบัติทางชีวภาพ

Satgurunathan and Bhavan (2017) สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจาก Sodium selenite และสารสกัดกระเทียม ด้วยการใช้สารสกัดกระเทียมที่เป็นน้ำมันกระเทียมปริมาตร 5 ml และสารละลาย Sodium selenite 20 mM ปริมาตร 50 ml ให้ความร้อนที่ 60°C ในสภาวะกวนที่ 150 rpm เป็นเวลา 24 h จะได้สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐที่แสดงถึงการเกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียมปั่นเหวี่ยงแยกอนุภาคที่ 10,000 rpm 30 นาที ล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง แล้วล้างด้วย Absolute ethanol อีก 3 ครั้ง ทำแห้งที่สภาวะอุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจลักษณะอนุภาคนาโนที่ได้ด้วย UV, SEM, EDX, XRD และ FT-IR พบว่าอนุภาคเป็นทรงกลม มีขนาดอนุภาคในช่วง 48-87 nm อนุภาคมีระดับ LC<sub>50</sub> SeNPs ที่ 101.04 µg/L ต่อ *Artemia nauplii* ที่เวลาบ่ม 24 h อย่างไรก็ตามการให้อนุภาคที่ 101.04 µg/L นาน 1/2 h แล้วนำ *Artemia nauplii* ที่ได้ไปเลี้ยงกึ่ง *M. rosenbergii* PL พบว่าจะทำให้อัตราการรอดและการเจริญของกุ้งสูงขึ้น โดยอนุภาคมีผลให้ SOD และ CAT ในกุ้งสูงขึ้น

Vyas and Rana (2017b) สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจาก Sodium selenite และสารสกัดกระเทียมด้วยการใช้สารสกัดกระเทียมหยดลงในสารละลาย sodium selenite 5 mM ปริมาตร 25 ml ภายใต้สภาวะการกวน จนสารละลาย Sodium selenite เปลี่ยนเป็นสีส้มอ่อนๆ บ่มต่อบน

shaker 72 h ภายใต้สภาวะมืดจะสังเกตเห็นสีส้มที่เข้มข้นแสดงถึงการเกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียม จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม กระเทียมที่สังเคราะห์กับสารสกัดกระเทียม พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมและสารสกัดกระเทียม สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เป็น 73% และ 65% ตามลำดับ ในขณะที่ความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS และ FRAP อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดกระเทียมและความสามารถต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเพิ่มมากขึ้น

Anu *et al.* (2016) ตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ต่อ Vero cell ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมด้วยวิธี MTT โดยสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจาก Sodium selenite และสารสกัดกระเทียม ด้วยการหยดสารสกัดกระเทียมปริมาตร 2 ml ลงใน 10 mM Sodium selenite ปริมาตร 20 ml ภายใต้สภาวะกวนที่ 120 rpm เป็นเวลา 5-7 วัน อุณหภูมิ 36°C สีสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม-แดง แสดงถึงการเกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียมหลังจากบ่มเป็นเวลา 5 วัน และสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมทางเคมีโดยใช้ PVA ภายใต้สภาวะเดียวกัน อนุภาคทั้งสองให้สีส้มแดงและให้ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่ 260 nm ขนาดอนุภาคประมาณ 60-100 nm เมื่อวิเคราะห์ความเป็นพิษกับ Vero cell ด้วย MTT assay พบว่า  $CC_{50}$  ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม PVA เป็น  $18.80 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$  และอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมเป็น  $31.8 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$  แสดงว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียม PVA มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม

Ezhuthupurakkal *et al.* (2017) ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่มีผลต่อ DNA ของต่อม Thymus ของลูกวัว พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจะไปจับระหว่างร่องของคู่สาย DNA ได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของ DNA ได้

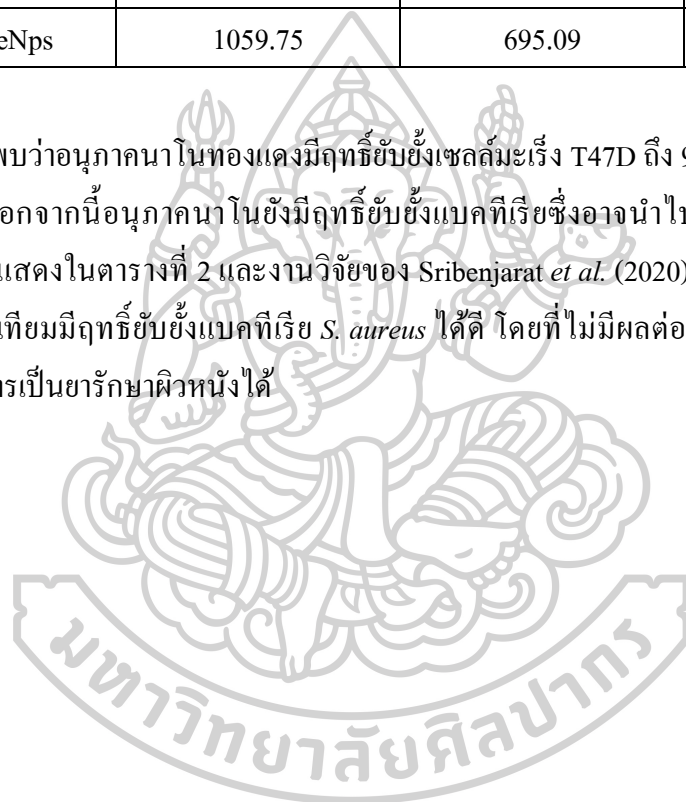
Krishnan *et al.* (2019) สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากใบ *S. hispida* ร่วมกับ Sodium selenite มีการใช้อนุภาคนาโน SAG-Sh-SeNPs เป็นพาหะในการนำส่ง S-allyl glutathione ซึ่งมีสมบัติในการรักษามะเร็ง โดยทดสอบกับเซลล์ HepG2 พบว่าอนุภาคนาโน SAG-Sh-SeNPs เพิ่มอนุมูลอิสระใน HepG2 และสามารถยับยั้งการทำงานของ Glutathione โดยลดระดับ GSH Superoxide dismutase, Catalase, GSH peroxidase ส่งผลให้มีการทำลาย Membrane ของ Mitochondria ในวัฏจักรเซลล์และกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบ Apoptosis

El-Refai *et al.* (2018) สังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะ Ag, Zn, Cu และ Fe กับสารสกัดกระเทียมและทดสอบฤทธิ์กับเซลล์มะเร็ง HepG2, Caco และ T47D ให้ผลกับเซลล์ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อนุภาคนาโนโลหะ Ag, Zn, Cu และ Fe ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง HepG2, Caco และ T47D

sample	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	Caco	HepG2	T47D
Garlic+AgNps	1319.39	1103.4	538.05
Garlic+ZnNps	1156.7	1008.32	501.59
Garlic+CuNps	859.48	436.02	2.13
Garlic+FeNps	1059.75	695.09	173.33

โดยพบว่าอนุภาคนาโนทองแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง T47D ถึง 90% โดยให้ค่า IC<sub>50</sub> เป็น 2.13 µg/ml นอกจากนี้อนุภาคนาโนยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับยาต้านแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 2 และงานวิจัยของ *Sribenjarat et al.* (2020) ซึ่งพบว่าอนุภาคนาโนซิลิเนียมกระเทียมมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดี โดยที่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ MRC-5 อาจนำไปใช้ในการเป็นยารักษาผิวหนังได้



ตารางที่ 2 ค่า PDI, Zeta potential ขนาด ความสามารถด้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์

พืช	การสังเคราะห์	คุณสมบัติ					อ้างอิง
		PDI (polydispersity index)	Zeta potential (mV)	ขนาด (nm)	ความสามารถด้านอนุมูลอิสระ	ความเป็นพิษต่อเซลล์	
leaf extract of lemon plant	หยดสารสกัดจากใบลมอนทีละหยด 2 ml ในสารละลาย Sodium selenite 10 mM ปริมาตร 20 ml บน magnetic stirring จากนั้นบ่ม shaker ความเร็วรอบ 200 rpm นาน 24 ชั่วโมงในที่มืด อุณหภูมิ 30°C	-	-	60-80	-	ช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวตายจากการเสียหายของ DNA ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย UV ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการดัดยอนุภาค	(Prasad <i>et al.</i> , 2013)
<i>Diospyros montana</i>	หยดสารสกัดจากใบตามคำ 10 ml ในสารละลาย Selenious acid 300 mM ปริมาตร 100 ml กวนอย่างต่อเนื่อง จากนั้นเติม 400 mM ascorbic acid 2 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 h	-	-22.3	4-16	ความสามารถในการกำจัด DPPH มีค่า IC <sub>50</sub> เป็น 0.225 µg/ml	ทดสอบกับเซลล์ MCF-7 ให้ค่า IC <sub>50</sub> ที่ 80.83 µg/ml	(Kokila <i>et al.</i> , 2017)

พืช	การสังเคราะห์	คุณสมบัติ					อ้างอิง
		PDI (polydispersity index)	Zeta potential (mV)	ขนาด (nm)	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ	ความเป็นพิษต่อเซลล์	
<i>Vitis vinifera</i> (Raisin)	ใช้สารสกัดองุ่นแห้ง 10 mL เติมสารละลาย selenous acid 90 ml ( $4 \times 10^{-5}$ M) ทำการสกัดแบบย้อนกลับนาน 15 นาที นำอนุภาคนาโนซีลีเนียมเป็นหยั่งตดะกอนที่ 15,000 rpm	0.212	-	3-18	-	-	(Sharma <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pelargonium Zonale</i> leaves	ผสมสารละลาย $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 15-65 ml กับสารสกัด ปริมาตร 0.5-2.5 ml ภายใต้สภาวะที่ใช้ ไมโครเวฟ 800 W 4 นาที	0.321	-24.6	136	-	ศึกษาการต้านเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์เทียบกับ สารสกัดและ $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zones เป็น 9 และ 10 mm ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดและ $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	(Fardsadegh <i>et al.</i> , 2019)

พืช	การสังเคราะห์	คุณสมบัติ					อ้างอิง
		PDI (polydispersity index)	Zeta potential (mV)	ขนาด (nm)	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ	ความเป็นพิษต่อเซลล์	
<i>Emblica officinalis</i>	หยด 2 ml ของสารสกัดมะขามป้อม ลงใน 10 mM Sodium selenite 10 ml ภายใต้สภาวะการกวนอย่างต่อเนื่อง ที่ 120 rpm อุณหภูมิ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 24 h	$< 0.20$	-24.4	15-40	EC <sub>50</sub> เป็น 15.67 $\pm$ 1.41 $\mu\text{g/ml}$ และ 18.84 $\pm$ 1.02 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ DPPH และ ABTS assay ตามลำดับ	ทดสอบ MTT assay กับเซลล์ N2a ( <i>Mus musculus neuroblastoma</i> ) มีค่า IC <sub>50</sub> และ IC <sub>90</sub> สำหรับ Sodium selenite และ SeNPs เป็น 14.01 $\pm$ 1.88 และ 24.60 $\pm$ 2.19 $\mu\text{g/ml}$ , 127.28 $\pm$ 3.73 และ 234.41 $\pm$ 5.57 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ	(Gunti <i>et al.</i> , 2019)
Ginger	เติมสารสกัดขิงที่ความเข้มข้น 1% ลงใน 10 mM Sodium selenite ในอัตราส่วน 9:1 ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะการกวนที่ 130 rpm 75 h	-	-36.0	100-150	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของอนุภาคนาโน ซิลิเนียมเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ค่า IC <sub>50</sub> เป็น 125 $\mu\text{g/ml}$ เทียบกับ ascorbic acid ที่ ค่า IC <sub>50</sub> เป็น 250 $\mu\text{g/ml}$	-	(Menon <i>et al.</i> , 2019)



พืช	การสังเคราะห์	คุณสมบัติ					อ้างอิง
		PDI (polydispersity index)	Zeta potential (mV)	ขนาด (nm)	ความสามารถต้านอนุมูล อิสระ	ความเป็นพิษ ต่อเซลล์	
poly (sodium 4 - styrenesulfonate)	เติม 2.5 mL 1% (v/v) poly (sodium 4 - styrenesulfonate) ลงใน 5 mM SeCl <sub>4</sub> 15 ml จากนั้นเติม 100 mM Ascorbic acid 2.5 ml ภายใต้สภาวะการกวนที่ 160°C เป็นเวลา 1-2 นาที สีละลายกลายเป็น สีแดงให้เห็น	0.04	-	35-75	-	-	(Gangadoo <i>et al.</i> , 2017)
Aloe vera	เติมสารสกัดว่านหางจระเข้ โดยค่อยๆหยด ใน flask ที่มีสารละลาย Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ความ เข้มข้น 5 mmol 25 ml บน magnetic stirring จนกระทั่งสีของสารละลาย Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> เปลี่ยน เก็บไว้ใน shaker ที่มี นาน 72 h จากนั้นจะพบมีการเปลี่ยนของสี สารละลายเป็นสีชมพูอ่อน	-	-	7-48	ABTS assay พบว่า อนุภาคนาโนมีฤทธิ์ใน การยับยั้ง 73% เมื่อเทียบกับ กับว่านหางจระเข้ที่ 54% อีกทั้ง DPPH assay เป็น 67% เทียบกับว่านหาง จระเข้ที่ 57%	-	(Vyas and Rana, 2017a)

## 2.4 พืชที่ใช้ในงานวิจัย

### 2.4.1 กระเทียม

กระเทียมเป็นพืชล้มลุกที่มีหัวลักษณะเป็นทรงกระเปาะอยู่ใต้ดิน ซึ่งแต่ละหัวประกอบด้วย 6-10 กลีบ นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงประกอบอาหาร กระเทียมเป็นพืชที่ค่อนข้างแตกต่างจากพืชทั่วไป เพราะอุดมไปด้วยกำมะถันหรือซัลเฟอร์ในปริมาณมาก เช่น Alliin, Allicin, Diallyl sulfide, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, Ajoene, and S-allylcysteine (Yun *et al.*, 2014) ที่ให้กลิ่นฉุน และมีสรรพคุณทางยามากมาย ที่สามารถลดพิษต่อตับจากสารเคมี ลดการทำลายสารพันธุกรรม กระเทียมจึงสามารถปกป้องสุขภาพได้ดีจากความสามารถต้านอนุมูลอิสระ และลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในร่างกายได้ (Sahar *et al.*, 2016)



ชื่อสามัญ

Garlic

ชื่อวิทยาศาสตร์

*Allium sativum* L.

วงศ์

Amaryllidaceae

#### 1)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

กระเทียมสดจะมีปริมาณสารฟีนอลิกและความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากระเทียมที่ผ่านการทำสุก กระเทียมที่ผ่านสภาวะการสกัด และอุณหภูมิ ซึ่งส่งผลให้กระเทียมสกัดมีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ไม่เท่ากระเทียมสด (Bhatt and Patel, 2013) Bozin *et al.* (2008) ได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากกระเทียมที่สภาวะต่าง ๆ คือ ผงกระเทียมอ่อนตากแห้ง ผงกระเทียมแก่ตากแห้ง และกระเทียมสด ที่สกัดโดยใช้ 80% methanol ในระยะเวลาสกัดนาน 76 h ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณ total phenolics ในผงกระเทียมอ่อนตากแห้ง ผงกระเทียมแก่ตากแห้ง และกระเทียมสด แตกต่างกันมีค่า  $0.98 \pm 0.004$ ,  $0.118 \pm 0.006$  และ  $0.05 \pm 0.005$  mg GAE/g ตามลำดับ และมีปริมาณ flavonoid เป็น



6.99±0.01, 5.78±0.09 และ 4.16±0.03  $\mu\text{g}$  quercetin equivalents/g ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีระดับลดลงในน้ำมันกระเทียม ซึ่งส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง จากค่า  $\text{IC}_{50}$  ที่เพิ่มขึ้น ของผงกระเทียมอ่อนตากแห้ง ผงกระเทียมแก่ตากแห้ง และกระเทียมสด เป็น 1.03, 4.41 และ 6.01 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์กำจัดอนุมูล DPPH radical ด้วยสารสกัดจากกระเทียม

Garlic Extract	Concentrations (mg/ml)						$\text{IC}_{50}$ (mg/ml)
	0.25	0.625	1.25	1.875	2.50	5.00	
กระเทียมอ่อนตากแห้ง	36.0±0.16	45.9±0.07	56.9±0.15	66.9±0.27	75.6±0.06	84.7±0.08	1.03
กระเทียมแก่ตากแห้ง	8.21±0.08	13.8±0.06	21.2±0.32	29.9±0.09	40.3±0.25	57.6±0.54	4.41
กระเทียมสด	30.7±0.46	35.2±0.33	37.8±0.27	40.0±0.16	42.7±0.12	44.8±0.15	6.01

## 2) ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

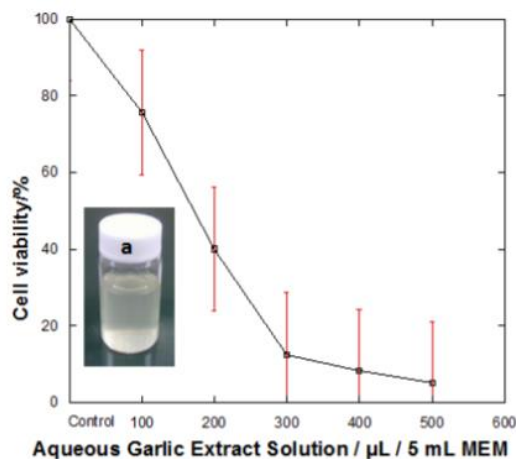
กระเทียมสดสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลายชนิดทั้ง Stomach adenocarcinoma (AGS), Mammary gland adenocarcinoma (MCF-7), Pancreatic carcinoma (Panc-1), Prostatic adenocarcinoma (PC-3), Lung carcinoma (A549), Medulloblastoma (Daoy), Renal carcinoma (Caki-2), และ Glioblastoma (U-87 MG) ที่ความเข้มข้น 166 mg/ml ของกระเทียมสด ที่ระยะเวลาบ่ม 48 h (Boivin *et al.*, 2009) หนึ่งในสารประกอบสำคัญในกระเทียมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและมีเป็นปริมาณมากคือ อัลลิซิน (Allicin) (Lawson, 1998; Lee *et al.*, 2013) โดยสารสกัดกระเทียมที่ผ่านการทำแห้ง หรือเก็บไว้นานจะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเสื่อมลง (Petrovic *et al.*, 2018) สอดคล้องกับการศึกษาของ Farias-Campomanes *et al.* (2014) ที่พบว่ากระเทียมสดมีปริมาณอัลลิซินมากและจะมีปริมาณลดลงในกระเทียมผง หรือกระเทียมที่ผ่านกระบวนการสกัด เนื่องจากอัลลิซิน จะถูกทำลายได้อย่างรวดเร็วเมื่อได้รับความร้อนหรือ สารละลายสกัด นอกจากนี้ สารสกัดกระเทียมที่ผ่านการบริโภคในทางเดินอาหารจะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเท่าการฉีดเข้าสู่ร่างกาย ในหนูทดลอง Li *et al.* (2018) และมีรายงานว่ากระเทียมที่มีปริมาณซีลีเนียมสูงหรือมีสารประกอบ Organoselenium ในปริมาณมาก จะสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้มากขึ้นกว่ากระเทียมสดที่มี Organosulfur ในระดับใกล้เคียง (Tsubura *et al.*, 2011) แสดงถึงธาตุซีลีเนียมมีบทบาทให้เกิดการยับยั้งเซลล์มะเร็งดีกว่ากำมะถัน

Fратиanni *et al.* (2016) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 cells โดยใช้สารสกัดจากหัวกระเทียมสายพันธุ์ท้องถิ่นของอิตาลีคือ Bianco, Torella, Salomone, Ufita Flumeri และ Schiacciato โดยทำการบ่มเซลล์ด้วยสารทดสอบเป็นเวลาเป็น 48 h แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่า กระเทียมสายพันธุ์ Schiacciato และ Bianco ให้ค่า  $EC_{50}$  2.98 และ 3.61  $\mu\text{g/ml}$  polyphenols GAE equivalent มากกว่าพันธุ์ Salomone, Torella และ Ufita ( $EC_{50}$  = 2.06, 2.069 และ 2.12  $\mu\text{g/ml}$  polyphenols GAE equivalent ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยพบว่าฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งนี้ไม่ได้มาจาก allicin เท่านั้น แต่น่าจะเกิดจากกิจกรรมเสริมฤทธิ์ของสารเมตาบอไลต์ทั้งหมด โดยปกติในกระเทียมจะมีเอนไซม์ Alliinase และ Cysteine Sulphoxide allin เมื่อเซลล์ได้รับความเสียหาย Alliinase จะเปลี่ยน Alliin ให้เป็น Allicin, Pyruvate และ Ammonium ซึ่งจากรายงานปริมาณ Allicin ที่ได้จากการใช้ HPLC มีค่าอยู่ในช่วง 0.411-1.105 % แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการปรับของ Allicin ในการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ SH-containing enzymes ซึ่งคุณสมบัตินี้มีบทบาทสำคัญในกิจกรรมทางชีวภาพ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม Allicin มีหน้าที่สำคัญในการลดระดับไขมันในเลือดและส่งผลต่อการรวมตัวของเกล็ดเลือด ดังนั้นกระเทียมมีบทบาทในการป้องกันโรคหัวใจ หลอดเลือดและลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง รวมถึง Ascorbic acid ด้วย จากรายงานปริมาณ Ascorbic ที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC พบว่าสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง คือ สารสกัดกระเทียมสายพันธุ์ Schiacciato มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก 0.268 mg/g ต้องใช้สารสกัดกระเทียมถึง 3.60  $\mu\text{g/ml}$  จึงจะกำจัดเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง ในขณะที่สารสกัดกระเทียมสายพันธุ์ Salomone มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก 0.658 mg/g ต้องใช้สารสกัดกระเทียม 2.06  $\mu\text{g/ml}$  ในการกำจัดเซลล์มะเร็งครึ่งหนึ่งจากเซลล์เริ่มต้น

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Caco-2 ของสารสกัดกระเทียมสายพันธุ์ต่าง ๆ

Variety	$EC_{50}$ as $\mu\text{g/ml}$ polyphenols GAE equivalent ( $\pm$ SD)
Schiacciato	3.60 (0.016)
Bianco	2.98 (0.01)
Torella	2.07 (0.01)
Salomone	2.06 (0.01)
Ufita	2.12 (0.02)

Al-Mamun *et al.* (2011) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ด้วยการสกัดหัวกระเทียมโดยนำหัวกระเทียมมาสับและบดให้ละเอียดก่อนนำ 200 g มาสกัดด้วยน้ำกลั่น 250 ml กวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 3 h กรองและเก็บสารสกัดในรูปสารละลายให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 150 mg/200 ml ไว้ใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัด โดยตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดด้วยวิธี Trypan blue dyeing assays พบว่าหลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดกระเทียมเข้มข้น 100  $\mu$ l ต่อ 5 ml MEM solution เป็นเวลา 24 h พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ยังคงมีมากกว่า 75% แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงและสุดท้ายที่ความเข้มข้น 500  $\mu$ l ต่อ 5 ml MEM solution เหลือเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเพียง 5% ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระเทียมมีศักยภาพในการยับยั้งความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ดังแสดงในรูปที่ 12

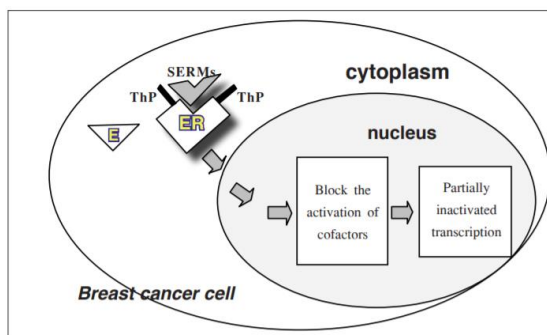


รูปที่ 12 ประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมต่อความมีชีวิตของเซลล์ HeLa

ที่มา : Al-Mamun *et al.* (2011)

## 2.5 ยาต้านมะเร็ง Tamoxifen

Tamoxifen เป็นยาในกลุ่ม selective estrogen receptor modulators (SERMS) การทำงานของยากลุ่มนี้ ไปแย่งจับที่ Estrogen receptor ของเซลล์มะเร็งที่มี Estrogen receptor ( $ER^+$ ) เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยอาศัย tamoxifen helper protein ช่วยในการทำงาน ทำให้ estrogen ไม่สามารถจับกับ estrogen receptor และออกฤทธิ์ได้ ทำให้การแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลดลง (Dechaphunkul *et al.*, 2011) ดังรูปที่ 13



คำย่อ: E = Estrogen, ER = Estrogen receptor, SERMs = Selective estrogen receptor modulators, ThP = tamoxifen helper protein

### รูปที่ 13 การทำงานของยากลุ่ม SERMS ในการแย่งจับ estrogen receptor

ที่มา : Dechaphunkul et al. (2011)

การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของ Tamoxifen ต่อ HepG2 โดยในเซลล์ได้รับยา Tamoxifen ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 24, 48 และ 72 h แล้วดูการแสดงออกของ survivin ซึ่งเป็นโปรตีนด้านการตายแบบ Apoptosis พบว่า Tamoxifen ที่ความเข้มข้น 10 และ 20  $\mu\text{M}$  ที่เวลา 72 h เซลล์ทดสอบมีการแสดงออกของ Survivin ลดลง แล้วส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบ Apoptosis ดังนั้น ยา Tamoxifen จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ไม่มี Estrogen receptor ผ่านไมโทคอนเดรียให้เกิด Apoptosis ได้ (Guo *et al.*, 2009)

### 2.6 การวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียม

การวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมด้วย Spectrophotometer ที่ใช้สารสีมีการทำมานานแล้วโดยใช้สีชนิดต่างๆ เช่น 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 2,3-diaminonaphthalene, 2-mercapto benzothiazole, O-phenylenediamine, Dithizone, Leuco crystal, Variamine blue และ Methylene blue แต่มักเป็นสีที่ก่อมะเร็ง มีผลความจำเพาะต่ำ ต้องให้ความร้อนในการให้เกิดสี ซึ่งเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ starch และ iodine เป็นสารสี โดยอาศัยปฏิกิริยาของซีลีเนียมกับ Potassium iodide ในสารละลายกรดแล้วให้อิโอดีนที่ปลดปล่อยออกมา ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับแป้งจะได้เป็นสารสีฟ้าที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาว 570 nm เป็นวิธีที่ค่อนข้างมีความปลอดภัย

Narayana *et al.* (2003) วิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมโดยใช้แป้งและไอโอดีน เป็นสารสี โดยเติม 2% Potassium iodide ปริมาตร 1 ml ตามด้วย 2M HCl ปริมาตร 1 ml ลงในสารละลายที่มีซีลีเนียม 2-12  $\mu\text{g}$  เขย่าเบาเพื่อผสมสารละลายเข้าด้วยกันจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงถึงการปลดปล่อยไอโอดีน จากนั้นเติมสารละลายแป้ง 0.2 ml และปรับสารละลายให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ml วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm วิเคราะห์ข้อมูลตาม Beer's Law ซึ่ง

Molar absorptivity และ Sandell's sensitivity ของซีลีเนียม  $10 \mu\text{g}$  พบว่ามีค่าเท่ากับ  $1.40 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  และ  $5.66 \times 10^{-3} \mu\text{g cm}^{-2}$  ตามลำดับ อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบซีลีเนียมในน้ำจากธรรมชาติ น้ำเสีย กากตะกอนดิน ตัวอย่างทางชีวภาพและเส้นผมได้อีกด้วย



### บทที่ 3

#### วิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

##### 3.1.1 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

	ยี่ห้อ/บริษัท
1. กล้องจุลทรรศน์ Light microscope รุ่น CHK-H	Olympus
2. เครื่อง Shaker	GFL
3. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Sartorius
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius
5. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (ultra purification system)	Elga
6. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	Scientific Industries
7. เครื่อง UV-visible spectrometer รุ่น Spectronic 20 Genexys	Biochem รุ่น LibraS22
8. ตัวกรองสารละลาย, syringe	Millipore
9. หลอดทดลอง, หลอด Vials	Pyrex
10. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 mL	Corning
11. Autoclave	Tomy
12. Autopipette ขนาด 1-10, 20-200 และ 100-1000 $\mu$ L	Gilson, Ependrof
13. Biological Safety Cabinet Class II	B.K.TECH ASSOCIATES
14. Beaker , Petri dish, Erlenmeyer flask	Pyrex
15. Centrifuge	Huttich zentrifugen
16. CO <sub>2</sub> Incubator	Nuair
17. Cuvette	STA
18. Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) *	Tescan รุ่น MIRA3
19. Eppendroffs	Axygen
20. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) *	Bruker, Vertex 70, Germany
21. Hemacytometer	BOECO
22. Micropipette	Gilson, Socorex
23. Muti-channel pipette	Cabibra 852
24. Microplate reader Sunrise-Basic TECAN	TECAN AUSTRIA GmbH
25. Oven	Nuair



26. pH meter	Denver Instrument
27. Pipette aid	Pipetboy comfort
28. Pipette 5, 10 ml	HBG
29. Scanning Electron Microscope (SEM) *	Tescan รุ่น MIRA3
30. Tissue culture flask ขนาด 25, 75 cm <sup>2</sup>	Corning
31. Vibra-Cell™ Ultrasonic	Sonics & Material, Inc
31. Zeta potential *	Malvern
32. 96 well cell culture plate	TPP

\* ส่งวิเคราะห์

### 3.1.2 สารเคมี

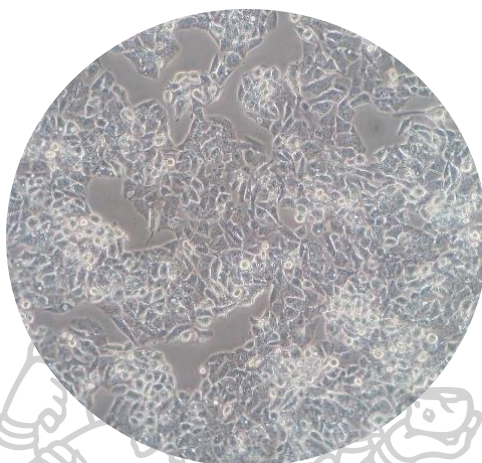
	ยี่ห้อ/บริษัท
1. Absolute ethanol	RCI labscan
2. Antibiotic (Penicillin – Streptomycin)	SIGMA-ALDRICH
3. Ascorbic acid	RCI labscan
4. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	SIGMA-ALDRICH
5. DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Amresco
6. Fetal bovine serum	Hyclone
7. Hydrochloric acid (HCl)	RCI labscan
8. MTT (3-(4,5-Dimethylthazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide)	SIGMA-ALDRICH
9. Minimum Essential Medium (MEM)	SIGMA-ALDRICH
10. Phosphate buffer saline (PBS ; Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> Free)	SIGMA-ALDRICH
11. Sodium hydroxide (NaOH)	RCI labscan
12. Sodium selenite	SIGMA-ALDRICH
13. Trypsin/EDTA	Amresco
14. Trypan blue	Fluka

### 3.1.3. พืชที่ใช้ในงานวิจัย

กระเทียม ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทชาวละออ เกษีฯ จำกัด

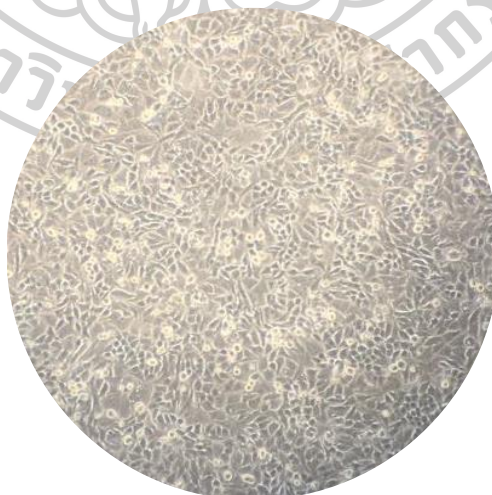
### 3.1.4. Cell culture

1. HepG2 เป็นเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ มีลักษณะเป็น Epithelial like cell เลี้ยงด้วยอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ซึ่งผ่านการ heat inactivated และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> ที่ 37°C



รูปที่ 14 ลักษณะเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (HepG2)

2. HeLa เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ มีลักษณะเป็น Epithelial-like cell เลี้ยงด้วยอาหาร Minimum Essential Medium (MEM) ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ซึ่งผ่านการ heat inactivated และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> ที่ 37°C



รูปที่ 15 ลักษณะเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (HeLa)

3. MRC-5 เป็นเซลล์ปกติจากปอดของมนุษย์ มีลักษณะเป็น Fibroblast-like cell เลี้ยงด้วยอาหาร Minimum Essential Medium (MEM) ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ซึ่งผ่านการ heat inactivated และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> ที่ 37°C



รูปที่ 16 ลักษณะเซลล์ปกติจากปอดของมนุษย์ (MRC-5)

### 3.2 การศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

การศึกษาสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม ใช้สารละลาย Sodium selenite กับสารสกัดกระเทียม ภายใต้สภาวะการกระตุ้นด้วย Ascorbic acid ทำการศึกษาที่สภาวะต่างๆ คัดแปลงจากวิธีของ Sribenjarat *et al.* (2020)

#### 3.2.1 เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม โดยสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 20 mg/ml ละลายใน 10 mM Sodium selenite ปริมาตร 20 ml ค่อยๆหยด 80 mM Ascorbic acid ทุก 10 นาที จนครบ 4.4 ml บ่มบน shaker 180 rpm ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง ในที่มืด 24, 48 และ 72 h เก็บตะกอนโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 50 นาที 2 ครั้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำตะกอนมาละลายน้ำ นำไป sonicate ที่ความถี่ 20% นาน 2 นาที 3 ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสง 200-800 nm เพื่อประเมินผลการเกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียม เก็บอนุภาคที่ 4°C อนุภาคที่ได้นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV -Vis spectrophotometer และ ศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่เวลาต่างๆ ต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ และนำ

อนุภาคที่ให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งดีมาวิเคราะห์อนุภาคด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

### 3.2.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม โดยสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 20 mg/ml ละลายใน 10 mM Sodium selenite ปริมาตร 20 ml ค่อยๆหยด 80 mM Ascorbic acid ทุก 10 นาที จนครบ 4.4 ml ปรับ pH ด้วย NaOH ให้ได้ pH เป็น 6, 8 และไม่ปรับ pH (มี pH ที่ 5.5-5.6) บ่มบน shaker 180 rpm ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง ในที่มืด 72 h เก็บตะกอนโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 50 นาที 2 ครั้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำตะกอนมาละลายน้ำ นำไป sonicate ที่ความถี่ 20% นาน 2 นาที 3 ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสง 200-800 nm เพื่อประเมินฟิสิกการเกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียม เก็บอนุภาคที่ 4°C อนุภาคที่ได้นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV -Vis spectrophotometer และ ศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจากสังเคราะห์ที่ pH ต่างๆ ต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

### 3.2.3 สัดส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ 1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 และ 1:3:25 (ตามภาคผนวก ก.) โดยสภาวะ 1:2:12 และ 1:2:19 ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 20 mg/ml และ 33 mg/ml ละลายใน 10 mM Sodium selenite ปริมาตร 20 ml ค่อยๆหยด 80 mM Ascorbic acid ทุก 10 นาที จนครบ 4.4 ml ในสภาวะ 1:3:19 และ 1:3:25 ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 33 mg/ml และ 43 mg/ml ละลายใน 10 mM Sodium selenite ปริมาตร 20 ml ค่อยๆหยด 80 mM Ascorbic acid ทุก 10 นาที จนครบ 6.9 ml บ่มบน shaker 180 rpm ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง ในที่มืด 72 h เก็บตะกอนโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 50 นาที 2 ครั้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำตะกอนมาละลายน้ำ นำไป sonicate ที่ความถี่ 20% นาน 2 นาที 3 ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสง 200-800 nm เพื่อประเมินฟิสิกการเกิดอนุภาคนาโนซีลีเนียม เก็บอนุภาคที่ 4°C อนุภาคที่ได้นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV -Vis spectrophotometer, Scanning Electron Microscope (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), และ Zeta potential รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจากสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมต่างๆ ต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

### 3.3 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของ Sodium selenite, Garlic extract, Tamoxifen และอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (SeNPs-1:3:25)

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เซลล์ปกติจากปอด (MRC-5) เป็นตัวควบคุม ลงใน 96 well-plate บ่มในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C ให้เซลล์เจริญ 24-48 h ที่ให้ความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 80% confluence จากนั้นใส่สารทดสอบ (กรณีกระเทียม ใช้ 1.25, 2.5, 5 และ 10 mg/ml; Sodium selenite 10, 25, 50, 100 µg/ml; Tamoxifen 5, 7, 9 และ 11 µg/ml และอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม 22.22, 66.67, 200 และ 600 µg/ml) และบ่มเซลล์นาน 24 h จากนั้นวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay และนำค่า % viability ที่ได้ไปพลอตกราฟกับความเข้มข้นสารทดสอบ เพื่อหาค่า Inhibition concentration 50 (IC<sub>50</sub>) (ดังแสดงในภาคผนวก ข.) ซึ่งเป็นค่าแสดงถึงความเข้มข้นที่สารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ครึ่งหนึ่งของสถานะที่ไม่มีสารทดสอบ

ค่า IC<sub>50</sub> ที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะของสารทดสอบ หรือ Selective index ตามสูตร

$$\text{Selective index} = \text{IC}_{50} \text{ ของเซลล์ปกติ} / \text{IC}_{50} \text{ ของเซลล์มะเร็ง (ดังแสดงในภาคผนวก ข.)}$$

### 3.4 วิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียม

ดัดแปลงจากวิธีของ Narayana *et al.* (2003) โดยใส่สารละลายที่มีซีลีเนียมที่เป็นสารมาตรฐานและตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในขวดปรับปริมาตรขนาดปริมาตร 10 ml ใส่ 2% Potassium iodide solution ปริมาตร 1 ml และ 2M Hydrochloric acid ปริมาตร 1 ml ผสมสารเขย่าเบาๆจนกระทั่งสีเป็นสีเหลืองที่แสดงการปลดปล่อยไอโอดีน ใส่น้ำแข็ง 0.2 ml และปรับสารละลายไปถึงเส้นปริมาตร 10 ml ด้วยน้ำกลั่น วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 570 nm เทียบกับสารละลาย Reagent blank คำนวณปริมาณซีลีเนียมในตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Sodium selenite และคำนวณ %Transformation ของ Sodium selenite ไปเป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (ดังแสดงในภาคผนวก ข.)

### 3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม

นำอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometer, Scanning Electron Microscope (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) และ Zeta potential



### 3.5.1 UV -Vis spectrophotometer

เทคนิค UV -Vis spectrophotometer ใช้หลักการเปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเบื้องต้น เพื่อประเมินโอกาสความสำเร็จของการเกิดอนุภาคจากฟิสิกส์ค่าดูดกลืนแสง โดยนำอนุภาคนาโนซีลีเนียมในแต่ละสภาวะละลายในน้ำกลั่น 5 ml ก่อนนำไป sonicate 2 นาที 3 ครั้ง และวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-800 nm

### 3.5.2 Scanning Electron Microscope (SEM)

เทคนิค Scanning Electron Microscope ใช้ศึกษาลักษณะพื้นฐานของอนุภาคนาโนซีลีเนียม การเตรียมตัวอย่างแบบผง ใช้การเตรียมแบบทั่วไป ตัวอย่างผงที่มีขนาด 10 ไมครอนขึ้นไปสามารถติดบนแท่นชิ้นงาน โดยพยายามติดอนุภาคให้เรียงตัวในลักษณะเดี่ยว ๆ ไม่เกาะกลุ่มกัน การยึดติดใช้เทปคาร์บอน ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

### 3.5.3 Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)

เป็นการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม ซึ่งวิเคราะห์ควบคู่กับเครื่อง Scanning Electron Microscope ใช้ตัวอย่างแบบผงเช่นเดียวกัน ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

### 3.5.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

เทคนิค FTIR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุล การเตรียมตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์จะอยู่ในสถานะของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซก็ได้ โดยส่วนใหญ่จะเป็นในรูปของแข็ง วิธีการเตรียมตัวอย่าง บดตัวอย่างให้มีความละเอียดจากนั้นทำการผสมตัวอย่างเข้ากับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) โดยให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นประมาณ 0.01% และบดสารให้ละเอียดโดยให้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นใส่ตัวอย่างที่บดแล้วลงในแม่พิมพ์และนำไปอัดด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิก ทิ้งไว้ 1-2 นาที และถอดตัวประกอบแม่พิมพ์ออก ตัวอย่างจะติดอยู่ที่แม่พิมพ์มีลักษณะเป็นวงกลมใส ตัวอย่างจะกระจายอยู่บนโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วจึงนำตัวอย่างเข้าเครื่อง FTIR ส่งวิเคราะห์ภาควิชาปิโตรเคมีและวัสดุพอลิเมอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

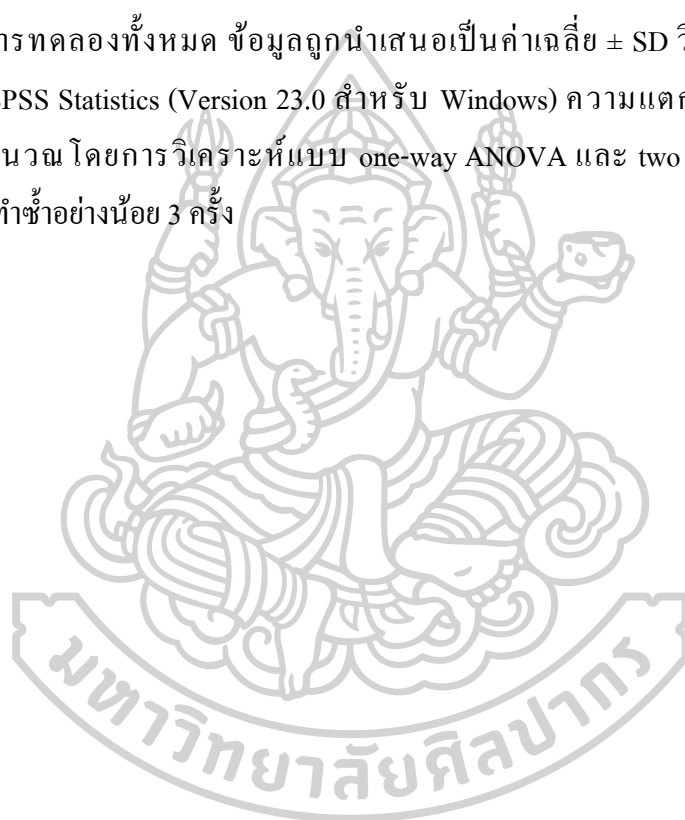


### 3.5.5 Zeta potential และวัดค่า PDI

เป็นการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า สามารถใช้บอกความเสถียรการเตรียมตัวอย่างโดยใช้อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ละลายด้วยน้ำ DI สภาวะของเครื่องที่ใช้คือ อุณหภูมิ 25°C ช่วงการวิเคราะห์ขนาดอยู่ในช่วง 0.3 nm - 10  $\mu$ m ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

### 3.6 วิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดลองทั้งหมด ข้อมูลถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics (Version 23.0 สำหรับ Windows) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) กำหนดโดยการวิเคราะห์แบบ one-way ANOVA และ two sample T-test โดยการทดลองมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง



## บทที่ 4

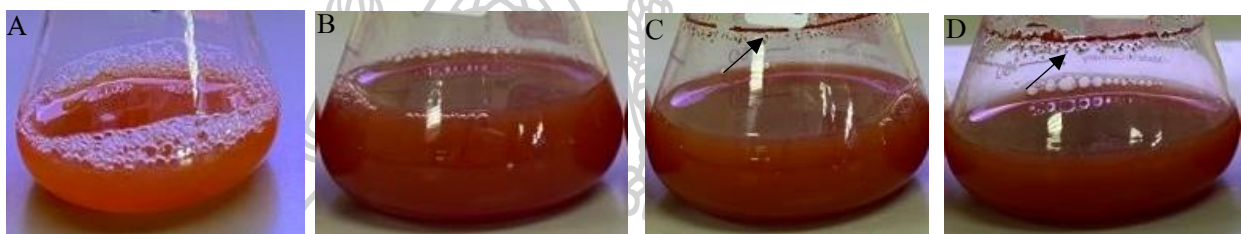
### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมในเบื้องต้น ได้ใช้สภาวะการสังเคราะห์ที่มีสารสกัดกระเทียมและ Sodium selenite และ Ascorbic acid เป็น 20 mg/ml, 10 mM และ 80 mM ตามลำดับ ซึ่งสภาวะการสังเคราะห์ที่มีสารสกัดกระเทียมและ Sodium selenite โดยไม่เติม Ascorbic acid พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนมากในระยะเวลาการบ่มนาน 3 วัน ในขณะที่สภาวะการสังเคราะห์ที่ใช้สารสกัดจากกระเทียม Sodium selenite และ Ascorbic acid ร่วมกันทำให้สารละลายของปฏิกิริยาเปลี่ยนจากไม่มีสีกลายเป็นสีส้มแดงในเวลารวดเร็ว สิ่งนี้บ่งชี้ว่า Ascorbic acid มีบทบาทเป็น reducing agent ที่เร่งการเปลี่ยน  $\text{Se}^{4+}$  เป็น  $\text{Se}^0$  โดยสารสกัดจากกระเทียมมีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ที่ไม่มากพอ นอกจากนี้ ในสภาวะที่เติม Sodium selenite และ Ascorbic acid พบว่าสารละลายของปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงเช่นกัน แต่มีการตกตะกอนเป็นเม็ดให้เห็นซึ่งตะกอนค่อนข้างจับกับผิวภาชนะแน่นมาก แสดงถึง Ascorbic acid ทำให้เกิดการเปลี่ยน  $\text{Se}^{4+}$  เป็น  $\text{Se}^0$  ซึ่งยังอาจมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคให้เกิดการจับกันอยู่ จึงส่งผลให้อนุภาคเกาะจับภาชนะและเกาะกลุ่มตกนอนกัน ขณะที่ในสภาวะที่มีการเติมสารสกัดจากกระเทียม จะเกิดการจับเป็นก้อนน้อยกว่าและสารละลายของปฏิกิริยาแขวนลอยดีกว่า แสดงถึงสารสกัดจากกระเทียมมีบทบาทเป็นตัวหุ้มอนุภาค ให้ลดปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุภาค และให้อนุภาคมีความเสถียรไม่เกาะกลุ่มกันได้ ดังนั้นในสภาวะสังเคราะห์ของการศึกษาในงานวิจัยนี้ Ascorbic acid จึงถูกเติมเพื่อเร่งการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของซีลีเนียม และสารสกัดจากกระเทียมเป็นตัวหุ้มเพื่อทำให้อนุภาคเสถียร

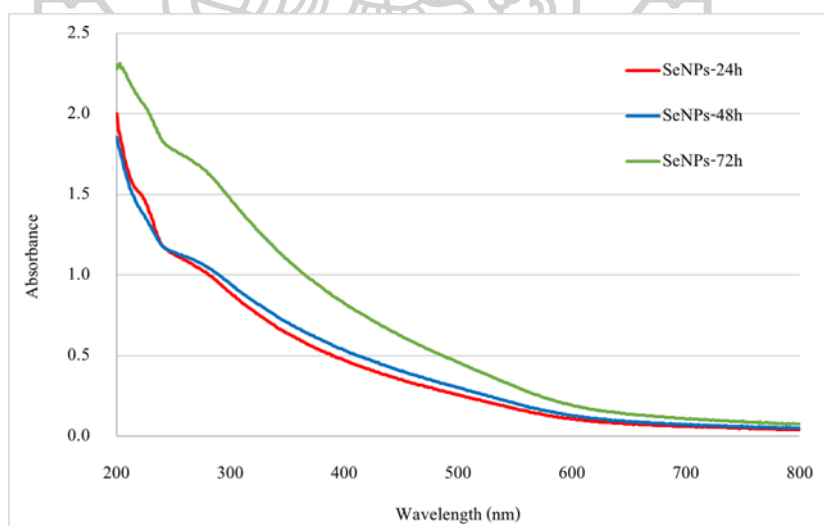
#### 4.1 เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม โดยใช้สารสกัดกระเทียม 20 mg/ml Sodium selenite 10 mM ในปริมาตร 20 ml และค่อยๆ หยด Ascorbic acid 80 mM ปริมาตร 4.4 ml บ่มบน shaker ที่อัตราเขย่า 180 rpm ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง ในที่มีดเป็นเวลานาน 24, 48 และ 72 h พบว่าสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีส้มอ่อนในระหว่างใส่สารให้เกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 17 A) และเมื่อบ่มนานขึ้นที่ 24, 48 และ 72 h สารละลายจะเป็นสีส้มเข้มจนเป็นแดงในเวลาบ่มที่นานขึ้น โดยที่เวลาบ่ม 24h สารละลายมีสีส้มเข้มขึ้น และมีการแขวนลอยดี พบการตกตะกอนบ้างเล็กน้อย (รูปที่ 17 B) แต่ในเวลาบ่มที่ 48 และ 72 h พบตะกอนเกาะที่ผิวภาชนะ และโดยมีความเข้มสีสารละลายมากขึ้นเมื่อเวลาบ่มนานขึ้น (รูปที่ 17 C และ D) ซึ่งเมื่อนำอนุภาค

ไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งและวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วง 200-800 nm พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลา 24, 48 และ 72 h ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงที่ช่วง 260, 260 และ 270 nm ตามลำดับ (รูปที่ 18) โดยไม่มีลักษณะเป็นพีคให้เห็นชัดเจนแต่เป็นรูปแบบ spectrum เช่นเดียวกับงานการศึกษาของ Ezhuthupurakkal *et al.* (2017) และ Anu *et al.* (2016) ซึ่งการเปลี่ยนสีของสารละลายแสดงถึงปรากฏการณ์ Surface plasmon vibrations ของอนุภาคนาโนซีลีเนียม และจะมีสีเข้มขึ้นเมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น (Lin and Wang, 2005) โดยอนุภาคในสภาวะบ่มที่นานขึ้นจากการทดลองนี้ อาจมีปริมาณมากขึ้น หรือขนาดใหญ่ขึ้น ให้เกิดการเกาะจับกันให้เห็นดังรูปที่ 17 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wen *et al.* (2021) ที่พบว่าเวลาการสังเคราะห์ที่นานขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณอนุภาคนาโนซีลีเนียมมากขึ้น

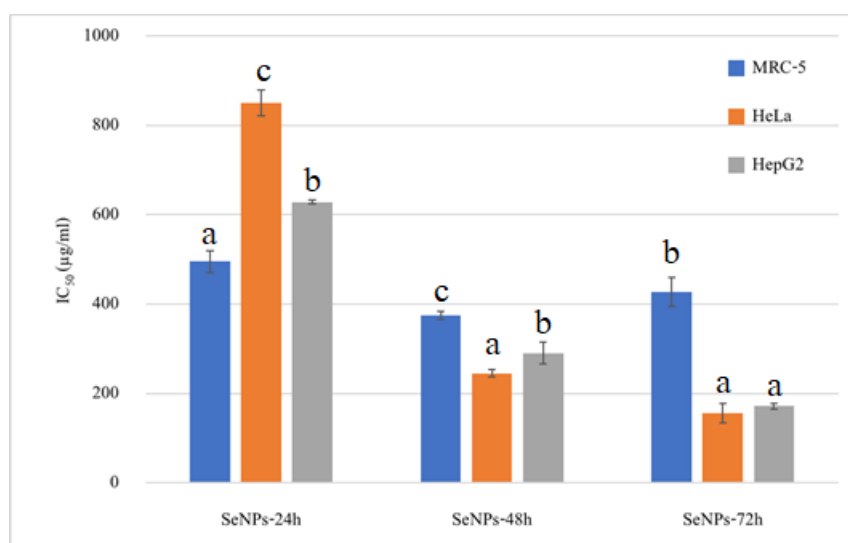


รูปที่ 17 สารละลายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่ม 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C) และ 72 h (D)



รูปที่ 18 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มต่างๆ

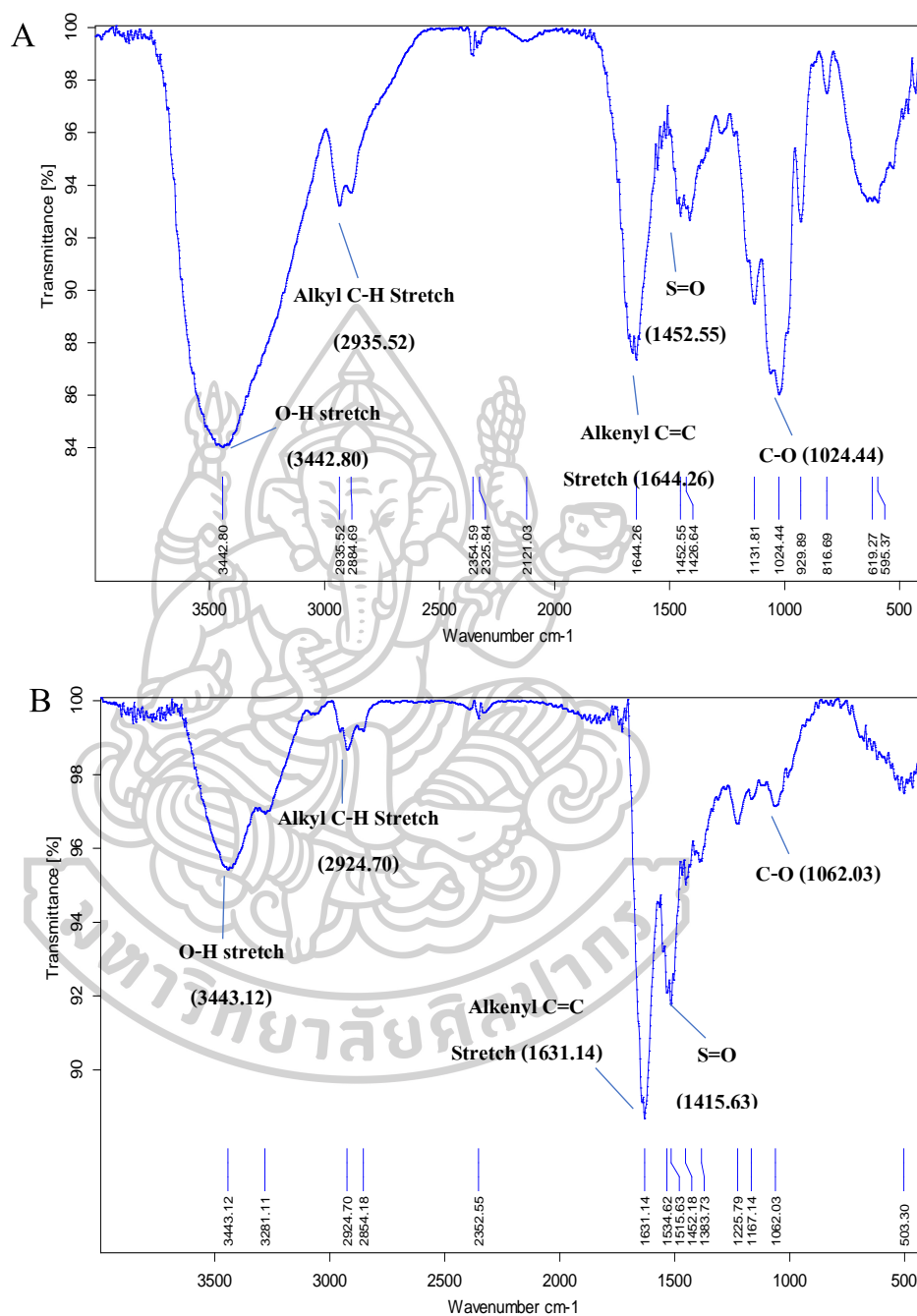
อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อผ่านการ Sonicate นำไปกรองให้ปลอดเชื้อ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเทียบกับเซลล์ปกติ พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะเวลาบ่ม 24 h มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ปกติมากกว่าเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด ส่วนอนุภาคที่สภาวะบ่ม 48 และ 72 h มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ทั้งเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งปากมดลูก ในขณะที่ให้ผลเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ โดยให้ค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับในสภาวะเวลาบ่มที่ 72 h เท่ากับ  $155.79 \pm 21.15$  และ  $171.36 \pm 6.94$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ (รูปที่ 19) และเมื่อคำนวณความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากค่า Selective index (SI) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะเวลาบ่ม 24, 48 และ 72 h (จากค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็ง) ได้ค่าเป็น  $0.58 \pm 0.01$ ,  $1.55 \pm 0.05$  และ  $2.62 \pm 0.12$  ตามลำดับ และคำนวณความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากค่า Selective index (SI) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะเวลาบ่ม 24, 48 และ 72 h ต่อเซลล์มะเร็งตับได้ค่า  $0.79 \pm 0.04$ ,  $1.27 \pm 0.06$  และ  $2.45 \pm 0.18$  ตามลำดับ เห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะเวลาบ่ม 72 h มีความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างปลอดภัยที่สุด มากกว่าอนุภาคจากระยะบ่ม 48 และ 24 h ตามลำดับ อาจเป็นไปได้ว่าการบ่มที่นานขึ้นอาจมีการหุ้มของอนุภาคมากขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ภายใต้สภาวะการผ่าน Sonication อนุภาคที่มีการหุ้มสารกระเทียม ซึ่งมี Selenite อยู่ภายใน จะเข้าสู่เซลล์แล้วมีบทบาทต่อเซลล์ได้ดีกว่า Selenite ที่มีการหุมน้อย โดย Selenite มีบทบาทกระตุ้นเซลล์ให้เกิด Apoptosis จากการผลิต ROS ปริมาณมากภายในเซลล์ แล้วกระตุ้นเซลล์ให้เข้าสู่ Apoptosis ผ่านวิถีต่างๆแล้วแต่ชนิดเซลล์ เช่น Bax-dependent mitochondrial pathway, p53 dependent cell cycle arrest, MAPKs pathways (Sonkusre and Cameotra, 2017)



รูปที่ 19 ค่า  $IC_{50}$  ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่เวลาบ่มต่างกันต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย  $IC_{50}$  ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

จากการที่อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะเวลาบ่ม 72 h ให้การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะดีกว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะบ่มเวลาอื่น จึงนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วย FTIR เทียบกับสารสกัดกระเทียม (รูปที่ 20) พบว่าสารสกัดกระเทียมมีปฏิสัมพันธ์กับไอออนของซีลีเนียม เนื่องจากตรวจพบพีกของสารสกัดจากกระเทียมที่แสดงให้เห็นพันธะจาก Phenolic และ Flavonoid โดยพบกลุ่มฟังก์ชัน O-H stretching ( $3550-3200\text{ cm}^{-1}$ ), Alkenyl C-H Stretch ( $3100-3010\text{ cm}^{-1}$ ), Alkyl C-H Stretch ( $2950 - 2850\text{ cm}^{-1}$ ), O=C=O stretching ( $2400-2000\text{ cm}^{-1}$ ), Amide C=O Stretch ( $1690-1630\text{ cm}^{-1}$ ), Alkenyl C=C Stretch ( $1680-1620\text{ cm}^{-1}$ ), C-O ของ Alcohols ( $1085-1050\text{ cm}^{-1}$ ), และ S=O ( $1450-1300\text{ cm}^{-1}$ ) ดังแสดงในรูปที่ 20A โดยกลุ่มฟังก์ชัน S=O มาจากสารประกอบ Organosulfur ในสารสกัดกระเทียม ซึ่งตำแหน่งสเปกตรัมที่แสดงพีกดังกล่าวข้างต้นเหล่านี้ได้เปลี่ยนแปลงไปในอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (รูปที่ 20B) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มฟังก์ชัน OH, C-H, C-O-H และ S = O มีส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม เช่นเดียวกับรายงานอื่น ๆ ที่กลุ่มฟังก์ชัน OH, C-H และ C-O-H พบมีอยู่ในอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (Anu *et al.*, 2016) โดยพบพีกของสารสกัดกระเทียมที่  $1644.26, 1452.55\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งระบุ Alkenyl C=C Stretch และ S=O ของสารประกอบ Organosulfur เปลี่ยนไป ในอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมอย่างชัดเจน โดยพีกเลื่อนไปที่  $1631.14, 1415.63\text{ cm}^{-1}$  สันนิษฐานว่าซีลีเนียมซึ่งเป็นธาตุไม่เกิดพันธะ  $\pi$  bonds ในทุกรูปแบบ จะมี Electron วงนอกของซีลีเนียมในลักษณะหลวม

กว่า Sulfur ทำให้ Nucleophile ของซิติเนียมเข้าทำปฏิกิริยาแทนที่ Sulfur ในสารสกัดกระเทียมที่อยู่บนอนุภาคนาโนซิติเนียมกระเทียมได้ดี



รูปที่ 20 ผลวิเคราะห์ FTIR ของสารสกัดกระเทียม (A) และอนุภาคนาโนซิติเนียม (B)

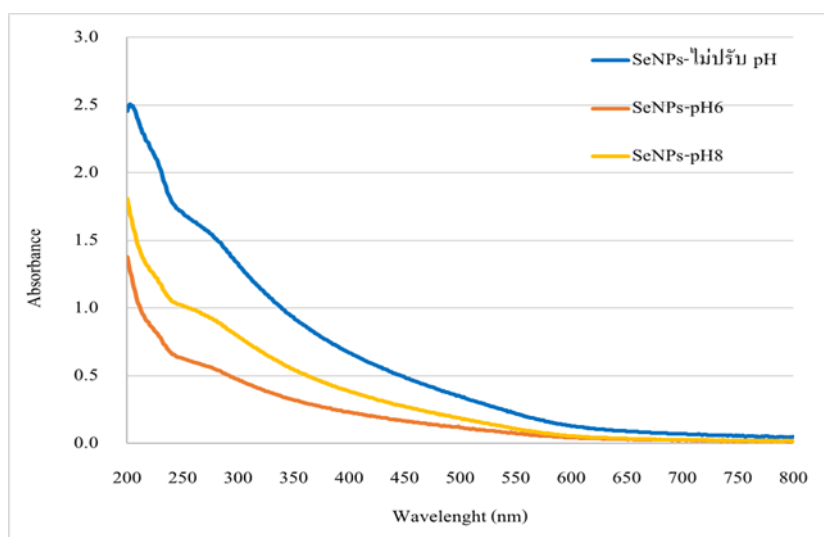


#### 4.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

อนุภาคนาโนซีลีเนียมเตรียมขึ้นจากปฏิกิริยา Oxidation-reduction โดยมี Ascorbic acid เป็น Reducing agent และ Selenite ที่เป็นแหล่ง Selenium เป็น Oxidant ซึ่งการสังเคราะห์อนุภาคจากปฏิกิริยา Oxidation-reduction มีความเกี่ยวข้องกับ pH ที่อาจมีผลต่อขนาดของอนุภาค และฤทธิ์ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้ ในการศึกษาผลของ pH นี้ ได้ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 20 mg/ml, Sodium selenite 10 mM ค่อยๆ หยด Ascorbic acid 80 mM ปริมาตร 4.4 ml และปรับ pH สารละลายด้วย NaOH ให้เป็น 6, 8 และสถานะที่ไม่ปรับ pH (pH อยู่ในช่วง 5.5-5.6) บ่มบน shaker ที่อัตราเขย่า 180 rpm ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 72 h พบว่าในทุกสภาวะสารละลายของปฏิกิริยาเป็นสีส้มแดง โดยในสถานะที่ไม่ปรับ pH มีตะกอนเม็ดเล็กสีแดง เกาะที่ภาชนะ และปริมาณตะกอนพบมีน้อยลงตาม pH ที่มากขึ้น โดย pH 8 พบว่าสารละลายค่อนข้างเป็นเนื้อเดียวที่สุด ดังรูปที่ 21 ซึ่งสันนิษฐานว่า pH ที่เป็นค่าต่าง อาจส่งผลกระทบต่อสังเคราะห์ให้ได้อนุภาคเล็กและเสถียรดีกว่า เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wen *et al.* (2021) ที่รายงานว่า การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ pH 9 จากสารสกัดน้ำมะนาวจะให้ได้อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่มีขนาดเล็ก 50-90 nm อย่างไรก็ดี เมื่อได้อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ได้มาปั่นเหวี่ยง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ และวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วง 200-800 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer พบว่าได้ค่าดูดกลืนแสงสูงในช่วงประมาณ 260-280 nm ในทุกสภาวะของการสังเคราะห์ ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Anu *et al.* (2016) ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงในช่วงประมาณ 260 nm และ Sribenjarat *et al.* (2020) ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงในช่วงประมาณ 270-280 nm โดยในสถานะที่ไม่ปรับ pH ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 22 ซึ่งในสถานะ pH เป็นกรด Selenite มีความเป็น Oxidant ที่ดี ส่วน Ascorbic acid มีความสามารถรีดิวซ์ที่อ่อนแต่มีความเสถียร ทำให้เกิดการรีดิวซ์ Selenite เป็น  $Se^0$  และหุ้มด้วยสารสกัดกระเทียมที่มีความเสถียรได้เช่นกัน จากรายงานของ Fujisawa *et al.* (2008) ที่ว่า Allicin เป็นสารในกระเทียมที่มีความเสถียรดีที่ pH 5 และ pH ที่สูงหรือต่ำกว่า จะส่งผลให้ Allicin เสื่อมสภาพลง ส่วนในสถานะต่าง Ascorbic acid มีความสามารถรีดิวซ์ได้ดี ทำให้เกิดการรีดิวซ์ให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมเกิดขึ้นได้ แต่สารสกัดกระเทียม อาจไม่เสถียรในสถานะ pH ต่าง จึงอาจส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ได้



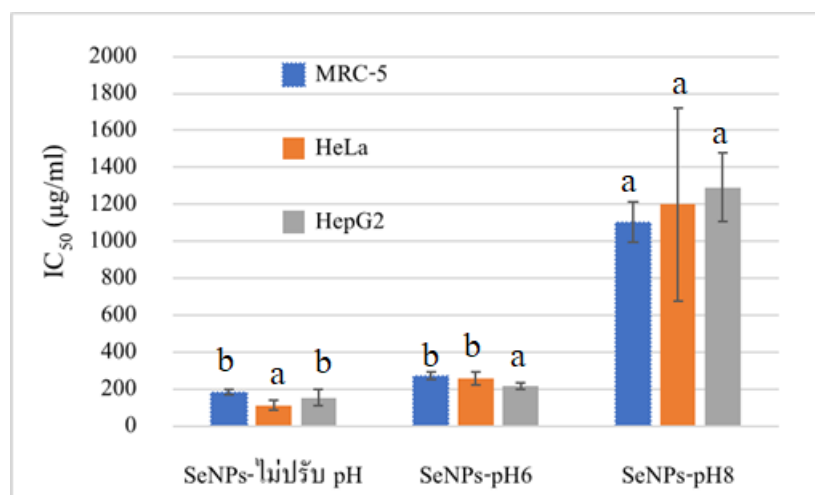
รูปที่ 21 สารละลายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ไม่ปรับ pH (A), pH 6 (B) และ pH 8 (C)



รูปที่ 22 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ปรับ pH 6, 8 และไม่ปรับ pH ที่เวลาบ่ม 72 h

อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ เมื่อผ่านการ Sonicate นำไปกรองให้ปลอดเชื้อ แล้วนำทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งที่เทียบกับเซลล์ปกติ พบว่าสภาวะที่ไม่ปรับ pH มีความเป็นพิษน้อยกว่าต่อเซลล์ปกติ(MRC-5) และมะเร็งตับ (HepG2) และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบบจำเพาะกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) โดยให้ค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์ปกติ, เซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับ เท่ากับ  $183.52 \pm 13.16$ ,  $110.27 \pm 26.56$  และ  $152.01 \pm 44.1$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ โดยมีการยับยั้ง HeLa ได้ดีอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ไม่มีผลแตกต่างต่อ HepG2 (รูปที่ 23 ซ้าย) ในขณะที่อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสภาวะการปรับ pH 6 มีแนวโน้มยับยั้ง HepG2 อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 23 กลาง) และ pH 8 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบไม่จำเพาะ โดยมีผลเป็นพิษกับทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติไม่แตกต่างกันมาก และเมื่อคำนวณความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากค่า Selective index (SI) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะไม่ปรับ pH, pH 6 และ pH 8 จากค่า

IC<sub>50</sub> ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก ได้ 1.66±0.37, 1.05±0.14 และ 0.92±0.16 ตามลำดับ เห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะไม่ปรับ pH มีความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างปลอดภัยที่สุด ซึ่งอาจเนื่องจากฤทธิ์ของ Allicin เสื่อมลงที่ pH เป็นต่าง จึงส่งผลให้ยับยั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติไม่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงเลือกใช้สภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ไม่ได้ปรับ pH ในการศึกษาต่อไป

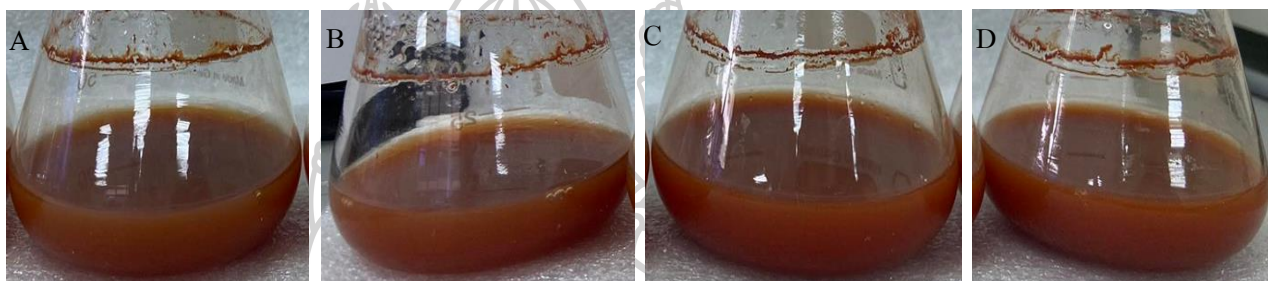


รูปที่ 23 ค่า IC<sub>50</sub> ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ปรับ pH ต่างกันที่เวลาบ่ม 72 h ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย IC<sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

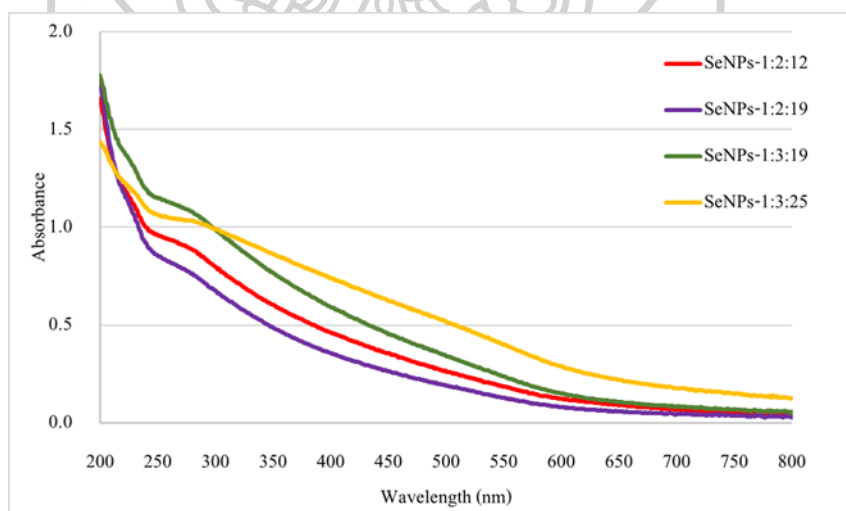
#### 4.3 สัดส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม (W/W) (ภาคผนวก ก.) ที่ 1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 และ 1:3:25 โดยสภาวะ 1:2:12 และ 1:2:19 ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 20 mg/ml และ 33 mg/ml และ Sodium selenite 10 mM ค่อยๆหยด Ascorbic acid 80 mM ทุก 10 นาที จนครบ 4.4 ml ส่วนในสภาวะ 1:3:19 และ 1:3:25 ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 33 mg/ml และ 43 mg/ml ละลายใน 10 mM Sodium selenite ปริมาตร 20 ml ค่อยๆหยด 80 mM Ascorbic acid ทุก 10 นาที จนครบ 6.9 ml บ่มบน shaker ที่อัตราเขย่า 180 rpm ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 72 h พบทุกสภาวะสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงส้ม ดังรูปที่ 24 โดย 1:2:12 (A), 1:2:19 (B), 1:3:19 (C)

และ 1:3:25 (D) เมื่อนำอนุภาคไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งและวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วง 200-800 nm ด้วยเครื่อง UV -Vis spectrophotometer พบว่าสภาวะการสังเคราะห์ทั้งหมดมีสเปกตรัมที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงที่อยู่ในช่วง 260-280 nm (รูปที่ 25) สารละลายทุกสภาวะที่สังเคราะห์แขวนลอยดี ยกเว้นในสภาวะ 1:3:25 ซึ่งมีตะกอนน้อยที่สุดที่ด้านล่างของภาชนะ ในขณะที่สภาวะ 1:2:19 มีตะกอนมากที่สุด หมายความว่าสภาวะ 1:3:25 อาจมีสารสกัดกระเทียมมากขึ้นสำหรับการเปลี่ยน  $\text{Se}^{4+}$  เป็น  $\text{Se}^0$  และหุ้มอนุภาคซึ่งทำให้อนุภาคมีความเสถียรและกระจายตัวได้ดี ซึ่งเป็นลักษณะที่ต้องการสำหรับความเสถียรของอนุภาค และปริมาณการหุ้มอาจมีบทบาททั้งในด้านความเสถียรและขนาดอนุภาค (Qiu *et al.*, 2018)

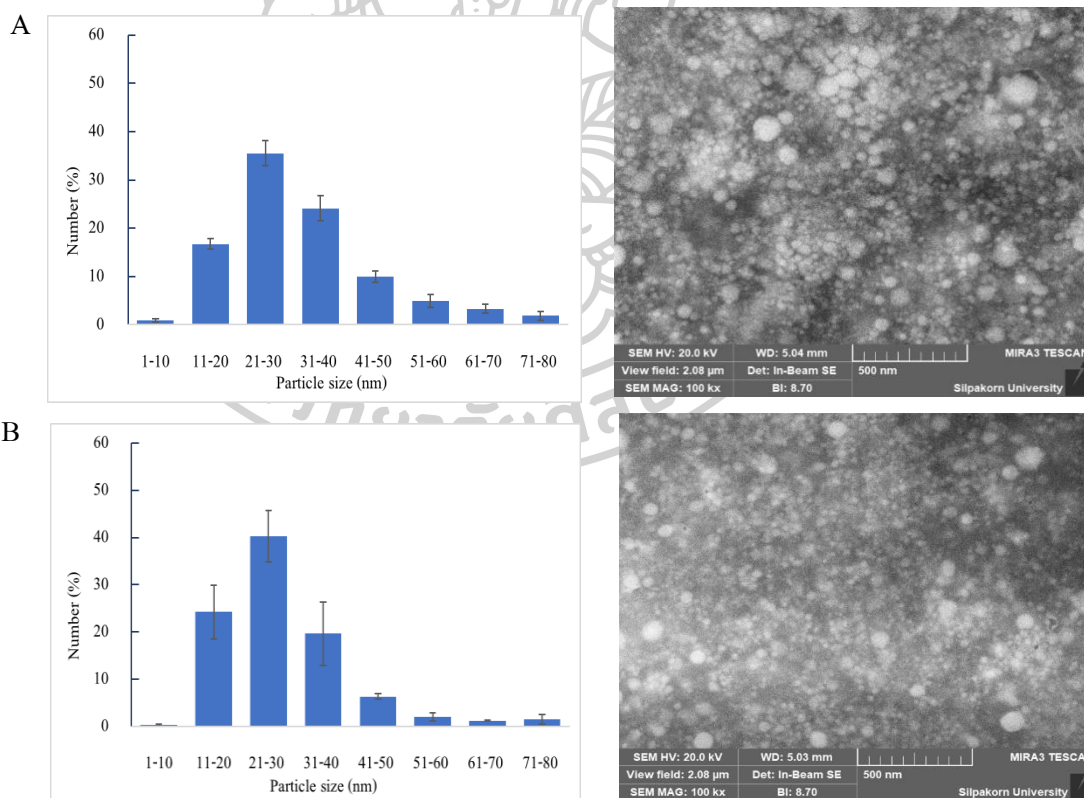


รูปที่ 24 สารละลายของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ 1:2:12 (A), 1:2:19 (B), 1:3:19 (C) และ 1:3:25 (D)

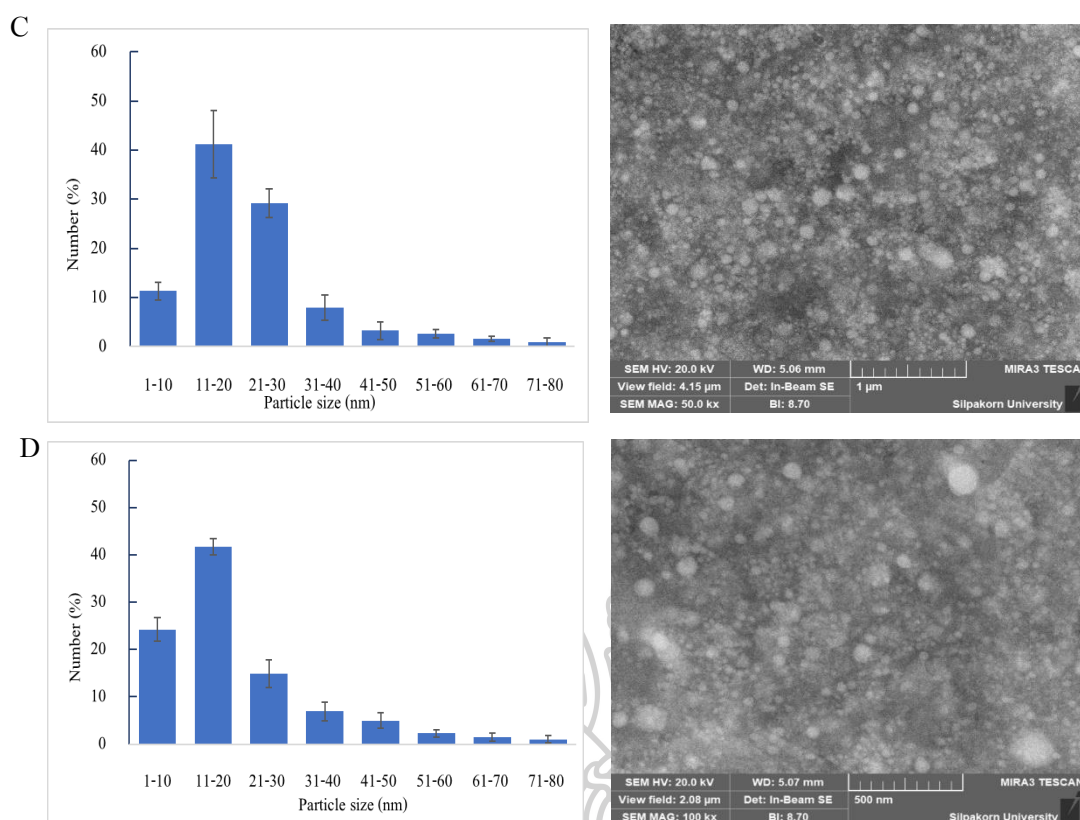


รูปที่ 25 UV-Vis spectra ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม

เมื่อนำอนุภาคนาโนซีลีเนียมมาตรวจขนาดและลักษณะรูปร่างด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) และวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยโปรแกรม Image-J พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สภาวะ 1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 และ 1:3:25 มีรูปร่างทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 21-40 nm, 11-40 nm, 11-30 nm และ 1-20 nm ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารสกัดกระเทียมที่สูงขึ้น (1:3:25 เทียบกับ 1:3:19) และปริมาณ Ascorbic acid ที่สูงขึ้น (1:3:19 เทียบกับ 1:2:19) ให้อนุภาคที่ขนาดเล็กลง (รูปที่ 26) โดยปริมาณสารหุ้มมีบทบาทต่อความเสถียรและขนาดของอนุภาคด้วย ซึ่ง Qiu *et al.* (2018) ศึกษาปรับสัดส่วนของ Se และ Pectin ในช่วงต่างๆ พบว่าที่สัดส่วน 1:2 เป็นสัดส่วนเหมาะสมให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมเกิดขึ้นเป็นปริมาณมาก อนุภาคมีความเสถียร และมีขนาดเล็ก ขณะที่สารหุ้มที่มากเกินไป หรือ ซีลีเนียมที่มากเกินไปจะทำให้มีขนาดใหญ่ได้ และมีรายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดพืชเพิ่มมากขึ้นในช่วงที่เหมาะสม ส่งผลให้อนุภาคนาโนมีขนาดเล็กลง (Patil and Muthusamy, 2017)



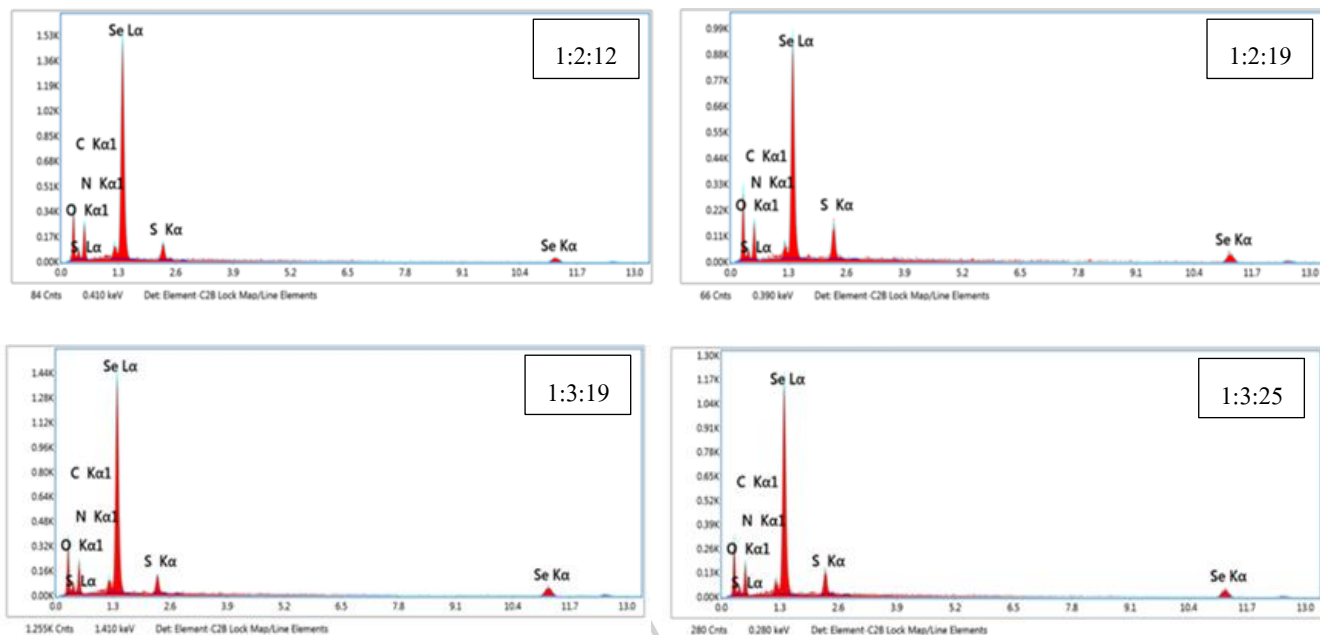




รูปที่ 26 ลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ 1:2:12 (A), 1:2:19 (B), 1:3:19 (C) และ 1:3:25 (D) จาก Scanning Electron Microscope (SEM)

เมื่อวิเคราะห์ธาตุในอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วยเครื่อง Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) พบ Selenium ที่ตำแหน่งประมาณ 1.4 keV ในทุกอนุภาคที่สังเคราะห์ที่สภาวะต่าง ๆ ดังรูปที่ 27 ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Vyas and Rana (2017b) ที่รายงานว่าธาตุ Selenium จากอนุภาคนาโนซีลีเนียมพบที่ตำแหน่งประมาณ 1.4 keV นอกจากนี้ยังพบธาตุ Sulfur, Carbon, Nitrogen และ Oxygen ซึ่ง Sulfur เป็นธาตุที่พบในพืชตระกูลกระเทียม แสดงถึงอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์มีธาตุซีลีเนียมและสารสกัดกระเทียมเป็นองค์ประกอบ และสอดคล้องกับรายงานของ Anu *et al.* (2016) ที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจาก Sodium selenite และสารสกัดกระเทียม โดยมีปริมาณซีลีเนียมและธาตุ C, N, O และ S ในอนุภาค ตามตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าปริมาณซีลีเนียม 31.36-35.17% โดยสภาวะ 1:3:25 มีผลให้มีปริมาณซีลีเนียมในอนุภาคน้อยที่สุด อาจเนื่องจากการรีดิวซ์และหุ้มซีลีเนียมอย่างรวดเร็วด้วย Ascorbic acid และสารสกัดกระเทียม ตามลำดับ ทำให้มีสัดส่วนซีลีเนียมในอนุภาคลดลง





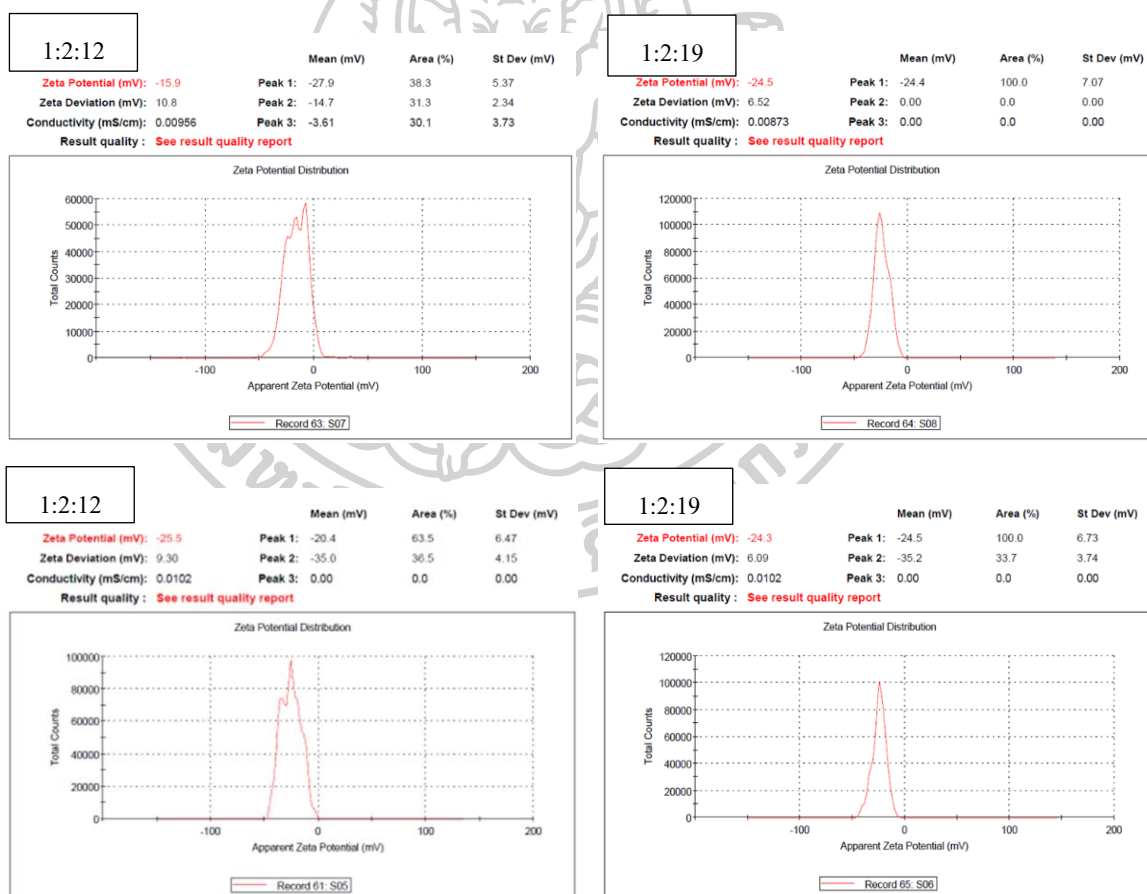
รูปที่ 27 ผลวิเคราะห์ EDS ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม

ตารางที่ 5 ปริมาณธาตุในอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม

%ธาตุ \ SeNPs	1:2:12	1:2:19	1:3:19	1:3:25
C	34.06±0.82	37.84±0.90	34.53±0.70	37.12±0.12
N	10.34±0.49	8.86±0.90	10.83±0.48	10.66±0.48
O	18.89±1.58	15.08±0.90	16.43±0.47	17.04±0.47
S	2.97±0.24	4.7±0.13	3.06±0.13	3.82±0.13
Se	33.24±1.27	33.57±2.08	35.17±0.39	31.36±0.39

การวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคนาโนซีลีเนียมด้วย Zeta potential พบว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในสภาวะต่าง ๆ ได้ผลดังรูปที่ 28 โดยให้ค่าศักย์ซีต้าเป็น -25.5±9.30, -24.3±6.09, -15.9±10.8 และ -24.5±6.52 mV ตามลำดับ และมีค่า PDI เท่ากับ 0.190, 0.205, 0.390 และ 0.292 ตามลำดับ ซึ่งพิจารณาได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมในทุกสภาวะมีประจุเป็นลบที่ผิว และ

มีความเสถียรอยู่ในระดับปานกลาง (Moderately stable) และไม่เกาะกลุ่มกันในอนุภาคที่สังเคราะห์ที่สภาวะ 1:2:12, 1:2:19 และ 1:3:25 เนื่องจากมีค่าศักย์ซีต้าอยู่ในช่วง  $\pm(20-30 \text{ mV})$  ในขณะที่อนุภาคนาโนซีลีเนียม 1:3:19 มีความเสถียรอยู่ในระดับค่อนข้างเสถียร (relatively stable) เนื่องจากมีค่าศักย์ซีต้าอยู่ในช่วง  $\pm(10-20 \text{ mV})$  (Bhattacharjee, 2016) ที่อาจมีการเกาะกลุ่มได้เล็กน้อย และค่า PDI แสดงให้เห็นถึงความเป็นเนื้อเดียวกันของสารละลายและการกระจายตัวของอนุภาค ค่าที่ต่ำกว่า 0.5 ถือเป็นค่า Monodispersed และค่าที่สูงกว่า 0.7 ถือว่าเป็นค่า Polydispersed (dos Santos Souza *et al.*, 2022) จากผลที่ได้พบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ในทุกสภาวะมีการกระจายตัวดีในสารละลาย เนื่องจากมีค่า PDI ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์มีค่าน้อยกว่า 0.5 จึงบ่งชี้ได้ว่าอนุภาคนาโนที่เกิดขึ้นนั้นเป็นเนื้อเดียวกันและกระจายตัวได้ดีแบบ Monodispersed โดยเป็นอนุภาคที่สังเคราะห์มาได้ 2 สัปดาห์

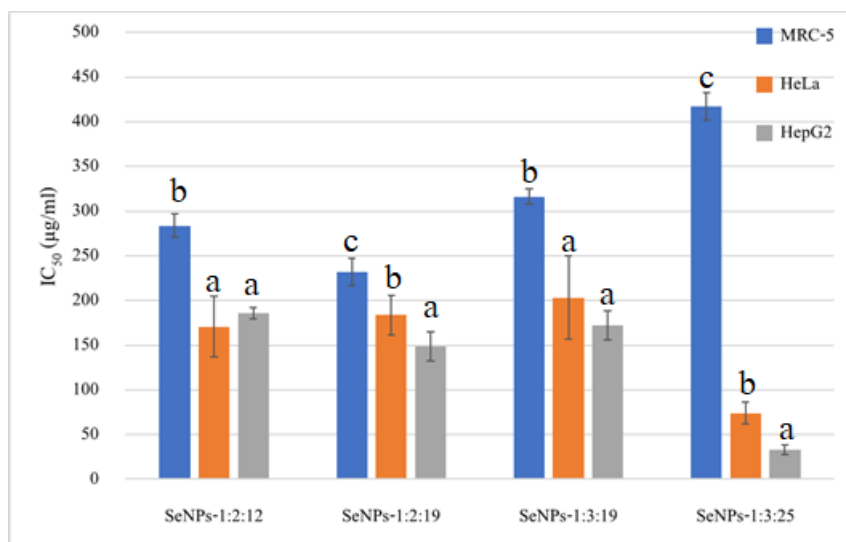


รูปที่ 28 วิเคราะห์ Zeta potential ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม

ส่วนอนุภาคที่สังเคราะห์ในสภาวะเดียวกันและเก็บในสารละลายน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 6 เดือน จะให้ค่าศักย์ซีต้าเป็น  $-17.4\pm 5.79$ ,  $-9.22\pm 6.09$ ,  $-9.14\pm 5.18$  และ  $-19.4\pm 9.32$  mV ตามลำดับ และมีค่า PDI เท่ากับ 0.256, 0.273, 0.245 และ 0.215 ตามลำดับ ที่แสดงให้เห็นว่าอนุภาคจากการสังเคราะห์ที่สภาวะ 1:2:12 และ 1:3:25 ซึ่งมีค่าศักย์ซีต้าอยู่ในช่วง  $\pm 10$ – $20$  mV ที่ ยังคงมีความเสถียรบ้าง ขณะที่อนุภาคจากการสังเคราะห์ 1:2:19 และ 1:3:19 ไม่มีความเสถียร ตามเกณฑ์ที่ระบุโดย Bhattacharjee (2016) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเข้อนุภาคในน้ำ มีผลให้สารสกัดกระเทียมเสื่อมหรือถูกชะออกตามเวลาการแช่ ทำให้ส่วนหุ้มลดลง และก่อให้เกิดความเสถียรลดลงตามเวลา อย่างไรก็ตาม อนุภาคที่เก็บเป็นเวลานาน 6 เดือน ยังคงมีค่า PDI ต่ำกว่า 0.5 ที่ระบุว่าอนุภาคยังเป็น Monodispersed การเก็บอนุภาคให้คงความเสถียรจึงอาจเก็บในสภาวะแห้งที่ลดการเสื่อมของสารหุ้มได้

อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ 1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 และ 1:3:25 เมื่อผ่านการ sonicate นำไปกรองให้ปลอดเชื้อ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเทียบกับเซลล์ปกติ พบว่าในทุกสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะ แต่จะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:3:19 และ 1:3:25 มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ต่ำกว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:2:12 และ 1:2:19 (รูปที่ 29) โดยค่า  $\text{IC}_{50}$  ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:3:19 ของเซลล์ปกติ, เซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับ เท่ากับ  $315.97\pm 8.58$ ,  $203.07\pm 46.38$  และ  $172.04\pm 16.19$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และค่า  $\text{IC}_{50}$  ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:3:25 ของเซลล์ปกติ, เซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับ เท่ากับ  $417.04\pm 15.51$ ,  $73.85\pm 12.38$  และ  $32.83\pm 5.22$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:3:25 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ทั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับมากกว่าอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:3:19 อาจบ่งบอกถึงบทบาทของตัวเริ่มปฏิกิริยาและสารหุ้มอนุภาคที่มากขึ้นส่งผลให้อนุภาคมีขนาดเล็กและก่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น ในขณะที่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติลดลง และเมื่อคำนวณความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากค่า Selective index (SI) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 และ 1:3:25 จากค่า  $\text{IC}_{50}$  ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก ได้  $1.71\pm 0.35$ ,  $1.27\pm 0.09$ ,  $1.64\pm 0.48$  และ  $5.76\pm 0.97$  ตามลำดับ และคำนวณความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากค่า Selective index (SI) ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 และ 1:3:25 จากค่า  $\text{IC}_{50}$  ของเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็งตับ ได้  $1.53\pm 0.08$ ,  $1.57\pm 0.12$ ,  $1.85\pm 0.19$  และ

12.93±1.90 ตามลำดับ เห็นได้ว่าสภาวะการสังเคราะห์ที่ 1:3:25 มีความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างปลอดภัยที่สุด ผู้วิจัยจึงได้นำอนุภาคที่สภาวะการสังเคราะห์นี้ไปศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งร่วมกับ Sodium selenite, Garlic extract, Tamoxifen ต่อไป



รูปที่ 29 ค่า  $IC_{50}$  ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย  $IC_{50}$  ของแต่ละเซลล์ในแต่ละสภาวะจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

#### 4.4 ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของ Sodium selenite, Garlic extract, Tamoxifen และอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (SeNPs-1:3:25)

Tamoxifen (TAM) เป็นยาต้านมะเร็งชนิด Non-steroidal anti-estrogen ที่ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด Estrogen receptor ซึ่งมีผลเสียจากการใช้ยาในปัจจุบัน เนื่องจากอาจให้ผลการรักษาได้ไม่ดี หากเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยมีทั้งประเภทที่มี Estrogen receptor และไม่มี (บวกและลบ) อยู่ด้วยกัน ดังการศึกษาของ Bachmann-Moisson *et al.* (1996) ที่ทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านมที่มี Estrogen receptor หลากหลายชนิด (MDA-MB 231 (ER-), MCF-7 R (ER-), T47D (ER+), ZR-75/1 (ER+) and MCF-7 (ER+)) นอกจากนี้ พบผู้ป่วยมีความเสี่ยงเป็นมะเร็งโพรงมดลูกและมะเร็งตับจากการใช้ยา Tamoxifen ทำให้มีการศึกษาสารต้านมะเร็งทางเลือกจากอนุภาคนาโนซีลีเนียมในงานวิจัยนี้ การศึกษากับเซลล์มะเร็ง HeLa, HepG2 เทียบกับเซลล์ปกติ MRC5 พบว่า Tamoxifen มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa และ HepG2 ไม่แตกต่างกัน ที่  $IC_{50}$  11.45±0.11 และ

11.60±0.37 µg/ml ตามลำดับ ขณะเดียวกันก็เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ MRC-5 ด้วยที่ IC<sub>50</sub> 13.66±0.41 µg/ml (รูปที่ 30 Tamoxifen) และให้ความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม โดยให้ค่า Selective index ต่อ HeLa และ HepG2 ที่ 1.19±0.03 และ 1.18±0.06 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานการศึกษาของ Bachmann-Moisson *et al.* (1996), Petinari *et al.* (2004) และ Zakaria *et al.* (2009) ที่รายงานว่า Tamoxifen มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีและไม่มี Estrogen receptor โดยมีกลไกการยับยั้งเซลล์ที่ไม่ขึ้นกับ Estrogen receptor (Bachmann-Moisson *et al.*, 1996) โดย Tamoxifen มีผลให้เซลล์ปกติตายมากกว่าเซลล์มะเร็งเต้านม โดยให้ค่า IC<sub>50</sub> ต่อ Chinese hamster lung fibroblasts (V79) ที่ 2.08 µM ขณะที่ เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมต่ำกว่ากับเซลล์มะเร็ง UACC62, MCF-7, NCI-460, OVCAR-03, PC-03, HT-29, 786-0 และ NCI-ADR โดยให้ค่า IC<sub>50</sub> ที่ 12.66, 12.59, 6.07, 14.52, 4.70, 9.30, 20.59, 15.83 µM ตามลำดับ (Petinari *et al.*, 2004) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Zakaria *et al.* (2009) ที่รายงานการไม่มีฤทธิ์จำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของ Tamoxifen เช่นกัน โดยมีผล IC<sub>50</sub> ต่อเซลล์มะเร็ง HepG2 และ HeLa ที่ 3.7±0.28 และ 2.7±0.18 µg/ml ขณะที่ มีผลต่อเซลล์ปกติ Chang's liver และ CCD114sk ที่ 1.4±0.31 และ 2.8±0.21 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งจากผลงานวิจัยนี้พบว่า Tamoxifen มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเซลล์ปกติ แต่ก็มีฤทธิ์จำเพาะต่ำต่อเซลล์มะเร็ง

กระเทียมมีสารพิษหลากหลายทั้ง Alliin, Alliin, Ajoene, Allyl methyl trisulfide, Diallyl sulfide (DAS), Diallyl disulfide (DADS) และ Diallyl trisulfide (DATS) ที่สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งในระยะต่างๆ ได้ดี จากสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ด้านการกลายพันธุ์ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซ่อมแซม DNA และกระตุ้นเซลล์ผิดปกติให้เกิด Apoptosis และตายไป ทำให้มีแนวโน้มนำกระเทียมสกัดมาใช้บำบัดรักษามะเร็ง (Zhang *et al.*, 2020) โดย Alliin และ Diallyl thiosulfinate หรือ Diallyl disulfide เป็นสารที่มีปริมาณมากในกระเทียมและเป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี (Lawson, 1998; Lee *et al.*, 2013) Ghazanfari *et al.* (2011) รายงานว่ากระเทียมสกัดสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง Human breast adenocarcinoma (MCF-7) cell line, Human gastric adenocarcinoma (AGS) cell line และ Human colon adenocarcinoma (HT-29) cell line ได้ดีกว่าเซลล์ปกติ Mouse connective tissue fibroblast (L929) cell line โดยให้ค่า IC<sub>50</sub> ที่ 3.087, 2.488, ≥5 และ , ≥5 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลจากสารสกัดกระเทียมกระตุ้นการเกิด ROS ในเซลล์มะเร็ง แล้วทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ Apoptosis (Das *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในงานวิจัยนี้ได้ใช้กระเทียมผงสกัด และพบว่าสารละลายของกระเทียมผงสกัดสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2

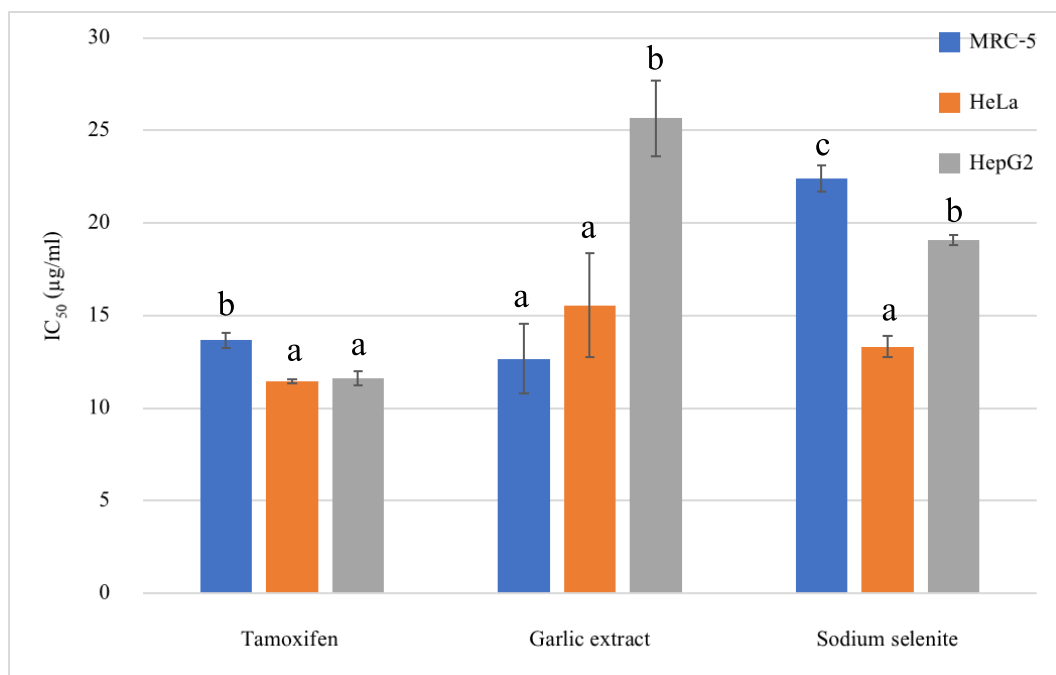


และ HeLa ได้ โดยให้ค่า  $IC_{50}$  ที่  $25.62 \pm 2.03$  และ  $15.54 \pm 2.81$  mg/ml แต่สารละลายกระเทียมผงมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ปกติ MRC-5 ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็ง ให้ค่า  $IC_{50}$  ที่  $12.67 \pm 1.86$  mg/ml (รูปที่ 30 Garlic extract) เห็นได้ว่าสารจากกระเทียมผงมีฤทธิ์จำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่ำ และยับยั้งทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง อาจโดยการกระตุ้นให้เกิด ROS ในเซลล์ ซึ่งเซลล์ปกติจะมีความสามารถต้านภาวะเครียดออกซิเดชันต่ำกว่า จึงมีความไวในการถูกทำลายให้ตายด้วยสารสกัดกระเทียมมากกว่าเซลล์มะเร็ง ซึ่งการไม่มีฤทธิ์จำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง อาจเนื่องจากสารสกัดกระเทียมที่ผ่านการทำแห้ง หรือเก็บไว้นานจะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเสื่อมลง (Petrovic *et al.*, 2018) สอดคล้องกับการศึกษาของ Farías-Campomanes *et al.* (2014) ที่พบว่ากระเทียมสดมีปริมาณ Allicin มากและจะมีปริมาณลดลงในกระเทียมผง หรือกระเทียมที่ผ่านกระบวนการสกัด จากการที่ Allicin ถูกทำลายได้อย่างรวดเร็วเมื่อได้รับความร้อนหรือ สารละลายสกัด จึงอาจนำกระเทียมผงที่มีฤทธิ์อ่อนลงมาสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมให้มีฤทธิ์ยับยั้งสูงขึ้นได้ ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่ากระเทียมที่มีปริมาณซีลีเนียมสูงหรือมีสารประกอบ Organoselenium ในปริมาณมาก จะสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากกว่ากระเทียมสดที่มี Organosulfur ในระดับใกล้เคียง (Tsubura *et al.*, 2011) แสดงถึงธาตุซีลีเนียมมีบทบาทให้เกิดการยับยั้งเซลล์มะเร็งดีกว่ากำมะถันหรือ Sulfur

ซีลีเนียมมีบทบาทยับยั้งและป้องกันมะเร็งได้ จึงมีแนวโน้มนำ Sodium selenite มาใช้เป็นสารยับยั้งมะเร็ง (Lipinski, 2017) ซึ่งการให้ Sodium selenite ระดับทนได้ที่ 5 mg กับผู้ป่วยมะเร็งระยะสุดท้าย มีผลให้มีซีลีเนียมในซีรัมต่ำกว่า 260  $\mu\text{g/ml}$  ภายใน 24 h หลังการฉีด การให้ Sodium selenite ระดับสูงในเวลาสั้นๆ ซึ่งส่งผลให้มีการดูดซับ Sodium selenite ในเซลล์มะเร็ง และก่อนความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติจากการกระตุ้นให้เกิด ROS ภายในเซลล์ (Kim *et al.*, 2021) ซึ่งการศึกษาในหลอดทดลองใช้ Sodium selenite กับเซลล์มะเร็งตับ HepG2 พบว่า Sodium selenite สามารถกระตุ้นเซลล์ให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและตายแบบ Apoptosis (Shen *et al.*, 1999) และทำให้เซลล์มะเร็ง HeLa เกิดการตายแบบ Apoptosis เช่นกัน ผ่าน ROS-mediated mitochondrial pathway (Fu *et al.*, 2011) แต่ไม่มีข้อมูลผลของ Sodium selenite ต่อเซลล์ปกติในหลอดทดลอง การศึกษาผลความเป็นพิษของ Sodium selenite ต่อเซลล์มะเร็ง HepG2 และ HeLa เทียบกับเซลล์ปกติ MRC-5 ในงานวิจัยนี้พบว่า Sodium selenite มีคุณสมบัติเป็นยาต้านมะเร็งได้ดี โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเซลล์ปกติ ด้วยค่า  $IC_{50}$  ต่อ HepG2, HeLa และ MRC-5 ที่  $19.08 \pm 0.29$ ,  $13.31 \pm 0.57$  และ  $22.41 \pm 0.72$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ (รูปที่ 30 Sodium selenite) ซึ่งให้เกิดการยับยั้งมะเร็งอย่างจำเพาะที่ Selective index ต่อ HepG2 และ HeLa เป็น  $1.17 \pm 0.02$  และ



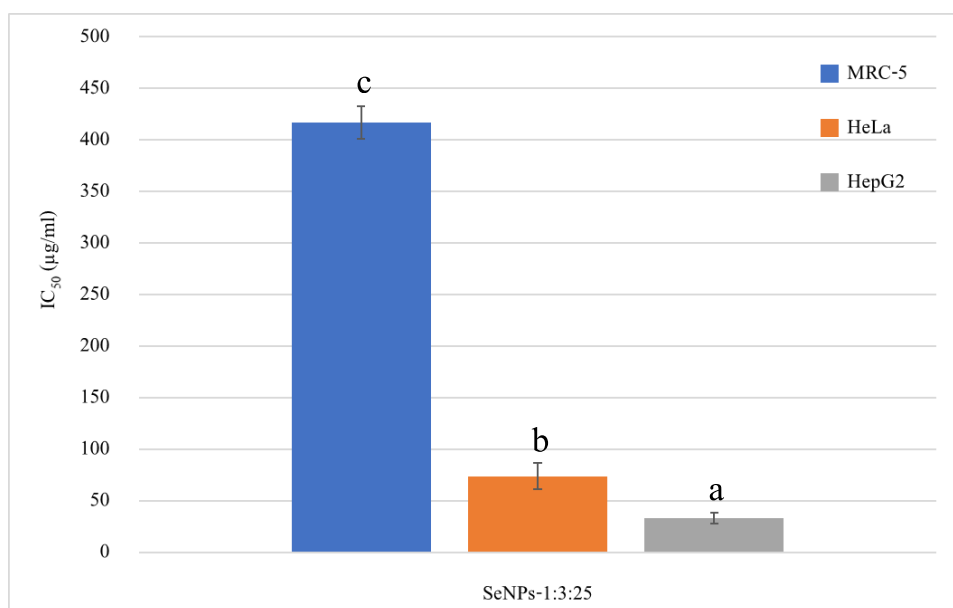
1.68±0.04 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การให้ Sodium selenite ในปริมาณสูงสามารถก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ได้สูง การลดระดับพิษให้ต่ำลง ด้วยการสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม จึงเป็นที่สนใจในงานวิจัยนี้



รูปที่ 30 ค่า  $IC_{50}$  ของ Tamoxifen, สารสกัดกระเทียมและ Sodium selenite ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย  $IC_{50}$  ของแต่ละเซลล์จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่สังเคราะห์ได้จากการปรับสัดส่วนของ Ascorbic acid และ Garlic extract ให้มีสัดส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม เป็น 1:3:25 จะมีผลยับยั้งเซลล์มะเร็ง HeLa และ HepG2 ได้ดีกว่า MRC-5 โดยมีค่า  $IC_{50}$  ต่อ MRC-5, HeLa และ HepG2 ที่  $417.04 \pm 15.51$ ,  $73.85 \pm 12.38$  และ  $32.83 \pm 5.22$  µg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 31) ซึ่งให้เกิดการยับยั้งมะเร็งอย่างจำเพาะที่ Selective index ต่อ HepG2 และ HeLa เป็น  $12.93 \pm 1.90$  และ  $5.76 \pm 0.97$  ตามลำดับ เห็นได้ว่า อนุภาคที่เกิดขึ้นสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสารสกัดกระเทียม และ Tamoxifen โดยมีฤทธิ์ยับยั้งในแนวโน้มเดียวกันกับ Sodium selenite จึงคาดว่าความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะของอนุภาคจะเป็นผลจาก Sodium selenite ที่เป็นสารองค์ประกอบในอนุภาค ซึ่งอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่ได้ อาจมีกลไกยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ผ่านการกระตุ้นให้เกิด ROS ที่ก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ที่ทำให้เกิดการทำลายเซลล์และให้เซลล์มะเร็งตาย จากการที่เซลล์ปกติเป็นเซลล์ที่มีเมตาโบลิซึมต่ำกว่าเซลล์มะเร็ง ปริมาณ ROS ที่เกิดในเซลล์ปกติจึงไม่มีผลให้เซลล์ตายมากเหมือนในเซลล์มะเร็ง ที่ส่งผลให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเกิดขึ้น

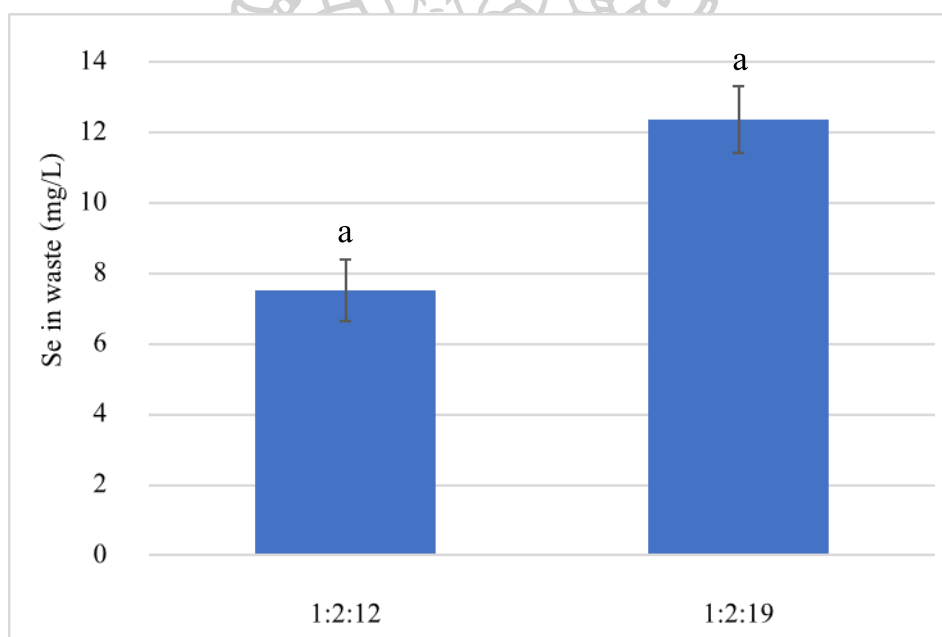


รูปที่ 31 ค่า IC<sub>50</sub> ของอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม (SeNPs-1:3:25) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์ปกติ (MRC-5) โดย IC<sub>50</sub> ของแต่ละเซลล์จะแตกต่างกันมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

#### 4.5 วิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมตกค้างในสารละลายจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม

วิเคราะห์ปริมาณตกค้างของ Sodium selenite ในสารละลายปฏิบัติการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสารสกัดกระเทียม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ 1:2:12, 1:2:19, 1:3:19 และ 1:3:25 หลังปั่นเหวี่ยงตะกอนอนุภาคนาโน นำสารละลายมาทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Narayana *et al.* (2003) ด้วยการใช้แป้งและไอโอดีนเป็นสารสี โดยปฏิกิริยาของซีลีเนียมกับ 2% Potassium iodide ในสถานะที่เป็นกรดจะปลดปล่อยไอโอดีน และสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินด้วยการเติมสารละลายแป้งทันทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Sodium selenite ที่แสดงในภาคผนวก ข. พบว่าสารละลายที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:2:12 และ 1:2:19 มี

ปริมาณซีลีเนียมตกค้างในสารละลายเท่ากับ  $7.53 \pm 0.88$  และ  $12.35 \pm 0.94$  mg/L (รูปที่ 32) แสดงถึงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ห่อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม มีการใช้ Sodium selenite ให้อยู่ในรูปของอนุภาคนาโนซีลีเนียมเป็นร้อยละ  $99.13 \pm 0.11$  และ  $98.57 \pm 0.12$  ตามลำดับ ขณะที่สารละลายหลังการสังเคราะห์ห่อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่สภาวะ 1:3:19 และ 1:3:25 ไม่สามารถตรวจวัดซีลีเนียมได้แม้ไม่ได้เจือจางสารละลายมาทำการวิเคราะห์ แสดงถึงสารละลายมีสารตกค้างของซีลีเนียมในระดับที่ต่ำ ซึ่งมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งของ กระทรวงอุตสาหกรรม (2560) กำหนดให้มีปริมาณซีลีเนียมในน้ำทิ้งได้ไม่เกิน 0.02 mg/L แสดงถึงกระบวนการสังเคราะห์ห่อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:3:25 เป็นสภาวะเหมาะสมที่ให้อนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งดี และเป็นสภาวะการสังเคราะห์ที่ก่อปัญหามลพิษจาก Sodium selenite ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ในระดับต่ำ



รูปที่ 32 ผลของปริมาณซีลีเนียมตกค้างในสารละลายจากการสังเคราะห์ห่อนุภาคนาโนซีลีเนียมในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ของแต่ละสภาวะการสังเคราะห์จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมในงานวิจัยนี้ใช้สภาวะการสังเคราะห์ที่มี Sodium selenite สารสกัดกระเทียมทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และสารหุ้ม ใช้ Ascorbic acid ร่วมเป็น Reducing agent ที่เร่งการเปลี่ยน  $Se^{4+}$  เป็น  $Se^0$  และใช้สารสกัดกระเทียมเป็นตัวหุ้ม  $Se^0$  ซึ่งการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมจากสภาวะปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม ที่ส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของอนุภาคนาโนซีลีเนียมที่สังเคราะห์ขึ้นและยังส่งผลให้ปริมาณ Sodium selenite ในสารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมตกค้างอยู่ในระดับต่ำ ผลพบว่า

1. สภาวะการสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเซลล์ปกติ คือ สภาวะการสังเคราะห์โดยใช้อัตราส่วนของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม ที่ 1:3:25 ไม่ปรับ pH ในระยะเวลา 72 h บน shaker ที่อัตราเขย่า 180 rpm ภายใต้สภาวะมืดที่อุณหภูมิห้อง
2. ปฏิกิริยาให้สารละลายอนุภาคสีแดง ดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 260-280 nm อนุภาคมีรูปทรงกลมขนาดประมาณ 1-20 nm
3. อนุภาคมีธาตุซีลีเนียมและกำมะถันเป็นองค์ประกอบจากการวิเคราะห์ด้วย EDS และการวิเคราะห์ด้วย FTIR เห็นกลุ่มฟังก์ชัน OH, C-H, C-O-H และ S = O ที่แสดงถึงการมีสารสกัดกระเทียมและซีลีเนียมอยู่ในอนุภาคร่วมกัน
4. การวิเคราะห์ด้วย Zeta potential ให้ค่าศักย์ซีต้าเป็น  $-24.5 \pm 6.52$  mV และค่า PDI เท่ากับ 0.292 บ่งบอกได้ว่าอนุภาคนาโนมีประจุเป็นลบที่ผิว มีความเสถียรอยู่ในระดับปานกลาง และกระจายตัวแบบ Monodispersed
5. อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ได้จากสภาวะ 1:3:25 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะและมีผลเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ ค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์ปกติ, เซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับ เท่ากับ  $417.04 \pm 15.51$ ,  $73.85 \pm 12.38$  และ

32.83±5.22 µg/ml ตามลำดับ และค่า Selective index ต่อ HepG2 และ HeLa เป็น 12.93±1.90 และ 5.76±0.97 ตามลำดับ

6. ปริมาณตกค้างของ Sodium selenite ในสารละลายปฏิกิริยาสภาวะ 1:3:25 พบว่าไม่สามารถตรวจวัดซีลีเนียมได้



## รายการอ้างอิง

- Al-Mamun, M. A., Kusumoto, Y. and Islam, M. S. (2011). Cytotoxicity and Cancer (HeLa) Cell Killing Efficacy of Aqueous Garlic (*Allium sativum*) Extract. *Journal of Scientific Research*, 3(2), 375-382. doi:10.3329/jsr.v3i2.6557
- Allan, C. B., Lacourciere, G. M. and Stadtman, T. C. (1999). RESPONSIVENESS OF SELENOPROTEINS TO DIETARY SELENIUM. *Annu. Rev. Nutr*, 19(1), 1-16.
- Anu, K., Singaravelu, G., Murugan, K. and Benelli, G. (2016). Green-Synthesis of Selenium Nanoparticles Using Garlic Cloves (*Allium sativum*): Biophysical Characterization and Cytotoxicity on Vero Cells. *Journal of Cluster Science*, 28(1), 551-563. doi:10.1007/s10876-016-1123-7
- Arthur, J. R. (1991). The role of selenium in thyroid hormone metabolism. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69(11), 1648-1652.
- Bachmann-Moisson, N., Barberi-Heyob, M., Merlin, J. L., Ledrich, M. L., Batt, A. M. and Guillemain, F. (1996). Cytotoxicity of tamoxifen and its principal metabolites in human breast cancer cell lines. *Bulletin du Cancer*, 83(10), 808-815.
- Barnaby, S., Sarker, N., Dowdell, A. and Bannerjee, I. (2011). The Spontaneous Formation of Selenium Nanoparticles on Gallic Acid Assemblies and their Antioxidant Properties. *The Fordham Undergraduate Research Journal*, 1(1), 41-46.
- Bhatt, A. and Patel, V. (2013). Antioxidant activity of garlic using conventional extraction and in vitro gastrointestinal digestion. *Free Radicals and Antioxidants*, 3(1), 30-34. doi:10.1016/j.fra.2013.03.003
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*, 235, 337-351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- Boivin, D., Lamy, S., Lord-Dufour, S., Jackson, J., Beaulieu, E., Côté, M., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D. and Béliveau, R. (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, 112(2), 374-380. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.084
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A. and Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, 111(4), 925-929.



doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.071

- Brodin, O., Eksborg, S., Wallenberg, M., Asker-Hagelberg, C., Larsen, E. H., Mohlkert, D., Lenneby-Helleday, C., Jacobsson, H., Linder, S., Misra, S. and Bjornstedt, M. (2015). Pharmacokinetics and Toxicity of Sodium Selenite in the Treatment of Patients with Carcinoma in a Phase I Clinical Trial: The SECAR Study. *Nutrients*, 7(6), 4978-4994. doi:10.3390/nu7064978
- Cai, Z., Zhang, J. and Li, H. (2019). Selenium, aging and aging-related diseases. *Aging Clin Exp Res*, 31(8), 1035-1047. doi:10.1007/s40520-018-1086-7
- Chen, T., Wong, Y. S., Zheng, W., Bai, Y. and Huang, L. (2008). Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 67(1), 26-31. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.07.010
- Das, A., Banik, N. L. and Ray, S. K. (2007). Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer*, 110(5), 1083-1095. doi:10.1002/cncr.22888
- Dechaphunkul, A., Chacranon, M., Chaiwiriyawong, S. and Sunpaweravong, P. (2011). Antihormonal Therapy in Breast Cancer. *Songkla Med J*, 29(3), 127-142.
- Deepa, B. and Ganesan, V. (2013). Biogenic Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles Using the Flower of *Bougainvillea spectabilis* Willd. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 4(1), 690-695.
- dos Santos Souza, L. M., Dibo, M., Sarmiento, J. J. P., Seabra, A. B., Medeiros, L. P., Lourenço, I. M., Kobayashi, R. K. T. and Nakazato, G. (2022). Biosynthesis of selenium nanoparticles using combinations of plant extracts and their antibacterial activity. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5. doi:10.1016/j.crgsc.2022.100303
- Durairaj, S., Srinivasan, S. and Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature. *Electronic Journal of Biology*, 5(1), 5-10.
- El-Refai, A. A., Ghoniem, G. A., El-Khateeb, A. Y. and Hassaan, M. M. (2018). Eco-friendly synthesis of metal nanoparticles using ginger and garlic extracts as biocompatible novel antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 8(1), 71-81.

doi:10.1007/s40097-018-0255-8

Ezhuthupurakkal, P. B., Polaki, L. R., Suyavaran, A., Subastri, A., Sujatha, V.

andThirunavukkarasu, C. (2017). Selenium nanoparticles synthesized in aqueous extract of *Allium sativum* perturbs the structural integrity of Calf thymus DNA through intercalation and groove binding. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 74, 597-608.

doi:10.1016/j.msec.2017.02.003

Fardsadegh, B., Vaghari, H., Mohammad-Jafari, R., Najian, Y. andJafarizadeh-Malmiri, H. (2019).

Biosynthesis, characterization and antimicrobial activities assessment of fabricated selenium nanoparticles using *Pelargonium zonale* leaf extract. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 191-198. doi:10.1515/gps-2018-0060

Farias-Campomanes, A. M., Horita, C. N., Pollonio, M. A. R. andMeireles, M. A. A. (2014).

Alliin-Rich Extract Obtained from Garlic by Pressurized Liquid Extraction: Quantitative Determination of Alliin in Garlic Samples. *Food and Public Health*, 4(6), 272-278.

doi:10.5923/j.fph.20140406.03

Fратиanni, F., Ombra, M. N., Cozzolino, A., Riccardi, R., Spigno, P., Tremonte, P., Coppola, R.

andNazzaro, F. (2016). Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Functional Foods*, 21, 240-248. doi:10.1016/j.jff.2015.12.019

Fu, L., Liu, Q., Shen, L. andWang, Y. (2011). Proteomic study on sodium selenite-induced

apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. *J Trace Elem Med Biol*, 25(3), 130-137.

doi:10.1016/j.jtemb.2011.06.001

Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Kumagai, H., Seki, T. andAriga, T. (2008). Biological and

Chemical Stability of Garlic-Derived Alliin. *J. Agric. Food Chem*, 56(11), 4229-4235.

Gangadoo, S., Stanley, D., Hughes, R. J., Moore, R. J. andChapman, J. (2017). The synthesis and

characterisation of highly stable and reproducible selenium nanoparticles. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 47(11), 1568-1576. doi:10.1080/24701556.2017.1357611

Ghazanfari, T., Yaraee, R., Rahmati, B., Hakimzadeh, H., Shams, J. andJalali-Nadoushan, M. R.

(2011). In vitro cytotoxic effect of garlic extract on malignant and nonmalignant cell lines.

*Immunopharmacol Immunotoxicol*, 33(4), 603-608. doi:10.3109/08923973.2011.551832

GoÂmez-Ariza, J. L., SaÂnchez-Rodas, D., Morales, E., Herrgott, O. andMarr, I. L. (1999).

- Inorganic and Organic Selenium Compound Speciation with Coupled HPLC-MW-HG-AFS. *APPLIED ORGANOMETALLIC CHEMISTRY*, 13(10), 783-787.
- Gunti, L., Dass, R. S. and Kalagatur, N. K. (2019). Phytofabrication of Selenium Nanoparticles From *Emblica officinalis* Fruit Extract and Exploring Its Biopotential Applications: Antioxidant, Antimicrobial, and Biocompatibility. *Front Microbiol*, 10, 931.  
doi:10.3389/fmicb.2019.00931
- Guo, R., Huang, Z., Shu, Y., Jin, S. and Ge, H. (2009). Tamoxifen inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 via down-regulation of survivin expression. *Biomed Pharmacother*, 63(5), 375-379.  
doi:10.1016/j.biopha.2008.09.010
- Kalishwaralal, K., Jeyabharathi, S., Sundar, K. and Muthukumar, A. (2016). Comparative analysis of cardiovascular effects of selenium nanoparticles and sodium selenite in zebrafish embryos. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 44(3), 990-996.  
doi:10.3109/21691401.2015.1008507
- Kapur, M., Soni, K. and Kohli, K. (2017). Green Synthesis of Selenium Nanoparticles from Broccoli, Characterization, Application and Toxicity. *Advanced Techniques in Biology & Medicine*, 05(01). doi:10.4172/2379-1764.1000198
- Keat, C. L., Aziz, A., Eid, A. M. and Elmarzugi, N. A. (2015). Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1). doi:10.1186/s40643-015-0076-2
- Kieliszek, M. and Lipinski, B. (2020). Selenium supplementation in the prevention of coronavirus infections (COVID-19). *Med Hypotheses*, 143, 109878. doi:10.1016/j.mehy.2020.109878
- Kieliszek, M., Lipinski, B. and Blazejak, S. (2017). Application of Sodium Selenite in the Prevention and Treatment of Cancers. *Cells*, 6(4). doi:10.3390/cells6040039
- Kim, S. J., Choi, M. C., Park, J. M. and Chung, A. S. (2021). Antitumor Effects of Selenium. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 1-12. doi:10.3390/ijms22210000
- Kirupakaran, R., Saritha, A. and Bhuvaneswari, S. (2016). Green Synthesis of Selenium Nanoparticles from Leaf and Stem Extract of *Leucas lavandulifolia* Sm. and Their Application. *Journal of Nanoscience and Technology*, 2(5), 224-226.
- Kokila, K., Elavarasan, N. and Sujatha, V. (2017). *Diospyros montana* leaf extract-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their biological applications. *New Journal of*

*Chemistry*, 41(15), 7481-7490. doi:10.1039/c7nj01124e

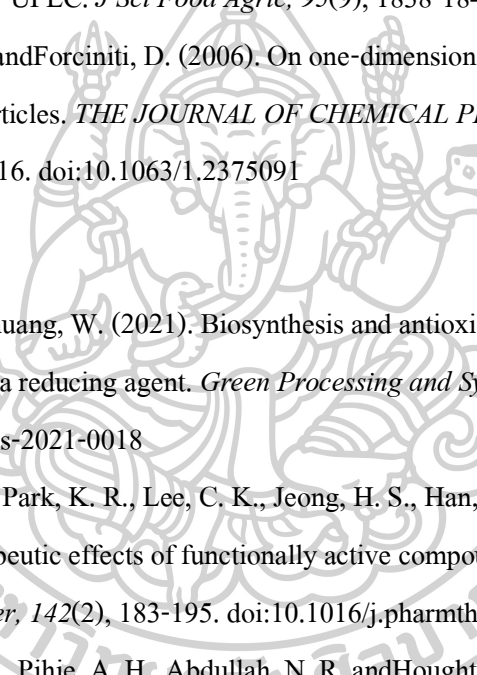
- Krishnan, V., Loganathan, C. andThayumanavan, P. (2019). Green synthesized selenium nanoparticles using *Spermacoce hispida* as carrier of s-allyl glutathione: to accomplish hepatoprotective and nephroprotective activity against acetaminophen toxicity. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47(1), 56-63. doi:10.1080/21691401.2018.1543192
- Lawson, L. D. (1998). Garlic: A Review of Its Medicinal Effects and Indicated Active Compounds. In *Phytomedicines of Europe* (pp. 176-209).
- Lee, J., Gupta, S., Huang, J. S., Jayathilaka, L. P. andLee, B. S. (2013). HPLC-MTT assay: anticancer activity of aqueous garlic extract is from allicin. *Anal Biochem*, 436(2), 187-189. doi:10.1016/j.ab.2013.01.033
- Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L. andZhang, Q. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. 9(8), 852-858.
- Li, Z., Le, W. andCui, Z. (2018). A novel therapeutic anticancer property of raw garlic extract via injection but not ingestion. *Cell Death Discov*, 4, 108. doi:10.1038/s41420-018-0122-x
- Lin, Z. H. andWang, C. C. R. (2005). Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 92(2-3), 591-594. doi:10.1016/j.matchemphys.2005.02.023
- Lipinski, B. J. A.-C. A. i. M. C. (2017). Sodium selenite as an anticancer agent. 17(5), 658-661.
- Luo, H., Yang, Y., Duan, J., Wu, P., Jiang, Q. andXu, C. (2013). PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to reactive oxygen species-mediated apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*, 4, e481. doi:10.1038/cddis.2013.3
- Meister, A. andAnderson, M. E. (1983). GLUTATHIONE. *Ann. Rev. Biochem*, 52(1), 711-760.
- Mellinas, C., Jimenez, A. andGarrigos, M. D. C. (2019). Microwave-Assisted Green Synthesis and Antioxidant Activity of Selenium Nanoparticles Using *Theobroma Cacao* L. Bean Shell Extract. *Molecules*, 24(22). doi:10.3390/molecules24224048
- Menon, S., K.S, S. D., Agarwal, H. andShanmugam, V. K. (2019). Efficacy of Biogenic Selenium Nanoparticles from an Extract of Ginger towards Evaluation on Anti-Microbial and Anti-Oxidant Activities. *Colloid and Interface Science Communications*, 29, 1-8. doi:10.1016/j.colcom.2018.12.004
- Narayana, B., Mathew, M., Gopalakrishna Bhat, N. andSreekumar, N. V. (2003).

- Spectrophotometric Determination of Selenium Using Potassium Iodide and Starch as Reagents. *Microchimica Acta*, 141(3-4), 175-178. doi:10.1007/s00604-002-0936-2
- Nikalje, A. P. (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry*, 5(2). doi:10.4172/2161-0444.1000247
- Patil, S. and Muthusamy, P. (2017). Effect of extract concentration and ageing on optical Properties of biological silver nanoparticles. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 8(3). doi:10.22376/ijpbs.2017.8.3.b686-690
- Petinari, L., Kohn, L. K., de Carvalho, J. E. and Genari, S. C. (2004). Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. *Cell Biol Int*, 28(7), 531-539. doi:10.1016/j.cellbi.2004.04.008
- Petrovic, V., Nepal, A., Olaisen, C., Bachke, S., Hira, J., Sogaard, C. K., Rost, L. M., Misund, K., Andreassen, T., Melo, T. M., Bartsova, Z., Bruheim, P. and Otterlei, M. (2018). Anti-Cancer Potential of Homemade Fresh Garlic Extract Is Related to Increased Endoplasmic Reticulum Stress. *Nutrients*, 10(4). doi:10.3390/nu10040450
- Prasad, K. S., Patel, H., Patel, T., Patel, K. and Selvaraj, K. (2013). Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 103, 261-266. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.029
- Prasad, K. S. and Selvaraj, K. (2014). Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As(III)-induced toxicity on human lymphocytes. *Biol Trace Elem Res*, 157(3), 275-283. doi:10.1007/s12011-014-9891-0
- Qiu, W. Y., Wang, Y. Y., Wang, M. and Yan, J. K. (2018). Construction, stability, and enhanced antioxidant activity of pectin-decorated selenium nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 170, 692-700. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.003
- Radomska, D., Czarnomysy, R., Radomski, D. and Bielawski, K. (2021). Selenium Compounds as Novel Potential Anticancer Agents. *Int J Mol Sci*, 22(3). doi:10.3390/ijms22031009
- Ramamurthy, C., Sampath, K. S., Arunkumar, P., Kumar, M. S., Sujatha, V., Premkumar, K. and Thirunavukkarasu, C. (2013). Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess Biosyst Eng*, 36(8), 1131-1139. doi:10.1007/s00449-012-0867-1
- Ramesh, P. S., Kokila, T. and Geetha, D. (2015). Plant mediated green synthesis and antibacterial



- activity of silver nanoparticles using *Emblica officinalis* fruit extract. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 142, 339-343. doi:10.1016/j.saa.2015.01.062
- Sahar, M. E. F., Abeer, E.-K. M. and Eltalawy, M. F. (2016). Antioxidant Potential and Toxicity of Garlic (*Allium sativum*). *Egypt. J. Chem. Environ. Health*, 2(2), 56-65.
- Satgurunathan, T. and Bhavan, P. S. (2017). Green synthesis of selenium nanoparticles from sodium selenite using garlic extract and its enrichment on *Artemia nauplii* to feed the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 21(10), 1-12.
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K. and Poinern, G. E. J. (2015). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Material*, 8(11), 7278-7308. doi:10.3390/ma8115377
- Sharma, G., Sharma, A. R., Bhavesh, R., Park, J., Ganbold, B., Nam, J. S. and Lee, S. S. (2014). Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried *Vitis vinifera* (raisin) extract. *Molecules*, 19(3), 2761-2770. doi:10.3390/molecules19032761
- Shen, H. M., Yang, C. F. and Ong, C. N. (1999). SODIUM SELENITE-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND APOPTOSIS IN HUMAN HEPATOMA HepG2 CELLS. *Int J Cancer*, 81(5), 820-828.
- Sonkusre, P. and Cameotra, S. S. (2017). Biogenic selenium nanoparticles induce ROS-mediated necroptosis in PC-3 cancer cells through TNF activation. *J Nanobiotechnology*, 15(1), 43. doi:10.1186/s12951-017-0276-3
- Sribenjarat, P., Jirakanjanakit, N. and Jirasripongpan, K. (2020). Selenium nanoparticles biosynthesized by garlic extract as antimicrobial agent. *Science, Engineering and Health Studies* 14(1), 22-31.
- Tsubura, A., Lai, Y. C., Kuwata, M., Uehara, N. and Yoshizawa, K. (2011). Anticancer Effects of Garlic and Garlic-derived Compounds for Breast Cancer Control. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(3), 249-253. doi:10.2174/187152011795347441
- Vrandecic, K., Cosic, J., Ilic, J., Ravnjak, B., Selmani, A., Galic, E., Pem, B., Barbir, R., Vinkovic Vrcek, I. and Vinkovic, T. (2020). Antifungal activities of silver and selenium nanoparticles stabilized with different surface coating agents. *Pest Manag Sci*, 76(6), 2021-2029. doi:10.1002/ps.5735



- Vyas, J. and Rana, S. (2017a). Antioxidant Activity and Biogenic Synthesis of Selenium Nanoparticles Using the Leaf Extract of Aloe Vera. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(4). doi:10.22159/ijcpr.2017v9i4.20981
- Vyas, J. and Rana, S. (2017b). Antioxidant activity and green synthesis of selenium nanoparticles using allium sativum extract. *International Journal of Phytomedicine*, 9(4). doi:10.5138/09750185.2185
- Wang, H., Li, X., Liu, X., Shen, D., Qiu, Y., Zhang, X. and Song, J. (2014). Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC. *J Sci Food Agric*, 95(9), 1838-1844. doi:10.1002/jsfa.6884
- Wang, J. C., Neogi, P. and Forciniti, D. (2006). On one-dimensional self-assembly of surfactant-coated nanoparticles. *THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS* 125(19), 194717-194711 - 194717-194716. doi:10.1063/1.2375091
- 10.1063/1.2375091 
- Wen, S., Hui, Y. and Chuang, W. (2021). Biosynthesis and antioxidation of nano-selenium using lemon juice as a reducing agent. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 178-188. doi:10.1515/gps-2021-0018
- Yun, H. M., Ban, J. O., Park, K. R., Lee, C. K., Jeong, H. S., Han, S. B. and Hong, J. T. (2014). Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacol Ther*, 142(2), 183-195. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.005
- Zakaria, Y., Rahmat, A., Pihie, A. H., Abdullah, N. R. and Houghton, P. J. (2009). Eurycomanone induce apoptosis in HepG2 cells via up-regulation of p53. *Cancer Cell Int*, 9, 16. doi:10.1186/1475-2867-9-16
- Zhang, J., Taylor, E. W., Wan, X. and Peng, D. (2012). Impact of heat treatment on size, structure, and bioactivity of elemental selenium nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7, 815-825. doi:10.2147/IJN.S28538
- Zhang, Y., Liu, X., Ruan, J., Zhuang, X., Zhang, X. and Li, Z. (2020). Phytochemicals of garlic: Promising candidates for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 123. doi:10.1016/j.biopha.2019.109730

กระทรวงอุตสาหกรรม. (2560). ประกาศจากกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องกำหนดมาตรฐานควบคุมการ

ระบายนํ้าทิ้งจากโรงงาน พ.ศ. 2560. 1-4.

ชมภูสอ, อ. (2556). โครงสร้างระดับนาโนของทอง : การสังเคราะห์และการประยุกต์ใช้ในการรักษา

โรคมะเร็ง. ว.วิทย. มข., 41(4), 859-872.



## ภาคผนวก ก.

## วิธีการเตรียมสาร

## 1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมในอัตราส่วนต่างๆ ของ Sodium selenite : Ascorbic acid : สารสกัดกระเทียม

สภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:2:12

- Sodium selenite 0.0345 g ละลายในน้ำกลั่น 20 ml
- Ascorbic acid 0.0620 g ละลายในน้ำกลั่น 4.4 ml
- สารสกัดกระเทียม 0.4 g \*

สภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:2:19

- Sodium selenite 0.0345 g ละลายในน้ำกลั่น 20 ml
- Ascorbic acid 0.0620 g ละลายในน้ำกลั่น 4.4 ml
- สารสกัดกระเทียม 0.657 g \*

สภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:3:19

- Sodium selenite 0.0345 g ละลายในน้ำกลั่น 17.5 ml
- Ascorbic acid 0.0972 g ละลายในน้ำกลั่น 6.9 ml
- สารสกัดกระเทียม 0.657 g \*

สภาวะการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียมที่ 1:3:25

- Sodium selenite 0.0345 g ละลายในน้ำกลั่น 17.5 ml
- Ascorbic acid 0.0972 g ละลายในน้ำกลั่น 6.9 ml
- สารสกัดกระเทียม 0.864 g \*

\* ละลายสารสกัดกระเทียมในสารละลาย Sodium selenite ปริมาตรรวม 24.4 ml

## ภาคผนวก ข.

## การวิเคราะห์ผลการทดลอง

## 1. การวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์

การคำนวณ MTT assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm แล้วนำไป

คำนวณ %ความมีชีวิต ตามสมการ

$$\% \text{viability} = \frac{\text{Absorbance (control)} - \text{Absorbance (sample)}}{\text{Absorbance (control)}} \times 100$$

เมื่อ Ab control = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่ไม่มีตัวอย่าง

Ab sample = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

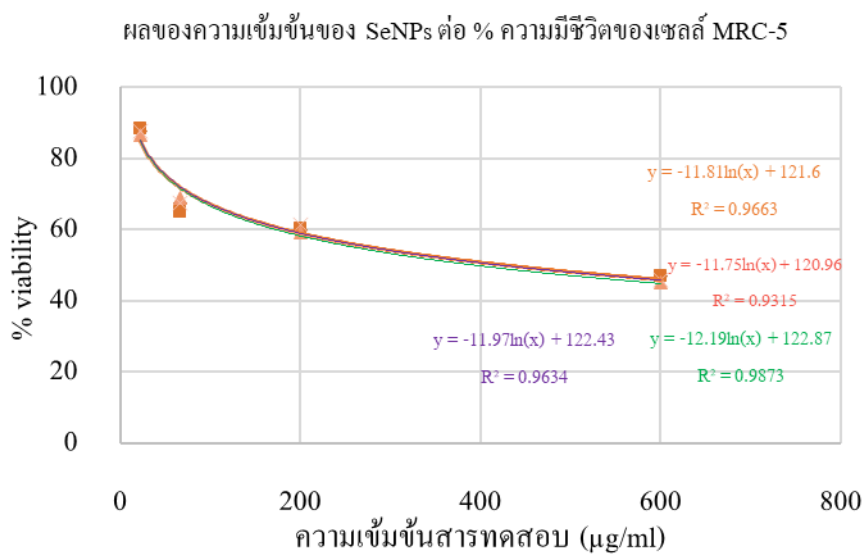
นำค่า % viability ที่ได้ไปพลอตกราฟโดยให้แกน y เป็น %viability และแกน x เป็น

ความเข้มข้นสารทดสอบ เพื่อหาค่า Inhibition concentration 50 (IC<sub>50</sub>) จากสมการที่ได้จาก

กราฟ

ตัวอย่าง

ความเข้มข้นของ SeNPs-1:3:25 (µg/ml)	% viability				IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
600	46.92	46.92	45.21	45.89	429.52	419.54	394.59	424.52
200	59.93	60.27	59.25	61.30	AV	SD		
66.67	67.47	65.07	68.84	67.47	417.04	15.51		
22.22	87.67	88.36	86.64	87.67				



วิธีการคำนวณ

ครั้งที่ 1 จากสมการกราฟเส้นตรงที่ได้  $y = -11.81\ln(x) + 121.6$

จะได้ว่า  $= \text{EXP}((50-121.6)/-11.81)$

$= 429.52$

ดังนั้น  $\text{IC}_{50} = 429.52 \mu\text{g/ml}$

## 2. การวิเคราะห์ความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะของสารทดสอบ

ค่า  $\text{IC}_{50}$  ที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะของสารทดสอบ หรือ Selective index ตามสูตร

Selective index =  $\text{IC}_{50}$  ของเซลล์ปกติ /  $\text{IC}_{50}$  ของเซลล์มะเร็ง

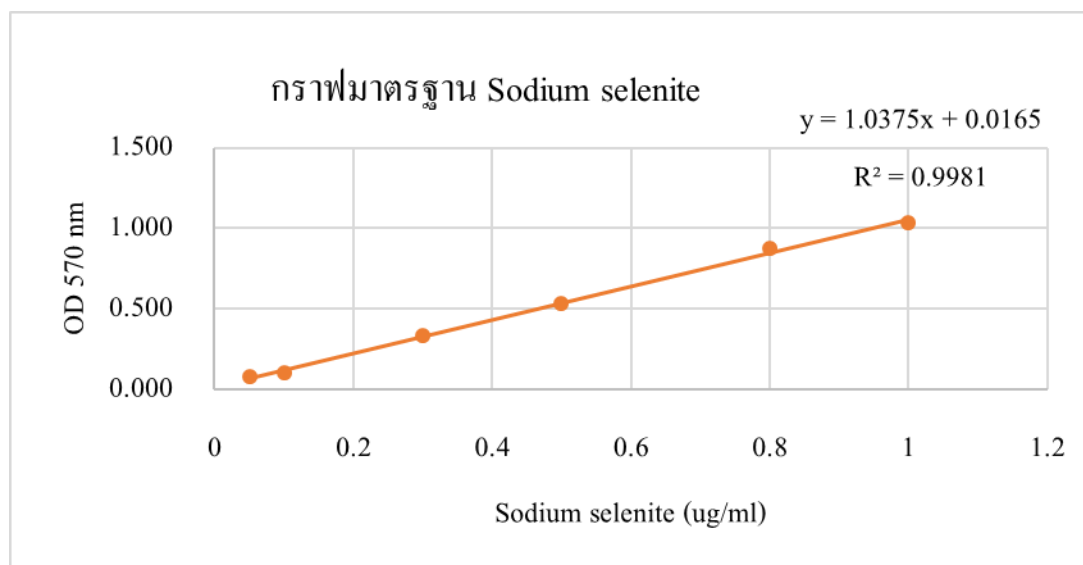
ตัวอย่าง  $\text{IC}_{50}$  ของเซลล์ปกติ =  $429.52 \mu\text{g/ml}$

$\text{IC}_{50}$  ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก =  $61.12 \mu\text{g/ml}$

Selective index =  $429.52/61.12$

$= 7.03$

### 3. การคำนวณปริมาณซีลีเนียมในสารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซีลีเนียม



คำนวณปริมาณซีลีเนียมตกค้างเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่าง

สารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์ SeNPs-1:2:12 (μl)	OD1	OD2	เทียบ Sodium selenite STD. (μg)	
50	0.752	0.739	0.709	0.696
30	0.488	0.420	0.416	0.389
10	0.184	0.203	0.161	0.180

นำ OD ที่วัดได้แทนค่าในสมการจากกราฟมาตรฐาน เช่น ที่ สารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์ SeNPs-1:2:12 ที่ 50 μl OD = 0.752

จากสมการกราฟเส้นตรงที่ได้  $y = 1.0375x + 0.0165$

จะได้ว่า  $= (0.752 - 0.0165) / 1.0375$

$= 0.709$

ดังนั้น เทียบ Sodium selenite STD. = 0.709 μg

เนื่องจากการสังเคราะห์ทำในปริมาตร 20 ml จึงต้องเทียบปริมาณซีลีเนียมตกค้างใน 20 ml



$$\begin{aligned} \text{จะได้ว่าปริมาณซีลีเนียมตกค้างใน 20 ml} &= (0.709 \times 20000) / 50 \\ &= 283.57 \mu\text{g} \end{aligned}$$

คำนวณให้อยู่ในรูป mg/l, mg/L

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น ปริมาณซีลีเนียมตกค้างในสารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์ SeNPs-1:2:12} \\ &= 7.25 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

#### 4. % Transformation ของ Sodium selenite ไปเป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม

- เริ่มต้นใส่ Sodium selenite 34588  $\mu\text{g}$  / 20 ml ของน้ำ
- ปริมาณซีลีเนียมตกค้างใน 20 ml ของสารละลายปฏิกิริยาการสังเคราะห์ SeNPs-1:2:12 = 301.06  $\mu\text{g}$

หาปริมาณซีลีเนียมที่ใช้ไป จากสูตร

$$\text{ซีลีเนียมเริ่มต้นที่ใช้} - \text{ซีลีเนียมที่ตกค้าง} = 34588 - 301.06 = 34286.94$$

ดังนั้น ซีลีเนียมที่ใช้ไปคือ 34286.94  $\mu\text{g}$

จากนั้นคำนวณหา % Transformation ของ Sodium selenite ไปเป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียม โดย (ปริมาณซีลีเนียมที่ใช้ไป/ปริมาณซีลีเนียมเริ่มต้น)  $\times$  100

$$= (34286.94/34588) \times 100 = 99.13$$

ดังนั้น %Transformation ของ Sodium selenite ไปเป็นอนุภาคนาโนซีลีเนียมกระเทียมจากสังเคราะห์ SeNPs-1:2:12 เป็น 99.13%



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศิริกัณฑพร น่วมคุณทรัพย์
วัน เดือน ปี เกิด	24 มิถุนายน 2538
สถานที่เกิด	ราชบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	216 หมู่ 5 ตำบลบางแพ อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี 70160
ผลงานตีพิมพ์	Green synthesis selenium nanoparticle from garlic extract: studies on anti-cancer activities. Sirikanatporn Nuamkhunsap, Kalyanee Jirasripongpun, Nuananong Jirakanjanakit, Siriporn Phongtongpasuk. Pure and Applied Chemistry International Conference 2022 (PACCON 2022) June 30th – July 1st, 2022 KMITL Convention Hall, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. (Poster Presentation)

