

ผลของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ต่อความเป็นพิษ
ในเซลล์มะเร็งเต้านม
CYTOTOXICITY OF NANOSIZED CuO TO THE CELL LINE
HUMAN BREAST CANCER



นพพร อธิธรรมพิทักษ์
ปริญญารณ บัญมาก

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ฟิสิกส์ประยุกต์)
ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่ไปยังผู้อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ปีการศึกษา 2558

CYTOTOXICITY OF NANOSIZED CuO TO THE CELL LINE
HUMAN BREAST CANCER



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF
SCIENCE (APPLIED PHYSICS)

DEPARTMENT OF PHYSICS, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น
อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงหรือทำซ้ำ
ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ ผลของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ต่อความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งเต้านม
Cytotoxicity of Nanosized CuO to the Cell Line Human Breast Cancer

ชื่อนักศึกษา นายนพพร อธิธรรมพิทักษ์ รหัสนักศึกษา 55051524
นางสาวปรีญาภรณ์ บุญมาก รหัสนักศึกษา 55051546

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ฟิสิกส์ประยุกต์)

ภาควิชา ฟิสิกส์

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.กฤษกร โล้เจริญรัตน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(ฟิสิกส์ประยุกต์)
ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ภัทริยา ดำรงค์ศักดิ์ ประธานกรรมการ	ภัทริยา ดำรงค์ศักดิ์
ดร.อาภาภรณ์ สุกุลการะเวก กรรมการ	อาภาภรณ์ สุกุลการะเวก
ดร.พิศาล สุขวิสูตร กรรมการ	พิศาล สุขวิสูตร
ผศ.ดร.กฤษกร โล้เจริญรัตน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	กฤษกร โล้เจริญรัตน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกไปลงโฆษณาและตอวางอ้างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ต่อความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งเต้านม
ชื่อนักศึกษา	นายนพพร อธิธรรมพิทักษ์ รหัสนักศึกษา 55051524 นางสาวปริญญารณ บัญมาก รหัสนักศึกษา 55051546
ปริญญา ภาควิชา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ฟิสิกส์ประยุกต์) ฟิสิกส์
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.กฤษกร โส้เจริญรัตน์

บทคัดย่อ

เมื่อพูดถึงการนำวัสดุในระดับนาโนไปใช้แล้ว คอปเปอร์ออกไซด์เป็นวัสดุในกลุ่มโลหะทรานซิชันที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจ คือเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดำวยแสง และความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โครงการพิเศษนี้เป็นการศึกษาถึงผลของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ต่อความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งเต้านม ในการทดลองเราจะศึกษาสมบัติเชิงแสงของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์เทียบกับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเต้านม จากผลการทดลองพบว่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ เป็นไปตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต สารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ถูกฉายแสงเข้าสู่เซลล์ภายใต้กระบวนการโฟโตคะตะไลซิสจะเกิดเป็นออกซิเจนไดออกไซด์ ($O_2\cdot^-$) และไฮดรอกซิล ($OH\cdot$) ไปจับ กับนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งเต้านม จากกระบวนการโฟโตคะตะไลซิสโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตและแสงขาวกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งเห็นว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์เมื่อใช้แสงขาวกระตุ้นจะได้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับแสงอัลตราไวโอเล็ต เนื่องจากแบนด์แก๊ปของคอปเปอร์ออกไซด์มีค่าประมาณ 1.7 eV หรือ 729 nm และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์เมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตกระตุ้นจะได้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับแสงขาว เนื่องจากแบนด์แก๊ปของซิงค์ออกไซด์มีค่าประมาณ 3.2 eV หรือ 387 nm ในด้านผลกระทบของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่มีต่อเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์จะมีอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์มะเร็งได้น้อยกว่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมได้ไม่ดีเท่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ จึงส่งผลให้เซลล์มีชีวิตรอดมากกว่าเมื่อเทียบกับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

คำสำคัญ : คอปเปอร์ออกไซด์ ซิงค์ออกไซด์ โฟโตคะตะไลซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Cytotoxicity of Nanosized CuO to the Cell Line Human Breast Cancer	
Students	Mr.Nopporn A-tithampitak	Student ID 55051524
	Miss Preeyaporn Bunmak	Student ID 55051546
Degree	Bachelor of Science (Applied Physics)	
Department	Physics	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2015	
Advisor	Ast.Prof.Dr.Kitsakorn Locharoenrat	

Abstract

Among the metal oxide nanomaterials, CuO is an interesting one due to its properties in terms of photocatalyst and antibacteria. This special project aims to study the cytotoxicity of nanosized CuO on the cell line human breast cancer. We study the optical properties of CuO nanoparticles as compared with ZnO nanoparticles on cytotoxic human breast cancer cells. The experimental results show that the absorption of CuO nanoparticles and ZnO nanoparticles are in agreement with Beer-Lambert law. CuO nanoparticles and ZnO nanoparticles solution transported into the cells via photocatalysis process results in oxygen dioxide ($O_2\cdot^-$) and hydroxyl ($OH\cdot$) attached onto the nucleus of breast cancer cells. The process of photocatalysis under ultraviolet and white light shows that cytotoxic stimulation of CuO nanoparticles under white light is better than that under ultraviolet because a band gap of CuO nanoparticles is about 1.7 eV or 729 nm. Cytotoxic stimulation of ZnO nanoparticles under ultraviolet is greater than under white light because a band gap of ZnO nanoparticles is about 3.2 eV or 387 nm. The effects of CuO nanoparticles and ZnO nanoparticles on the cancer cells reveal that the diffusion rate of CuO nanoparticles into the cancer cells is lower than that of ZnO nanoparticles. Therefore, cytotoxic efficiency of CuO nanoparticles on the cancer cells is lower than that of ZnO nanoparticles. As a result, cell survival from CuO nanoparticles is higher than that from ZnO nanoparticles.

Keywords : Copper oxide, Zinc oxide, Photocatalysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

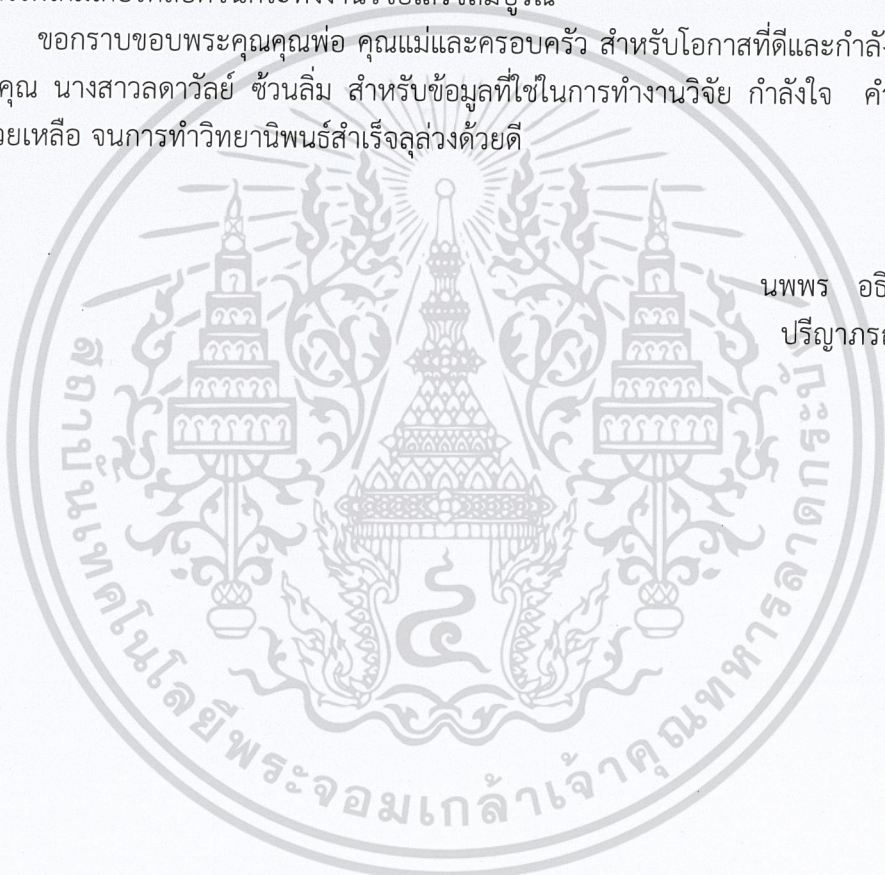
กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษกร โส้เจริญรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมถึงรองศาสตราจารย์สาหร่าย เล็กชะอุ่ม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอพระคุณ ดร.สุทธิจิตร ศรีวัชรกุล อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา ที่ช่วยในเรื่องของขั้นตอนการเตรียมเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงและให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทำงานวิจัย รวมถึงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภทรียา ดำรงค์ศักดิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ตลอดจนกระทั่งงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว สำหรับโอกาสที่ดีและกำลังใจอันอบอุ่น ขอขอบคุณ นางสาวดาววัลย์ ช้วนลิ้ม สำหรับข้อมูลที่ใช้ในการทำงานวิจัย กำลังใจ คำแนะนำและความช่วยเหลือ จนการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี

นพพร อธิธรรมพิทักษ์
ปริญาภรณ์ บุญมาก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	1
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 คุณสมบัติทั่วไปของคอปเปอร์ออกไซด์	4
2.2 กลไกการนำสารเข้าสู่เซลล์	4
2.3 เซลล์มะเร็ง	5
2.4 ปฏิกริยาโฟโตแคตาไลซิส	6
2.5 การนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์	8
2.6 การวัดค่าการดูดกลืนแสง	8
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
2.7.1 การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติทางแสง ของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์	10
2.7.2 การเตรียมและสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียในปลาน้ำจืด ของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์	10
2.7.3 ขนาดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติ ของยาด้านจุลชีพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	13
3.1 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี	13
3.1.1 เครื่องมือ	13
3.1.2 เครื่องแก้ว	13
3.1.3 วัสดุ	13
3.1.4 สารเคมี	14
3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์	14
3.2.1 การเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ลงในเซลล์ทดลอง	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2.2 การเตรียมสารละลาย $FeCl_2$ ลงไปในเซลล์ทดลอง	15
3.2.3 ขั้นตอนการนับเซลล์	16
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	18
4.1 การศึกษาสมบัติทางแสง	18
4.1.1 การศึกษาสมบัติทางแสงของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์	18
4.1.2 การศึกษาสมบัติทางแสงของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์	19
4.1.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่พีคสูงสุดของ อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์	21
4.2 การศึกษาผลกระทบต่อเซลล์มะเร็งเต้านม	24
4.2.1 ผลกระทบของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม	24
4.2.2 ผลกระทบของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม	26
4.2.3 ผลกระทบของคอปเปอร์ออกไซด์และซิงค์ออกไซด์ที่มีต่อ เซลล์มะเร็งเต้านม	27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	30
5.1 สรุปผลการวิจัย	30
5.2 ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 แนวทางการดำเนินงาน	2
3.1 ตารางเครื่องแก้ว	13
3.2 ตารางวัสดุ	13



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างแบบโมโนคลินิก	4
2.2 กระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis)	4
2.3 เซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF-7	6
2.4 พลังงานของการเกิดออกซิเดชันของสารอินทรีย์	6
2.5 องค์ประกอบหลักของรังสียูวี	7
2.6 ปฏิกริยาโฟโตแคตตาไลซิสของโลหะออกไซด์	7
2.7 ฮีมาไซโตมิเตอร์	8
2.8 แสดงตาราง 1 chamber บนฮีมาไซโตมิเตอร์	8
2.9 ลำแสงที่ผ่านเข้าออกสารละลายความเข้มข้น c เป็นระยะทาง l	9
2.10 สเปกตรัมการปลดปล่อย (ซ้าย) และสเปกตรัมการดูดกลืนที่ 355 นาโนเมตร (ขวา)	10
2.11 สเปกตรัมของ XRD ของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ที่นำไปอบที่อุณหภูมิ 400 °C	11
2.12 ขนาดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่นำไปอบที่อุณหภูมิ 400 °C	12
3.1 อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่ถูกเติมลงในหลุมที่มีเซลล์ (As') และหลุมที่เป็นตัวควบคุม (Ac')	14
3.2 As ที่ความเข้มข้นต่างๆ	15
3.3 Ac ที่ความเข้มข้นต่างๆ	16
3.4 นำ Hemacytometer สองตัวกล้องจุลทรรศน์	17
3.5 แสดงช่องใหญ่ทั้ง 5 ช่อง ที่ต้องนับจำนวนเซลล์	17
4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นของสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	18
4.2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์	19
4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นของสารละลายอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	19
4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์	21
4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนที่พีคสูงสุดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์	21
4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ก่อนกระตุ้นด้วย Visible light (As') และหลังกระตุ้นด้วย Visible light (As)	22
4.7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ก่อนกระตุ้นด้วย UV (As') และหลังกระตุ้นด้วย UV (As)	23
4.8 อัตราการแพร่ของสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และซิงค์ออกไซด์เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม	23

4.9 ความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ไปใช้ประโยชน์ 24 การค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.10 การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมกับความเข้มข้นของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์	25
4.11 เซลล์มะเร็งเต้านมที่มีชีวิตรอด (ขนาดเซลล์ $\approx 20 \mu\text{m}$)	25
4.12 เซลล์มะเร็งเต้านมที่ตาย (ขนาดเซลล์ $\approx 20 \mu\text{m}$)	26
4.13 ความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์	26
4.14 การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมกับความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์	27
4.15 ความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนกับความเข้มข้นของคอปเปอร์ออกไซด์ที่กระตุ้นด้วย Visible light และซิงค์ออกไซด์ที่กระตุ้นด้วย UV	28
4.16 การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมกับความเข้มข้นของคอปเปอร์ออกไซด์ที่กระตุ้นด้วย Visible light และซิงค์ออกไซด์ที่กระตุ้นด้วย UV	29



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ความหมาย
°C	องศาเซลเซียส
CB	Conduction Band
CuO	คอปเปอร์ออกไซด์
DNA	deoxyribonucleic acid
eV	อิเล็กตรอนโวลต์
g	กรัม
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
mm	มิลลิเมตร
nm	นาโนเมตร
SEM	Scanning Electron Microscope
VB	Valence Band
XRD	X-ray Diffraction
ZnO	ซิงค์ออกไซด์
μL	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

คอปเปอร์ออกไซด์เป็นวัสดุในกลุ่มโลหะทรานซิชันซึ่งมีคุณสมบัติที่น่าสนใจ จึงถูกนำไปใช้ทางด้านเทคโนโลยีต่างๆ เช่น การนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ สำหรับการนำไปใช้ในรูปแบบของวัสดุนาโนนั้นแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในระดับนาโน ทั้งทางด้านการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยแสง และทางด้านคุณสมบัติเฉพาะตัวทางด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

ด้านการแพทย์ อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์นั้นถูกนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ร่วมกับกระบวนการโฟโตคะตะไลซิส โดยความสามารถของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์จะทำให้ปฏิกิริยากับ DNA ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ และความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์จึงคาดว่าจะถูกนำไปใช้ในการทำลายเซลล์มะเร็งได้

จากความสามารถของคอปเปอร์ออกไซด์ที่ได้รับความสนใจมากขึ้นในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ จึงทำให้เกิดโครงการวิจัยพิเศษนี้ขึ้นมา โดยการนำอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มาใช้ร่วมกับกระบวนการโฟโตคะตะไลซิส โดยศึกษาในช่วงความยาวคลื่นแสงต่างๆ และ ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิส โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง และทำให้เซลล์มะเร็งถูกทำลายต่อไป
2. เพื่อศึกษาผลของการใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิส โดยใช้แสงขาว เพื่อก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง
3. เพื่อศึกษาผลความเข้มข้นของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง และเซลล์ปกติ
4. เพื่อเปรียบเทียบการใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์กับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์จากโครงการพิเศษปี พ.ศ.2557 ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ในการทำลายเซลล์มะเร็ง โดยใช้เทคนิคของรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 200 – 400 nm แล้วนำมาเปรียบเทียบกับแสงขาว ความยาวคลื่น 400-700 nm จากนั้นผลการทดลองทั้งหมดจะนำมาเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์จากโครงการพิเศษปี พ.ศ. 2557

ตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่จะนำมาใช้ในการศึกษา คือ เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง (MCF-7) สุดท้ายจะเป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อจะใช้เป็นข้อมูลสำหรับการเลือกใช้อุณหภูมิในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

โครงการมีระยะเวลาจัดทำรวมทั้งสิ้น 1 ปี โดยเริ่มต้นตั้งแต่เดือน เมษายน พ.ศ. 2558 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 ซึ่งมีการดำเนินการข้างต้นสามารถแสดงระยะเวลาดำเนินงานได้ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 แนวทางการดำเนินงาน

ผลงาน/กิจกรรม	เดือน 1-2	เดือน 3-4	เดือน 5-6	เดือน 7-8	เดือน 9-10	เดือน 11-12
1.ศึกษากระบวนการเกิด และการทำลายเซลล์มะเร็งในเซลล์สิ่งมีชีวิต	←→					
2.เตรียมเซลล์ทดลอง, ตรวจสอบสภาพเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์	←→					
3.ทรีท เมนต เซลล์ทดลองด้วยอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิส, ทดสอบตัวบ่งชี้การทำลายเซลล์ทดลอง		←→				
4.เก็บผลการทดลองและประมวลข้อมูล				←→		
5.สรุปงานวิจัยพร้อมเขียนรายงาน						←→

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจถึงเทคนิคการใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ในการบำบัดรักษามะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ
2. เข้าใจถึงสมบัติของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ในการบำบัดรักษามะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ
3. เข้าใจถึงผลของการใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิสโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงและทำให้เซลล์มะเร็งถูกทำลาย
4. สามารถนำความรู้พื้นฐานทั้งในสาขาฟิสิกส์ เคมี และชีววิทยา มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มคุณภาพของงานวิจัยและการต่อยอดสู่งานวิจัยเชิงพาณิชย์ต่อไป
5. สามารถนำวิธีการวิจัยนี้ไปใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการบำบัดรักษาในผู้ป่วยโรคมะเร็ง
6. สามารถนำงานวิจัยนี้ไปตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

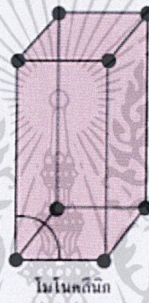
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื้อหาในบทนี้จะกล่าวถึงทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของความเป็นพิษของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการเลือกใช้อุณหภูมิกนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ในระยะยาวต่อไป

2.1 คุณสมบัติทั่วไปของคอปเปอร์ออกไซด์

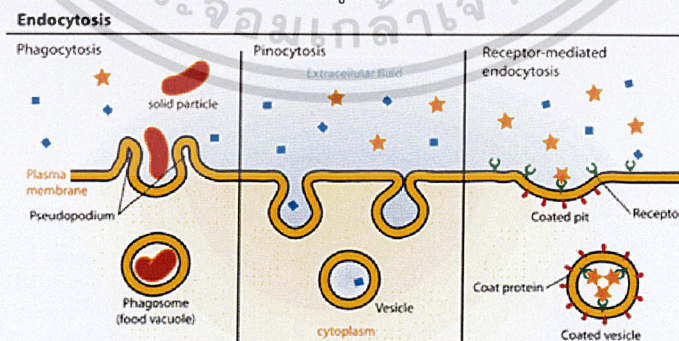
คอปเปอร์ออกไซด์ (CuO) เป็นสารที่มีอยู่ในชีวิตประจำวัน มีสมบัติทางแสงและสมบัติทางเคมี คอปเปอร์ออกไซด์เป็นสารกึ่งตัวนำชนิดพี (p-type) ที่มีโครงสร้างแบบโมโนคลินิก [1] ดังรูปที่ 2.1 สารประกอบคอปเปอร์ออกไซด์จะแสดงสมบัติทางฟิสิกส์หลายๆอย่าง เช่น ค่าการนำความร้อนสูง ความสามารถในการเป็นตัวนำยิ่งยวด สหสัมพันธ์ระหว่างอิเล็กทรอนิกส์แต่ละคู่ และกลศาสตร์การหมุน ดังนั้นมันจึงถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง



รูปที่ 2.1 โครงสร้างแบบโมโนคลินิก

2.2 กลไกการนำสารเข้าสู่เซลล์

เอนโดไซโทซิส (endocytosis) เป็นการลำเลียงสารขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ [2] โดยเยื่อหุ้มเซลล์จะเว้าเข้าไปในไซโทพลาสซึมแล้วโอบล้อมสารนั้นไว้ จนกลายเป็นถุงเล็กๆ แล้วถุงนั้นก็เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์เอนโดไซโทซิสในสิ่งมีชีวิต เอนโดไซโทซิสมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามกลไกการลำเลียงสาร เช่นฟาโกไซโทซิส(phagocytosis) พิโนไซโทซิส (pinocytosis)และการนำสารเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับ (receptor-mediated endocytosis) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis)

ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) คือ การลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์ที่พบได้ในเซลล์จำพวกอะมีบา และเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเซลล์สามารถยื่นไซโทพลาสซึมออกมาล้อมอนุภาคของสารที่มีขนาดใหญ่ที่เป็นของแข็งก่อนที่จะนำเข้าสู่เซลล์ในรูปของเวสิเคิล จากนั้นอาจรวมตัวกับไลโซโซมภายในเซลล์เพื่อ

ย่อยสลายสารอาหารในเวสิเคิลด้วยเอนไซม์ภายในไลโซโซม ฟาโกไซโทซิสเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การกิน ของเซลล์ (cell eating)

พินไซโทซิส (pinocytosis) เป็นการนำสารโมเลกุลใหญ่ในรูปของสารละลายเข้าสู่เซลล์ เช่น โปรตีนต่าง ๆ เนื่องจากสารพวกนี้ไม่สามารถละลายกับเยื่อหุ้มเซลล์ และผ่านเข้าทางรูของเยื่อหุ้มเซลล์ ไม่ได้ พินไซโทซิสเกิดขึ้นโดยการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ตรงจุดที่โมเลกุลของสารเข้าสัมผัส โดยการเว้าเข้า และโอบล้อมโมเลกุลที่มาสัมผัสทำให้เกิดเป็นถุงเล็กๆ (เวสิเคิล) แล้วเวสิเคิลจะเคลื่อนตัวจากด้านนอกเข้าสู่ด้านใน และหลุดเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ พินไซโทซิสเรียกอีกอย่างหนึ่ง ว่า การดื่มของเซลล์ (cell drink) พบได้ที่เซลล์ของท่อหน่วยไต

การนำสารเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับ (receptor-mediated endocytosis) เป็นกระบวนการ นำสารเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับ (receptor) โดยที่ตัวรับจะอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่จับสารที่จะ นำเข้าสู่เซลล์ ตัวรับและสารที่นำเข้าจะมีความเฉพาะเจาะจงต่อกัน ตัวรับแต่ละชนิดจะจับกับสาร นำเข้าชนิดนั้นเท่านั้น ไม่จับกับสารอื่น บริเวณที่นำเข้าจะมีลักษณะเว้าตื้นๆ เมื่อตัวรับจับกับสารแล้ว เยื่อเซลล์จะเว้ามากขึ้น จนในที่สุดเยื่อเซลล์ส่วนที่เว้านั้นหลุดเข้าไปในเซลล์

จากงานวิจัยของเราซึ่งใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ ในรูปของของเหลวในการทำลายเซลล์มะเร็ง เมื่อพิจารณาจากกระบวนการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์ เราสามารถสรุปได้ว่าในงานวิจัยของเราเป็นการนำสารเข้าสู่เซลล์โดยวิธีพินไซโทซิส

2.3 เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งมีหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colon adenocarcinoma) สายพันธุ์ HT-29 เซลล์มะเร็งในช่องปาก (Human oral cavity carcinoma) สายพันธุ์ KB เซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma) สายพันธุ์ MCF-7 เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (human hepatocarcinoma) สายพันธุ์ HepG2 และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Murine leukemia) สายพันธุ์ P-388 ซึ่งในงานวิจัยนี้เราสนใจเซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF-7 เป็นพิเศษ

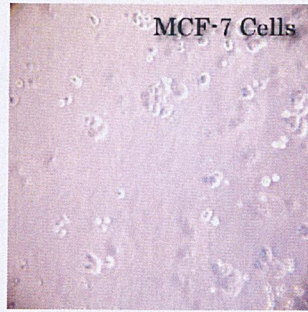
มะเร็งเต้านมเกิดจากความผิดปกติของเซลล์ที่อยู่ในท่อน้ำนมหรือต่อมน้ำนม [3] เซลล์เหล่านี้มีการแบ่งตัวผิดปกติ ไม่สามารถควบคุมได้ มักแพร่กระจายไปตามทางเดินน้ำเหลืองไปสู่อวัยวะที่ใกล้เคียง เช่น ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ หรือแพร่กระจายไปสู่อวัยวะที่อยู่ห่างไกล เช่น กระดูก ปอด ตับ และสมอง เช่นเดียวกับมะเร็งชนิดอื่นๆ เมื่อเซลล์มะเร็งมีจำนวนมากขึ้นก็จะแย่งสารอาหารและปล่อยสารบางอย่างที่เป็นอันตรายและทำลายอวัยวะต่างๆ จนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด

มะเร็งเต้านมพบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย โดยผู้ชายมีโอกาสพบได้น้อยมากเพียง 1 % ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด จากสถิติของสถานวิทยามะเร็ง โรงพยาบาลศิริราช พบมะเร็งเต้านมเป็นอันดับหนึ่งของมะเร็งทั้งหมดในผู้หญิงไทย และมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มมากขึ้นทุกปี ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการมีเครื่องแมมโมแกรมที่ช่วยให้สามารถตรวจพบมะเร็งในระยะเริ่มแรกได้ก่อนที่จะปรากฏอาการ และอาจเป็นผลจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป โดยมีแนวโน้มใกล้เคียงประเทศทางตะวันตกมากขึ้น การมีมลภาวะต่างๆมากขึ้นซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้หญิงป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมมากขึ้น

สายพันธุ์ของเซลล์ MCF-7 [4] รูปที่ 2.3 มีประโยชน์สำหรับการศึกษามะเร็งเต้านม เพราะสายพันธุ์ของเซลล์มีความสมบูรณ์ รวมถึงความสามารถของเซลล์ MCF-7 ในการประมวลผลฮอร์โมนเอสโตรเจนในรูปแบบของฮอร์โมนเอสตราไดออล โดยผ่านตัวรับเอสโตรเจนในไซโทพลาสซึมของเซลล์

เอ็กสอสโอมส์ในรูปของอนุภาคนาโนไฮโดรเจล โดยผ่านตัวรับเอสโตรเจนในไซโทพลาสซึมของเซลล์

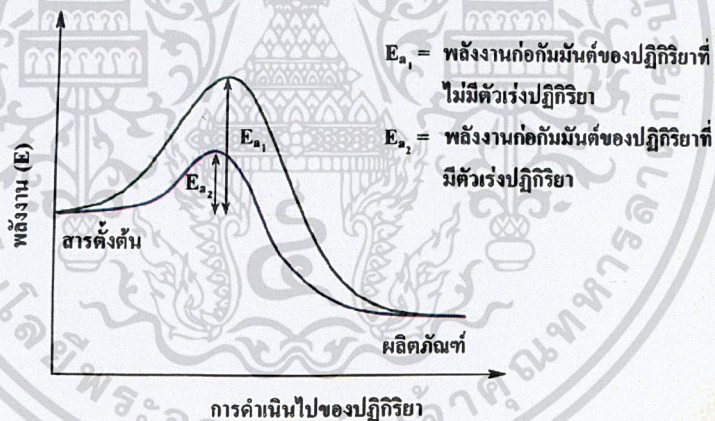
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 เซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF-7

2.4 ปฏิกิริยาโฟโตแคตาไลซิส

กระบวนการโฟโตแคตาไลซิส (Photocatalysis Process) เป็นการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ตัวแคตตาลิสต์ [5] ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้โดยการกระตุ้นด้วยแสง ตัวแคตตาลิสต์นี้จะทำหน้าที่ลดพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยา รูปที่ 2.4 แสดงการเกิดออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารอินทรีย์ที่มีและไม่มีตัวแคตตาลิสต์ ปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวแคตตาลิสต์จะมีความยาก และพลังงานของผลิตภัณฑ์จะต่ำกว่าพลังงานของสารอินทรีย์ พลังงานกระตุ้นนี้จะลดลงในปฏิกิริยาที่มีตัวแคตตาลิสต์ ถึงแม้ว่าพลังงานของสารอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ยังคงเท่าเดิม ตัวแคตตาลิสต์นี้จะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยการลดพลังงานกระตุ้น อีกทั้งตัวมันเองยังตอบสนองต่อแสงดังกล่าว ก็จะเกิดการกระตุ้นได้โดยการถ่ายทอดพลังงานที่มีมากกว่าพลังงานแบนด์แก๊ป (Band Gap)



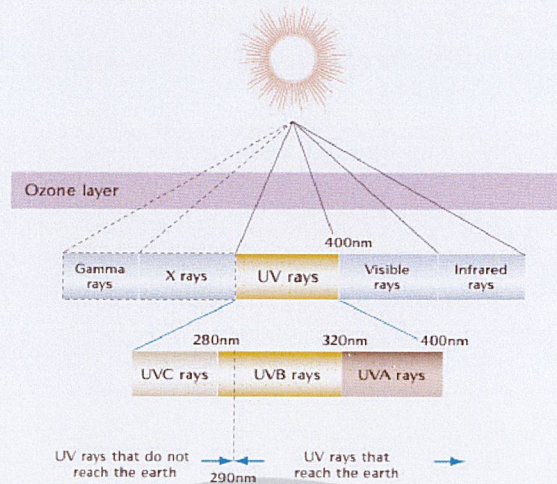
รูปที่ 2.4 พลังงานของการเกิดออกซิเดชันของสารอินทรีย์

รูปที่ 2.4 แสดงสเปกตรัมของรังสียูวี ซึ่งเป็นที่สนใจในกระบวนการโฟโตแคตาไลซิส ความยาวคลื่นของแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) อยู่ในช่วง 200 – 400 nm สำหรับความยาวคลื่นแสงที่คนมองเห็น (Visible หรือ แสงขาว) อยู่ในช่วง 400 – 700 nm รังสียูวีนี้แบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง คือ

- 1) คลื่นยาว (Long Wave UV, UV-A) อยู่ในช่วง 320-400 nm
- 2) คลื่นกลาง (Middle Wave UV, UV-B) อยู่ในช่วง 280-320 nm
- 3) คลื่นสั้น (Short Wave UV, UV-C) อยู่ในช่วง 200-280 nm

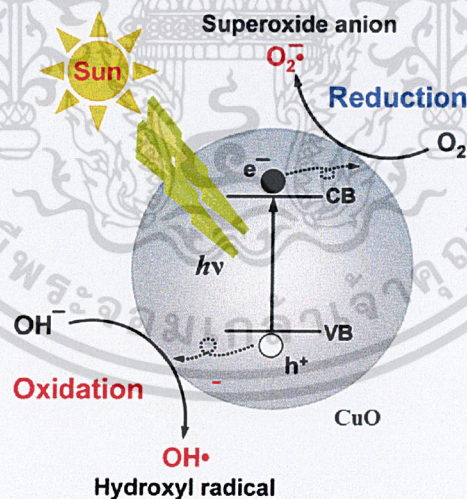
ความยาวคลื่นที่ต่ำกว่า 200 nm มีความสำคัญน้อยมาก เพราะรังสีอยู่ในช่วง Vacuum UV ซึ่งจะถูกดูดกลืนในอากาศจนหมดในช่วงระยะทางสั้นๆ ที่แสงเดินทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 องค์ประกอบหลักของรังสียูวี

นอกจากนั้น ผลึกคอปเปอร์ออกไซด์ยังมีคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมื่อได้รับแสงอีกด้วย โดยเมื่อแสงเข้าไปกระตุ้นอิเล็กตรอนทำให้อิเล็กตรอนที่อยู่ในชั้น Valence Band (VB) ถูกกระตุ้นไปยังชั้น Conduction Band (CB) ในชั้นของ Valence Band (VB) จะมี Hole เกิดขึ้น ส่วนอิเล็กตรอนที่อยู่ในชั้น Conduction Band (CB) จะไปรวมตัวกันกับ O_2 เกิดเป็นออกซิเจนไดออกไซด์ ($O_2\cdot^-$) ใช้เป็นสารตั้งต้นอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species: ROS) และในขณะเดียวกัน Hole ที่อยู่ในชั้น Valence Band (VB) จะไปทำปฏิกิริยากับ H_2O เกิดเป็นไฮดรอกซิล ($OH\cdot$) เป็นตัวไปจับสารอนุมูลอิสระของเซลล์มะเร็งเต้านม ดังรูปที่ 2.6

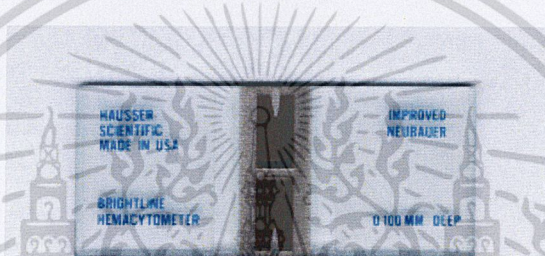


รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาโฟโตแคตาไลซิสของโลหะออกไซด์

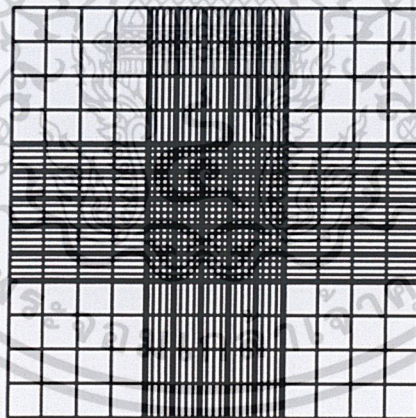
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้นับจำนวนเซลล์ [6] ปกติแล้วจะถูกออกแบบมาเพื่อใช้สำหรับนับเซลล์ของเม็ดเลือด นักวิทยาศาสตร์ผู้คิดค้นฮีมาไซโตมิเตอร์ คือ Louis-Charles Malassez ฮีมาไซโตมิเตอร์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์ รูปที่ 2.7 ส่วนที่เป็นสไลด์ทำด้วยวัสดุที่เป็นแก้วหรือพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีลักษณะคล้ายสไลด์แก้ว แต่มีความหนามากกว่า โดยแก้วนี้จะมีช่องว่างสำหรับใส่สารตัวอย่าง พร้อมด้วยส่วนที่เป็นพื้นที่นับเซลล์ขนาดเล็กมากจำนวน 2 chamber โดยแต่ละ chamber มีตารางหรือกริด แบ่งออกเป็น 9 ช่องใหญ่ แต่ละช่องมีความกว้าง 1 mm ยาว 1 mm และเมื่อปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์จะมีความลึก 0.1 mm ดังรูปที่ 2.8 เพราะฉะนั้นจะทำให้เราทราบค่าปริมาตรได้ โดยใช้สูตร กว้าง x ยาว x สูง โดยตารางขนาด 1X1 mm ความลึก 0.1 mm จะมีปริมาตรเท่ากับ $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1 \text{ mm}^3$ หรือ 100 μl



รูปที่ 2.7 ฮีมาไซโตมิเตอร์



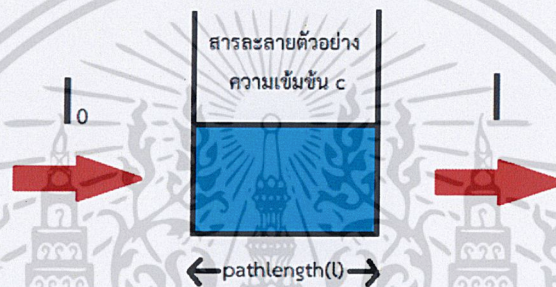
รูปที่ 2.8 แสดงตาราง 1 chamber บนฮีมาไซโตมิเตอร์ ประกอบด้วย 9 ช่องใหญ่ แต่ละช่องมีความกว้าง 1 mm ยาว 1 mm และมีความลึก 0.1 mm

2.6 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

สารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และสารอนินทรีย์ [7] โดยส่วนใหญ่สามารถดูดกลืนแสงหรือรังสียูวี และช่วงความยาวคลื่นที่มองเห็นได้ (แสงขาว) การวิเคราะห์สารดังกล่าวทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง เพราะให้ความถูกต้องแม่นยำและมีความไวสูง

UV-Vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงในช่วงรังสียูวี และช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืน ดังรูปที่ 2.9 โดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ ความยาว

คลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ เครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยทั่วไปแล้วจะมีส่วนประกอบหลักๆที่เหมือนกัน ได้แก่ แหล่งกำเนิดแสง เกรตติ้งหรือโมโนโครเมเตอร์ เซลล์ที่บรรจุสารตัวอย่าง และเครื่องตรวจจับ แหล่งกำเนิดแสง จะต้องให้แสงที่คงที่อย่างต่อเนื่อง ตัวที่นิยมใช้ คือ หลอดทังสเตนฮาโลเจน ซึ่งให้แสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 320-2,500 nm สำหรับแหล่งกำเนิดแสงในช่วงรังสียูวีนั้นจะใช้ หลอดไฮโดรเจนหรือหลอดดิวทีเรียม ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 160-375 nm แต่แสงที่ได้จากแหล่งกำเนิดนั้นจะมีความยาวคลื่นต่างๆ ดังนั้นจึงต้องใช้โมโนโครเมเตอร์เป็นตัวกระจายแสงออก เพื่อให้แสงที่จะผ่านไปยังตัวอย่างมีความยาวคลื่นค่าเดียวตามที่ต้องการ หลังจากนั้นแสงความยาวคลื่นค่าเดียวจะผ่านไปยังเซลล์ที่บรรจุสารตัวอย่าง เครื่อง UV-Vis spectrophotometer บางรุ่นสามารถใช้หลอดทดลองเป็นคิวเวทได้ คิวเวทที่ดีที่สุดนั้นทำมาจากควอร์ตที่มีคุณภาพสูง



รูปที่ 2.9 ลำแสงที่ผ่านเข้าออกสารละลายความเข้มข้น c เป็นระยะทาง l

จากกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert law) [8] จะได้ว่า

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

ค่าการดูดกลืนนิยามสมการได้เป็น

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T \quad (2)$$

ค่าการดูดกลืนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert law) ดังสมการ

$$A = \epsilon cl \quad (3)$$

โดยที่ T = Transmittance (T)

I_0 = ปริมาณแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่าง

I = ปริมาณแสงที่ผ่านออกมา

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร (absorbance)

ϵ = เป็นสมบัติจำเพาะของสารที่ดูดกลืนและวัดที่ความยาวค่าหนึ่ง

เรียกว่า molar absorptivity ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

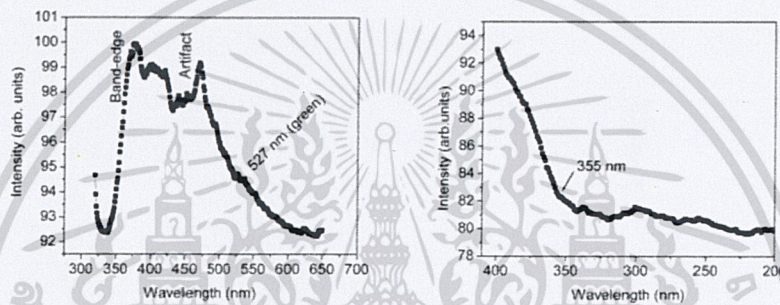
l = ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่างหรือความกว้างของเซลล์นั่นเอง (cm) ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นให้ผมเห็นแต่เพียงเนื้อหาและเพียงอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติทางแสงของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์สามารถเตรียมได้โดยวิธีการตกตะกอนในของเหลว [9] โดยใช้คอปเปอร์อะซิเตรดเป็นสารตั้งต้น และโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวรักษาเสถียรภาพ จะช่วยให้สังเคราะห์อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีขนาดใหญ่ได้อย่างง่ายดาย รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD) แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างแบบโมโนคลินิก กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) พบลักษณะพื้นผิวของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) พบว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีขนาด 5-6 nm สารเรืองแสง (PL) แสดงให้เห็นแถบการปลดปล่อยที่ 398 nm และปล่อยแสงสีเขียวที่ 527 nm และพีคของแถบการดูดกลืนที่ 355 nm ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 สเปกตรัมการปลดปล่อย (ซ้าย) และสเปกตรัมการดูดกลืนที่ 355 nm (ขวา)

2.7.2 การเตรียมและสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียในปลาน้ำจืดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

โลหะออกไซด์อย่างคอปเปอร์ออกไซด์นั้นมีความสำคัญเนื่องจากคุณสมบัติที่น่าสนใจในการถูกนำไปใช้ทางด้านเทคโนโลยีต่างๆ [10] เช่น ใช้เป็นองค์ประกอบในตัวนำยิ่งยวดอุณหภูมิสูง การตรวจวัดแก๊ส ในงานตรวจจับแสง และอื่นๆ ล่าสุดนี้คอปเปอร์ออกไซด์ยังถูกนำไปใช้ในการเป็นสารต้านจุลชีพต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

ในงานนี้ผู้วิจัยได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และศึกษาคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียจากตัวอย่างอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ อนุภาคนาโนผลึกเดี่ยวของคอปเปอร์ออกไซด์ที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอเกือบทั้งหมดที่ประมาณ 5-6 nm โดยการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการอย่างง่าย สเปกตรัมจากเครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ยืนยันความเป็นเฟสเดี่ยวของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ เครื่องวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ เทคนิคที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์นี้ปลอดภัยจากตัวทำลายที่เป็นพิษ สารอินทรีย์ และเอมีน ซึ่งเทคนิคนี้อาศัยการเกิดปฏิกิริยาต่างๆของคอปเปอร์ซัลเฟตกับน้ำDI ศึกษาผลกระทบจากการต้านแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T นอกจากนั้นยังทำการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

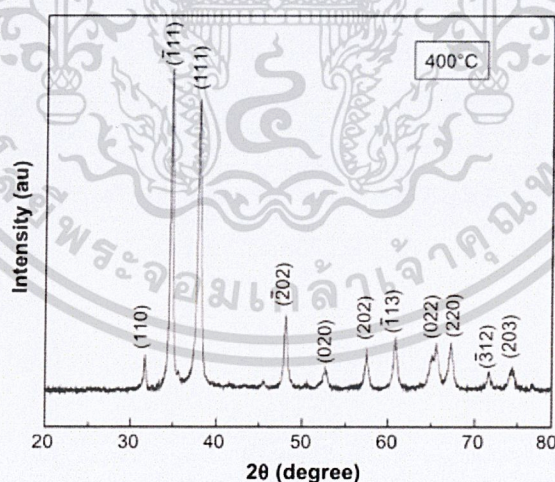
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 ขนาดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของยาต้านจุลชีพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

คอปเปอร์ออกไซด์เป็นหนึ่งในออกไซด์ของโลหะทรานซิชันที่มีความสำคัญเนื่องจากคุณสมบัติของมัน [11] โดยใช้ในการประยุกต์ในเทคโนโลยีต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมวิกิตสูง ตัวนำยิ่งยวด เซ็นเซอร์ก๊าซ และอื่นๆ เมื่อไม่นานมานี้คอปเปอร์ออกไซด์ได้ถูกนำมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพที่ต่อต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ ต่อไปนี้ในงานวิจัยจะสังเคราะห์อนุภาคนาโนออกไซด์ที่มีขนาดแตกต่างกัน และสำรวจฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งขึ้นอยู่กับการเตรียมอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

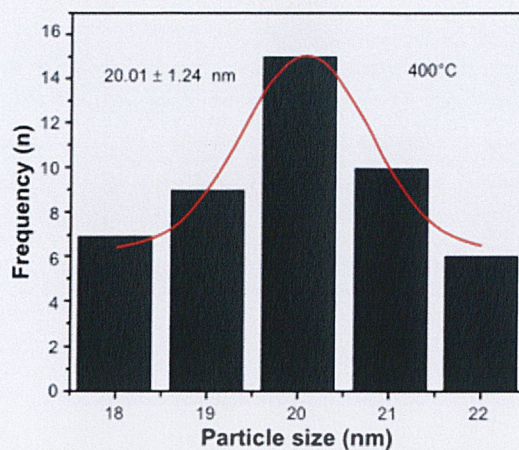
อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ถูกสังเคราะห์โดยวิธีการเผาไหม้เจล (gel combustion method) โซปริกไฮเดรตไตรไฮเดรต (cupric nitrate trihydrate) และกรดซิตริก ละลายในน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปกวนที่อุณหภูมิ 100 °C จนเจลเริ่มก่อตัวขึ้น เจลจะถูกเผาไหม้ที่อุณหภูมิ 200 °C จากนั้นเจลจะกลายเป็นผงป่นซึ่งถูกนำไปอบต่อไปที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จะได้ขนาดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่แตกต่างกัน จากนั้นจะทดสอบคุณสมบัติต้านการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยการแพร่กระจายความเข้มข้นต่ำสุดของการยับยั้ง และวิธีการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นต่ำสุด

สเปกตรัมของ XRD (รูปที่ 2.11) ยืนยันเฟสเดียวของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ ขนาดของผลึกที่ใหญ่ขึ้นมีผลมาจากอุณหภูมิของการอบที่สูงขึ้นเนื่องจากการแพร่กระจายของอะตอม ผลึกขนาดเล็กที่สุดมีขนาด 20 nm พบในกรณีของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่นำไปอบที่อุณหภูมิ 400 °C (รูปที่ 2.12) ผลจาก SEM ให้ผลตรงกับผลจาก XRD อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ทั้งหมดแสดงผลกระทบที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และขนาดของอนุภาคมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย



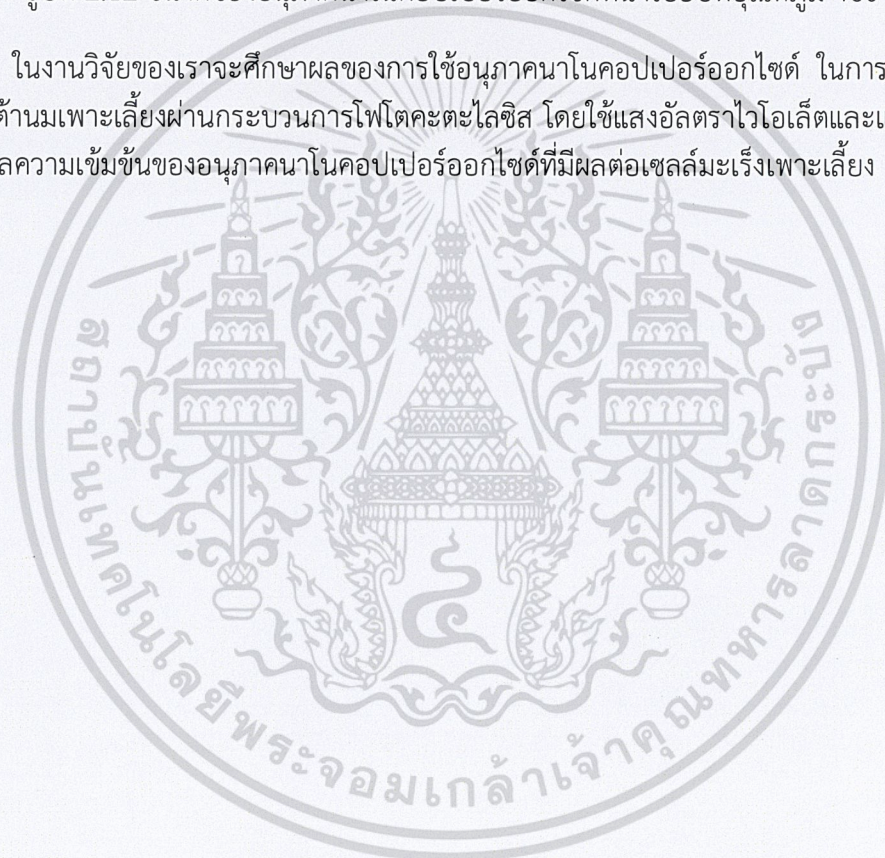
รูปที่ 2.11 สเปกตรัมของ XRD ของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ที่นำไปอบที่อุณหภูมิ 400 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 ขนาดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่นำไปอบที่อุณหภูมิ 400 °C

ในงานวิจัยของเราจะศึกษาผลของการใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิส โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตและแสงขาว และศึกษาผลความเข้มข้นของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง และเซลล์ปกติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ

- เครื่อง UV-Vis-NIR spectrophotometer (Avaspec-EDU)
- เครื่อง UV Chamber (MODEL CX-21)
- Hemacytometer
- กล้องจุลทรรศน์
- เครื่องชั่งสาร
- ไมโครปิเปต ขนาด 10-100 μL , 100-1000 μL

3.1.2 เครื่องแก้ว

ตารางที่ 3.1 ตารางเครื่องแก้ว

เครื่องแก้ว	จำนวน
บีกเกอร์ ขนาด 50 mL	12 ใบ
ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 mL	2 ใบ
ปิเปต ขนาด 10 mL	1 อัน
แท่งแก้วคนสาร	1 อัน

3.1.3 วัสดุ

ตารางที่ 3.2 ตารางวัสดุ

วัสดุ	จำนวน
คิวเวท (cuvette)	24 อัน
แท่นวางคิวเวท (cuvette rack)	2 อัน
pipette pump	1 อัน
หลอดดูดสารละลาย (Tips)	1 กล่อง
กระดาษรองสาร	1 กล่อง
แผ่นพาราฟิล์ม	1 กล่อง
กระดาษ kimwipes	1 กล่อง
ข้อดักสาร	1 อัน
ถุงมือ	1 กล่อง
หน้ากากปิดจมูก	2 ชิ้น
ขวดใส่น้ำ DI	1 ขวด
กระบอกฉีดน้ำ	1 อัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 สารเคมี

- Copper (II) oxide nanoparticles ($\phi < 50 \text{ nm}$)
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Ferrozine
- น้ำ DI
- Ethanol 75%
- Trypsin
- Tripen blue
- PBS
- Cell line human breast cancer

3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

3.2.1 การเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ลงในเซลล์ทดลอง

3.2.1.1 ชั่งสารอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ 0.0256 g ใส่ในบีกเกอร์แล้วเติมน้ำ DI 10 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 2.56 mg/mL

3.2.1.2 ใช้ไมโครปิเปต ขนาด 100-1000 μL ตูดสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2.56 mg/mL ปริมาตร 5 mL จากบีกเกอร์ใบที่ 1 ผสมกับน้ำ DI 5 mL ลงในบีกเกอร์ใบที่ 2 จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.28 mg/mL

3.2.1.3 ทำการ Dilute สารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ ตามขั้นตอนที่ 3.2.1.2 ในบีกเกอร์ใบที่ 3, 4, 5,..., 12 ตามลำดับ

3.2.1.4 จะได้สารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2.56, 1.28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025, 0 mg/mL

3.2.1.5 นำสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆมาเติมลงในหลุมที่มีเซลล์ (As') และหลุมที่เป็นตัวควบคุม (Ac') หลุมละ 1 mL ดังรูปที่ 3.1 \



รูปที่ 3.1 อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่ถูกเติมลงในหลุมที่มีเซลล์ (As') และหลุมที่เป็นตัวควบคุม (Ac')

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.6 นำแผ่นพาราฟิล์มมาปิดรอบฝาเพลท และนำเซลล์เข้าสู่ UV CX-21 กด Short wave (ฉีด Ethanol 75% ที่พื้นด้านในตู้แล้วเช็ดทำความสะอาด จากนั้นกดปุ่ม Short wave 254 nm แล้วทิ้งไว้ 15 นาที) ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.1.7 ทำซ้ำข้อ 3.2.1.1-3.2.1.6 ในขั้นตอนการนำเซลล์เข้าสู่ UV CX-21 ให้กด Long wave 365 nm

3.2.1.8 ทำซ้ำข้อ 3.2.1.1-3.2.1.6 ในขั้นตอนการนำเซลล์เข้าสู่ UV CX-21 ให้กด White light

3.2.1.9 ทำการทดลองซ้ำข้อ 3.2.1.1-3.2.1.8 ทั้งหมด 4 ครั้งแล้วนำมาเฉลี่ย เพื่อยืนยันผลการทดลอง

3.2.2 การเตรียมสารละลาย $FeCl_2$ ลงไปในเซลล์ทดลอง

3.2.2.1 ชั่งสาร $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0019 g แล้วเติมน้ำ DI 5 mL จะได้สารละลาย 2 mM และชั่งสาร Ferrozine 0.0123 g แล้วเติมน้ำ DI 5 mL จะได้สารละลาย 5 mM

3.2.2.2 นำเซลล์ออกจากตู้ UV และเติมน้ำ DI จำนวน 0.9 mL ลงในหลุม ทั้ง 24 หลุม

3.2.2.3 ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1-100 μ L ดูดสารละลาย $FeCl_2$ 33 μ L ลงในหลุมแรกที่มีเซลล์ (As) แล้วทำการ mix โดยการดูดขึ้น-ลง 5 ครั้ง

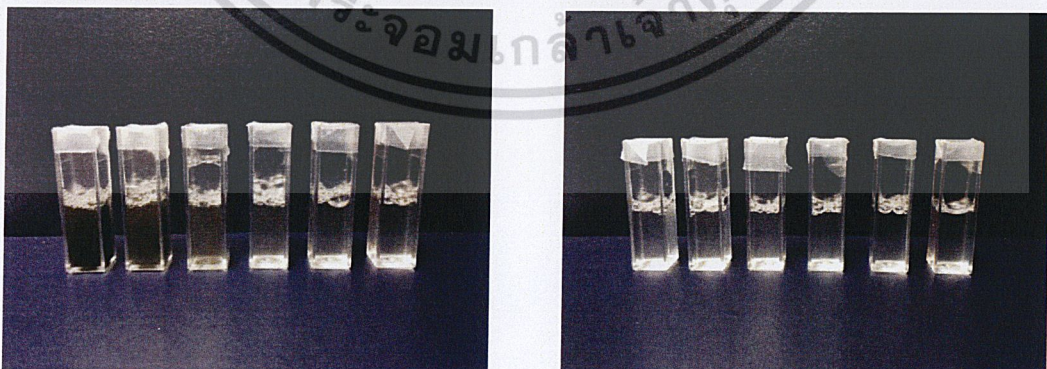
3.2.2.4 ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1-100 μ L ดูดสารละลาย Ferrozine 67 μ L ลงในหลุมเดิมในข้อ (3.2.2.3) แล้วทำการ mix โดยการดูดขึ้น-ลง 10 ครั้ง (ขั้นตอนที่ 3.2.2.3-3.2.2.4 ต้องทำตามขั้นตอนเท่านั้น เนื่องจากเป็นกระบวนการทางเคมี)

3.2.2.5 ทำซ้ำข้อ (3.2.2.3-3.2.2.4) กับ 11 หลุมที่เหลือ

3.2.2.6 ทำเหมือนข้อ 3.2.2.3-3.2.2.5 ลงในหลุมที่เป็นตัวควบคุม (Ac)

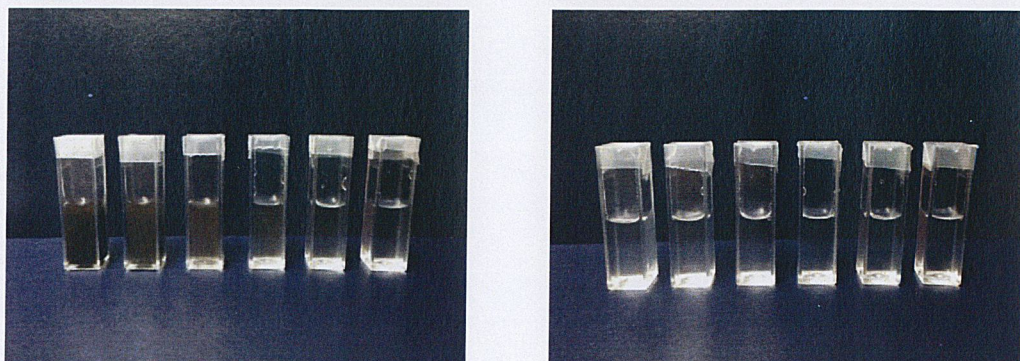
3.2.2.7 หลังจาก mix สารลงในหลุมแรกที่มีเซลล์ และทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที ดูดสารปริมาตร 2 mL จากหลุมที่มีเซลล์ (As) ทั้ง 12 หลุม ลงในคิวเวท 12 อัน

3.2.2.8 จะได้เซลล์ทดลองที่มีสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2.56, 1.28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025, 0 mg/mL ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 As ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.2.2.9 ดูดสารปริมาตร 2 mL จากหลุมที่เป็นตัวควบคุม (Ac) ทั้ง 12 หลุม ลงในคิวเวท 12 อัน เป็นเอกสารส่งงานวิชาสำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
อัน ดังรูปที่ 3.3
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.3 Ac ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.2.2.10 นำเซลล์ (As) และตัวควบคุม (Ac) ที่ดูดใส่คิวเวททั้งหมด 24 อัน มาวัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

3.2.2.11 นำข้อมูลที่ได้จากโปรแกรม Avasoft 7.4.0 Basic มาคำนวณใน excel และพล็อตกราฟ Ferrous ion chelating (%)

$$\text{Ferrous ion chelating (\%)} = \frac{As}{Ac} \times 100\%$$

3.2.3 ขั้นตอนการนับเซลล์

3.2.3.1 นับเฉพาะหลุมที่มีเซลล์+อาหาร+CuO+DI+FeCl₂+Ferrozine

3.2.3.2 ดูด CuO+DI+FeCl₂+Ferrozine ออกจากหลุมทั้ง 12 หลุม (เซลล์จะเกาะอยู่ที่ก้นหลุม)

3.2.3.3 เติมน้ำ PBS 0.5 mL ลงในหลุมทั้ง 12 หลุม เพื่อชะล้างและหยุดการทำงานของสารละลายต่างๆกับเซลล์ ทิ้งไว้ 1-2 นาที จากนั้นดูด PBS ทิ้ง

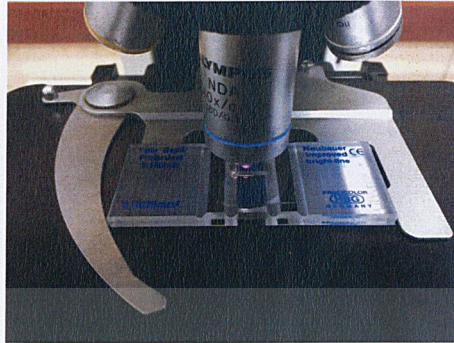
3.2.3.4 เติมน้ำ Trypsin 0.2 mL ลงในหลุมทั้ง 12 หลุม เพื่อย่อยเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้นหลุมให้หลุดออก แล้วทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นดูด Trypsin ทิ้ง

3.2.3.5 เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ 0.4 mL ลงในหลุมทั้ง 12 หลุม แล้วดูดพ่นภายในหลุมให้เซลล์หลุดออกจากก้นหลุม

3.2.3.6 เติมน้ำ Tripen blue 0.1 mL ลงในหลุมทั้ง 12 หลุม ผสมให้เข้ากับเซลล์ (ทำที่ละหลุม โดยเริ่มจากหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุด เนื่องจาก Tripen blue มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จะส่งผลให้เซลล์ตาย)

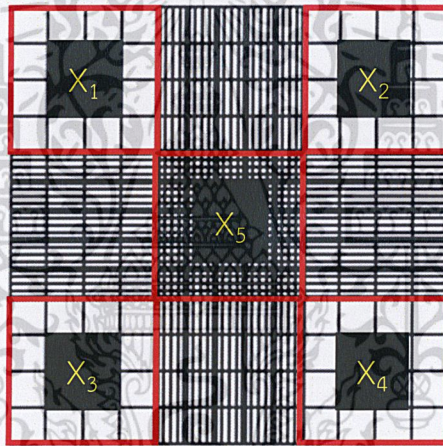
3.2.3.7 นำเซลล์ที่ผสมสีแล้วมาหยดลงบน Hemacytometer แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อทำการนับเซลล์ ดังรูปที่ 3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 นำ Hemacytometer ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.3.8 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เริ่มนับจากหลุมที่ความเข้มข้นต่ำสุดก่อน เพราะจำนวนเซลล์จะมากที่สุด) โดยนับ 5 ช่องใหญ่ ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 แสดงช่องใหญ่ทั้ง 5 ช่อง ที่ต้องนับจำนวนเซลล์

3.2.3.9 นำจำนวนเซลล์ที่ได้มาคำนวณ ดังนี้

$$\frac{x_1+x_2+x_3+x_4+x_5}{5} \times 10^4 \times \frac{5}{4}$$

= 0.5 = Cell 0.4 mL + Tripen blue 0.1 mL

= 0.4 = Cell 0.4 mL

3.2.3.10 นำค่าที่คำนวณได้มาพล็อตกราฟ Live-Cell (%)

$$\text{Live-Cell (\%)} = \frac{Ns}{Nc} \times 100\%$$

เมื่อ Ns คือ จำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นใดๆ

Nc คือ จำนวนเซลล์ที่ค่าความเข้มข้นเป็น 0 mg/mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

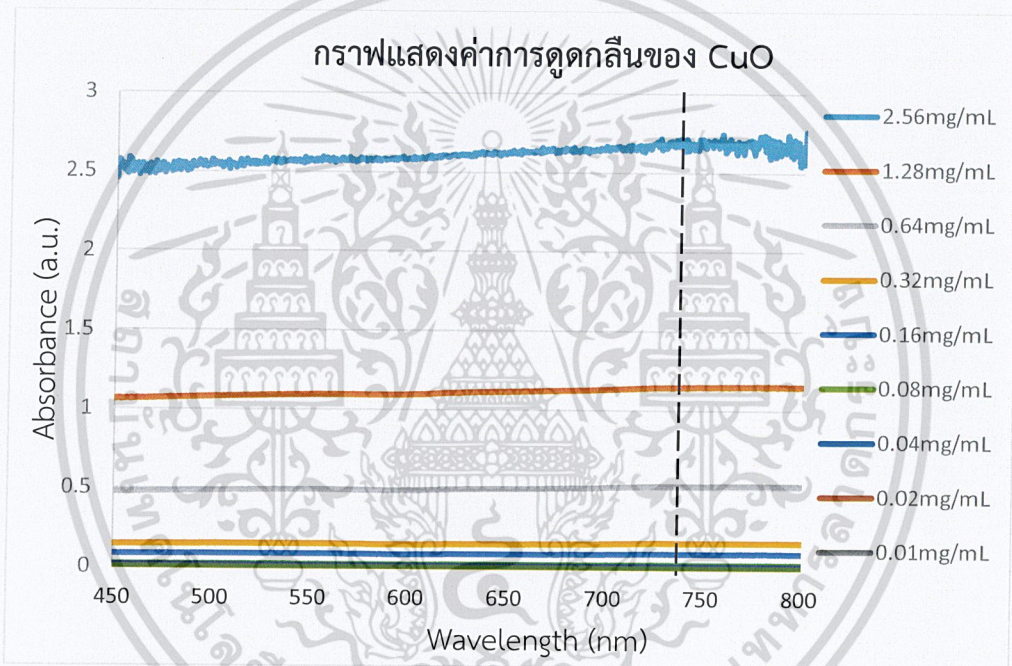
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสมบัติทางแสง

4.1.1 การศึกษาสมบัติทางแสงของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

นำคิวเวทที่มีสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2.56, 1.28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025, 0 mg/mL มาวัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.1 (ในการทดลองจะใช้ค่าความเข้มข้นไม่เกิน 2.56 mg/mL [12] เนื่องจากถ้าความเข้มข้นของสารละลายเกิน 2.56 mg/mL สารละลายจะเข้าไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งเปรียบเสมือนเซลล์ปกติ)

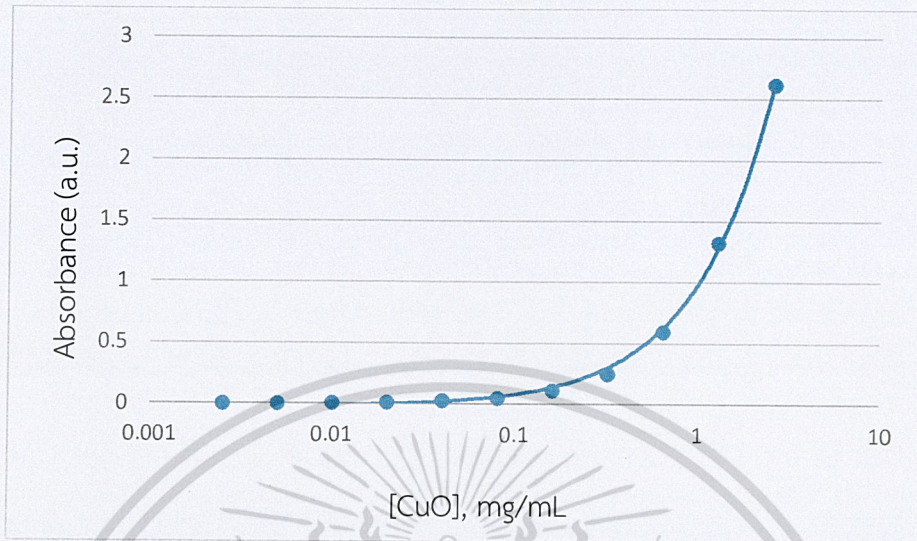


รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นของสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟพบว่า สารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความเข้มข้น 2.56 mg/mL และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นต่ำลง นั่นแสดงว่าค่าการดูดกลืนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert law) [8] จากรูปค่าการดูดกลืนแสงมีพีคสูงสุดตรงกับความยาวคลื่นประมาณ 734 nm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับแบนด์แก๊ปของคอปเปอร์ออกไซด์ (1.7 eV หรือ 729 nm) [13]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

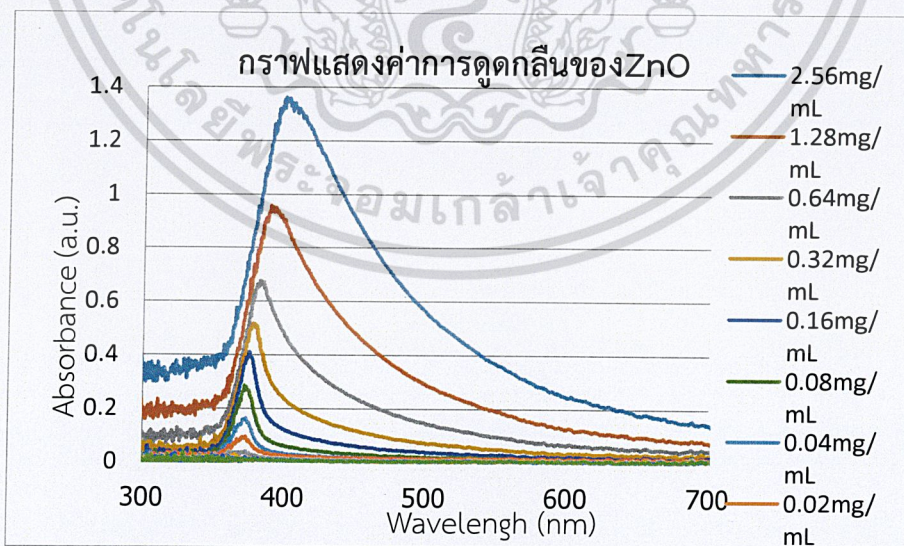
รูปที่ 4.2 แสดงกราฟเอ็กซ์โพเนนเชียลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนสูงสุด (734 nm) กับความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากกราฟรูปที่ 4.1 ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 6 ครั้ง แล้วนำมาเฉลี่ย



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

4.1.2 การศึกษาสมบัติทางแสงของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

นำคิวนวที่มีสารละลายอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2.56, 1.28, 0.64, 0.32 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025, 0 mg/mL มาวัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 (ในการทดลองจะใช้ค่าความเข้มข้นไม่เกิน 2.56 mg/mL [12] เนื่องจากถ้าความเข้มข้นของสารละลายเกิน 2.56 mg/mL สารละลายจะเข้าไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งเปรียบเสมือนเซลล์ปกติ)



รูปที่ 4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นของสารละลายอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟพบว่า สารละลายอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความเข้มข้น 2.56 mg/mL และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นต่ำลง ซึ่งจากรูปค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมีพีคสูงสุดตรงกับความยาวคลื่นประมาณ 379 nm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับแบนด์แก๊ปของซิงค์ออกไซด์ (3.2 eV หรือ 387 nm) [13]

เมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าการดูดกลืนตามหลักการวิเคราะห์กฎของเบียร์-แลมเบิร์ต ดังสมการ

$$\text{ค่าการทะลุผ่าน (Transmittance)} \quad T = I/I_0 \quad (4.1)$$

$$\text{ค่าการดูดกลืน (Absorbance)} \quad A = -\log I/I_0 \quad (4.2)$$

$$\text{และ} \quad A = \alpha bc \quad (4.3)$$

โดยที่ T คือ ค่าการทะลุผ่านของแสง

A คือ ค่าการดูดกลืนของแสง

α คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืน

b คือ ระยะทางที่รังสีเคลื่อนที่ในสารละลาย

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย

ดังนั้นเมื่อค่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์มีค่าเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงก็จะเพิ่มขึ้นไปด้วย ตามสมการที่ 4.3 และค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนของแสงนั้นมีความสัมพันธ์กับความเข้มของแสงเข้าและแสงออก

$$I/I_0 = \exp(-\alpha L) \quad (4.4)$$

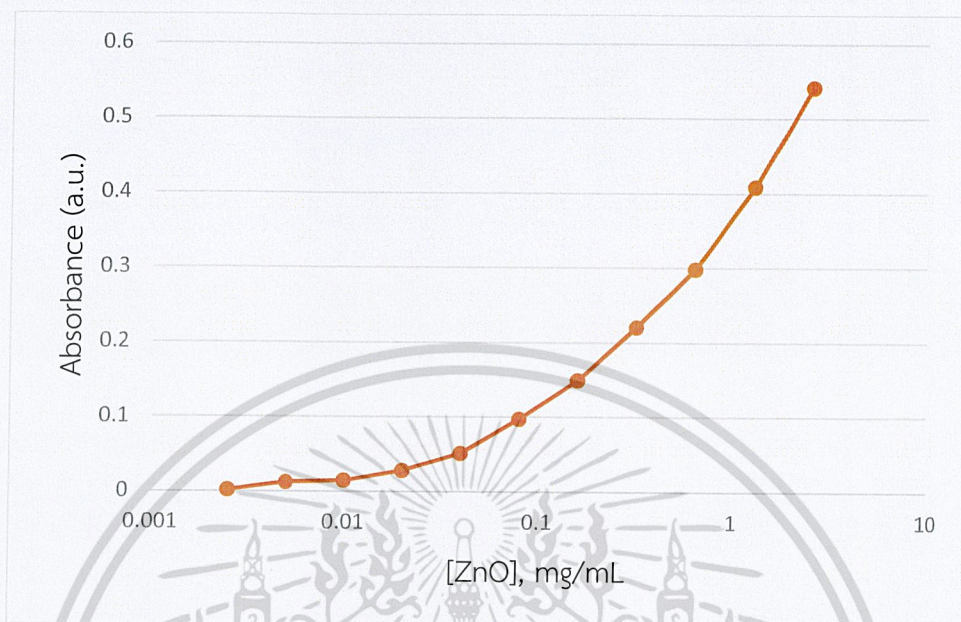
โดยที่ I คือ ความเข้มของแสงตกกระทบ

α คือ สัมประสิทธิ์การดูดกลืน

L คือ ระยะทางที่แสงเดินทางผ่านตัวกลาง

เมื่อค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าความเข้มแสงน้อยลงตามสมการที่ 4.4 ส่งผลให้ค่าสนามไฟฟ้าลดลง เนื่องจากค่าความเข้มแสง (I) เป็นปฏิภาคโดยตรงกับค่าสนามไฟฟ้ากำลังสอง และจากค่าสนามไฟฟ้า $E = E_0 e^{-i\omega t}$ เมื่อค่าความถี่ของแสง ซึ่งมีค่าเท่ากับ $2\pi f$ โดยที่ $f = \frac{c}{\lambda}$ ทำให้ทราบว่าค่าสนามไฟฟ้า (E) เป็นปฏิภาคผกผันกับความยาวคลื่น (λ) ดังนั้นเมื่อค่าสนามไฟฟ้าลดลง ค่าความยาวคลื่นจะมีค่าเพิ่มขึ้นนั่นเอง

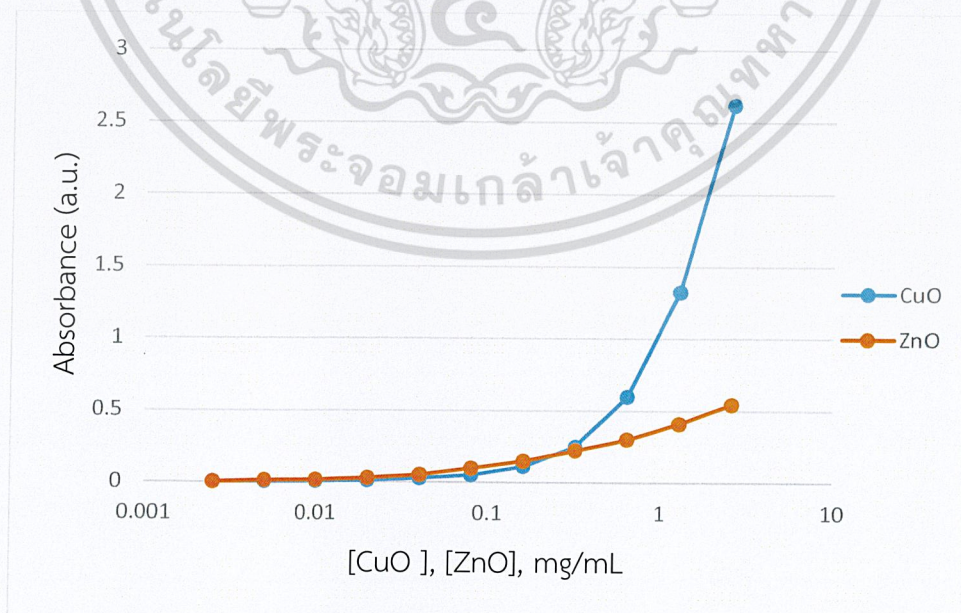
รูปที่ 4.4 แสดงกราฟเอ็กซ์โพเนนเชียลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนสูงสุด (379 nm) กับความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากกราฟรูปที่ 4.3 ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 6 ครั้ง แล้วนำมาเฉลี่ย



รูปที่ 4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

4.1.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่พีคสูงสุดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

รูปที่ 4.5 แสดงกราฟเปรียบเทียบสเปกตรัมของการดูดกลืนที่พีคสูงสุดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ (ยังไม่เติมสารละลาย FeCl_2 33 μL และ Ferrozine 67 μL)



รูปที่ 4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนที่พีคสูงสุดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุขัดแย้งและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

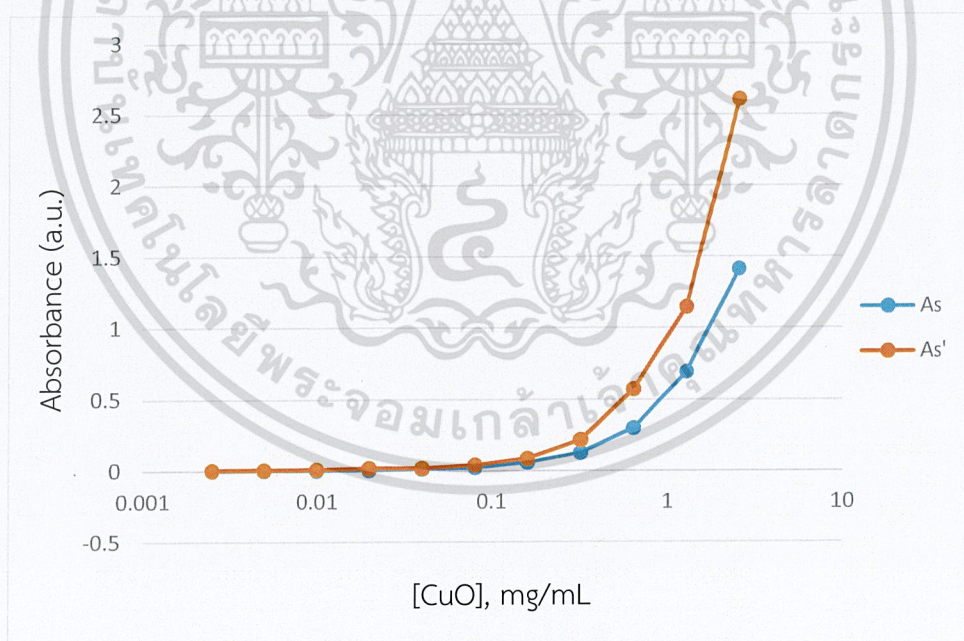
อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีพีคสูงสุดตรงกับความยาวคลื่น 734 nm อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์มีพีคสูงสุดตรงกับความยาวคลื่น 379 nm จากรูปจะเห็นว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีการดูดกลืนแสงสูงกว่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ เนื่องจากอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีแบนด์แก๊ป 1.7 eV หรือ 729 nm ซึ่งแคบกว่าแบนด์แก๊ปของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ซึ่งมีแบนด์แก๊ป 3.2 eV หรือ 387 nm

จากการทดลองเมื่อเติมสารละลาย FeCl_2 33 μL และ Ferrozine 67 μL ลงในหลุมที่มีเซลล์ (As) และหลุมที่เป็นตัวควบคุม (Ac) จากนั้นกระตุ้นด้วย UV และ Visible light รูปที่ 4.6 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ก่อนกระตุ้นด้วย Visible light (As') และหลังกระตุ้นด้วย Visible light (As) และรูปที่ 4.7 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ก่อนกระตุ้นด้วย UV (As') และหลังกระตุ้นด้วย UV (As) เมื่อนำค่าความเข้มข้นหลังกระตุ้นด้วยแสง (C) หารด้วยค่าความเข้มข้นก่อนกระตุ้นด้วยแสง (C_0) และนำมาคูณด้วย 100% จะได้ Diffusion rate ดังสมการที่ 4.1

$$\text{Diffusion rate} = \left(\frac{C}{C_0}\right) \times 100\% \quad (4.1)$$

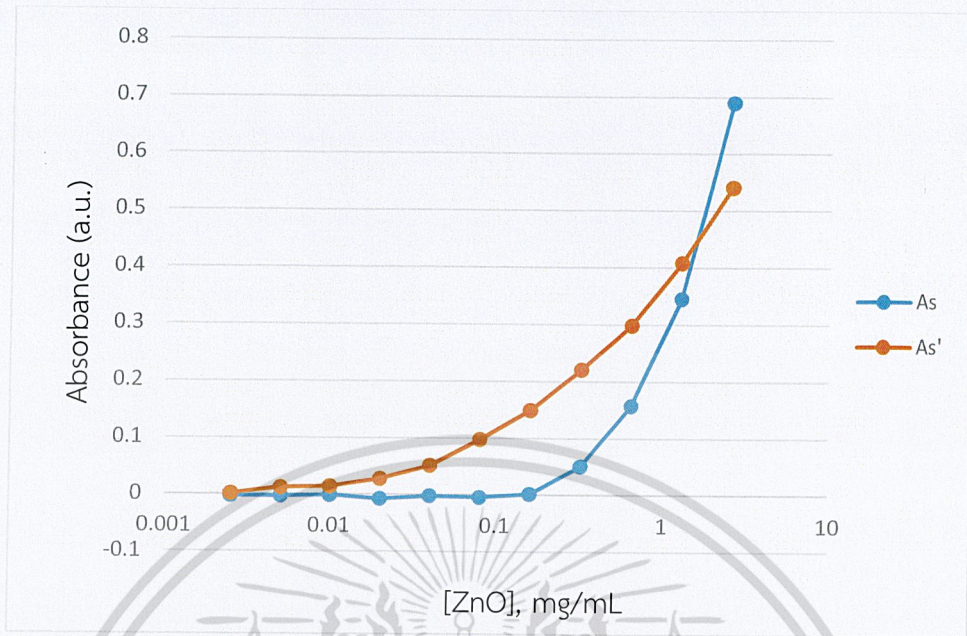
เมื่อ C_0 คือ ค่าความเข้มข้นก่อนกระตุ้นด้วยแสง

เมื่อ C คือ ค่าความเข้มข้นหลังกระตุ้นด้วยแสง



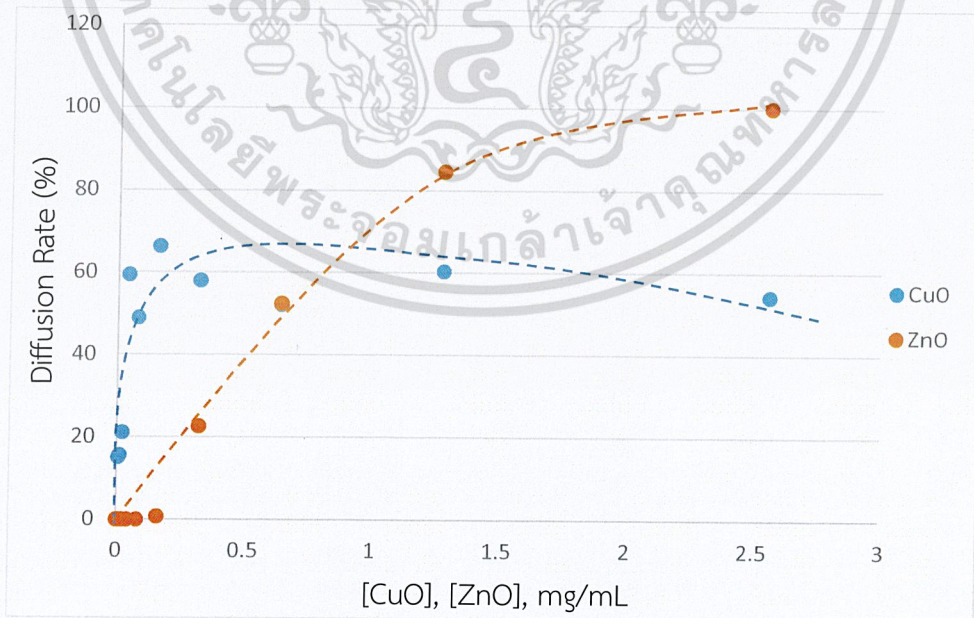
รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ก่อนกระตุ้นด้วย Visible light (As') และหลังกระตุ้นด้วย Visible light (As)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ก่อนกระตุ้นด้วย UV (As') และหลังกระตุ้นด้วย UV (As)

จากกราฟสเปกตรัมการดูดกลืนพบว่า อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ก่อนกระตุ้นด้วยแสงและหลังกระตุ้นด้วยแสงมีสเปกตรัมการดูดกลืนเปลี่ยนไปจากเดิม ค่าการดูดกลืนที่เปลี่ยนไปนี้ สามารถนำมาพล็อตกราฟอัตราการแพร่ของสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 อัตราการแพร่ของสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และซิงค์ออกไซด์เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

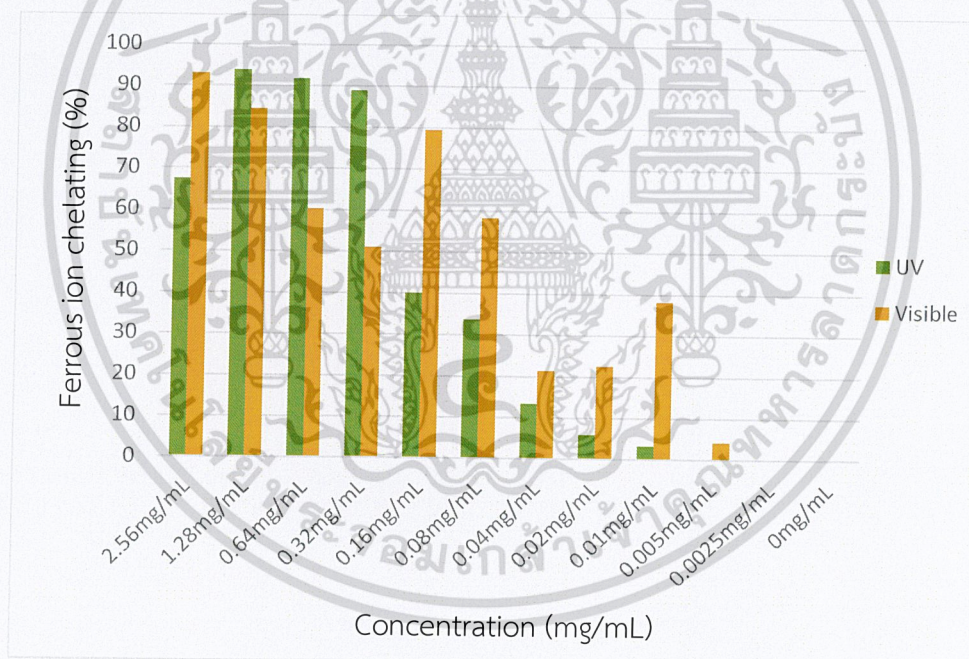
จากกราฟจะเห็นได้ว่า อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมได้น้อยกว่าซิงค์ออกไซด์ ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมได้ไม่เท่าซิงค์ออกไซด์ จึงส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมมีชีวิตรอดมากกว่าเมื่อเทียบกับซิงค์ออกไซด์

ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถยืนยันอีกครั้งได้จาก Ferrous ion chelating (%) และ Live-cells (%)

4.2 การศึกษาผลกระทบต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

4.2.1 ผลกระทบของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

เพื่อทดสอบเปอร์เซ็นต์การจับกับโลหะเชิงซ้อนของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วย UV และ Visible light โดยเติมสารละลาย FeCl_2 33 μL และ Ferrozine 67 μL ลงในหลุมที่มีเซลล์ (As) และหลุมที่เป็นตัวควบคุม (Ac) จากนั้นดูดสารปริมาตร 2 mL จากหลุมทั้ง 24 หลุมลงในคิวนเวท แล้วนำเซลล์และตัวควบคุมที่ดูดใส่คิวนเวททั้งหมด 24 อัน มาวัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากโปรแกรม Avasoft 7.4.0 Basic มาคำนวณใน excel และพล็อตกราฟ Ferrous ion chelating (%) ดังรูปที่ 4.9

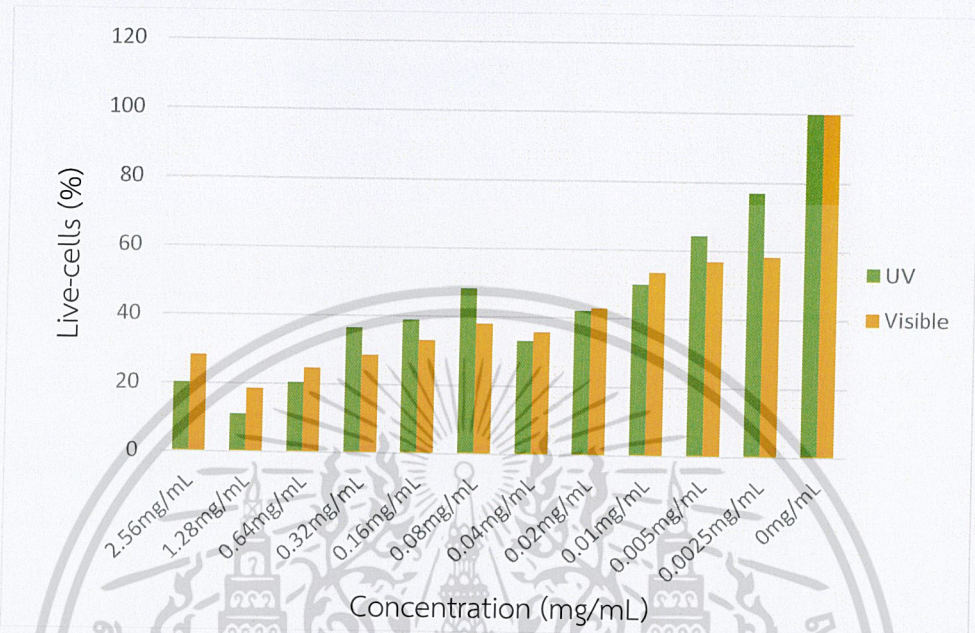


รูปที่ 4.9 ความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

จากกราฟจะเห็นได้ว่าแนวโน้มของเปอร์เซ็นต์การจับกับโลหะเชิงซ้อนที่ถูกกระตุ้นด้วย Visible light ได้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับ UV ยกตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 2.56 mg/mL เปอร์เซ็นต์การจับกับโลหะเชิงซ้อนจะมีค่ามากที่สุด และความยาวคลื่นของ Visible light มีค่า 400-700 nm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับแบนด์แก๊ปของคอปเปอร์ออกไซด์ (1.7 eV)

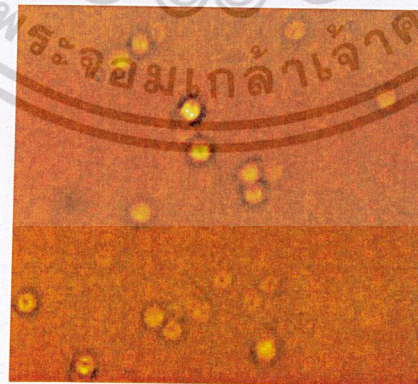
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านม เรานำเซลล์มาหยดลงบน Hemacytometer แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อทำการนับเซลล์ จากนั้นนำจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคำนวณ แล้วนำค่าที่คำนวณได้มาพล็อตกราฟ Live-Cell (%) ดังรูปที่ 4.10



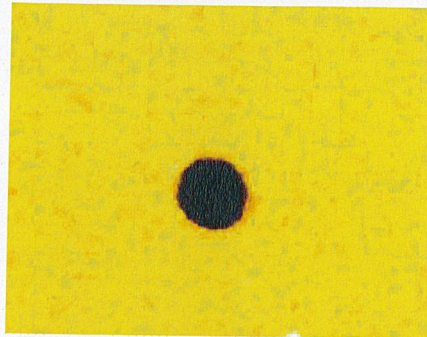
รูปที่ 4.10 การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมกับความเข้มข้นของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์

จากกราฟพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุดเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมจะมีค่าต่ำสุด แต่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายต่ำลงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมก็จะเพิ่มขึ้น และแนวโน้มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะได้ผลดีที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วย Visible light เมื่อเทียบกับ UV เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ที่มีชีวิตรอดมีลักษณะเป็นทรงกลมใส ดังรูปที่ 4.11 และเซลล์ที่ตายจะมีลักษณะเป็นทรงกลมทึบ ดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.11 เซลล์มะเร็งเต้านมที่มีชีวิตรอด (ขนาดเซลล์ $\approx 20 \mu\text{m}$)

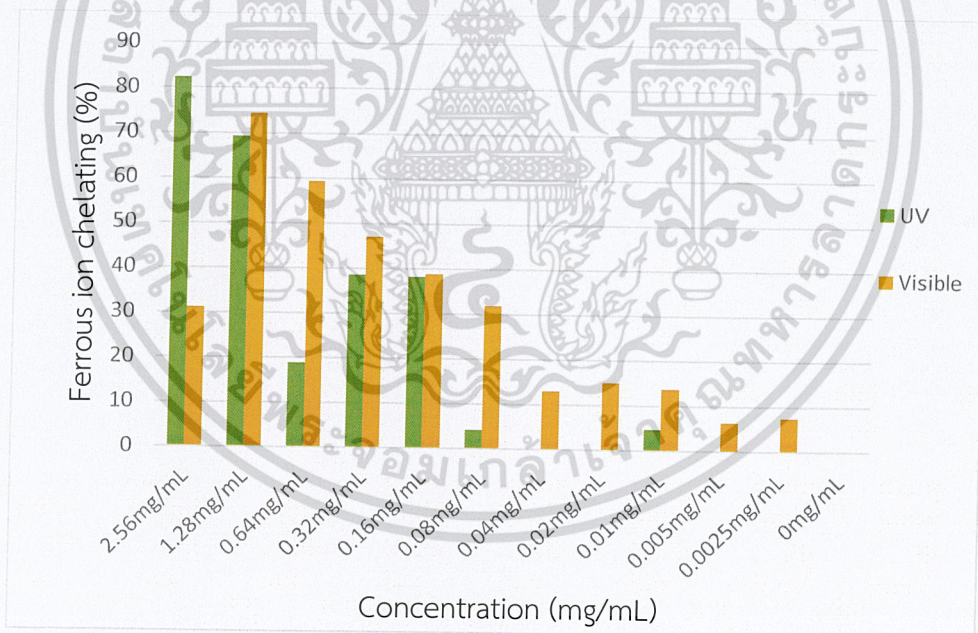
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 เซลล์มะเร็งเต้านมที่ตาย (ขนาดเซลล์ $\approx 20 \mu\text{m}$)

4.2.2 ผลกระทบของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

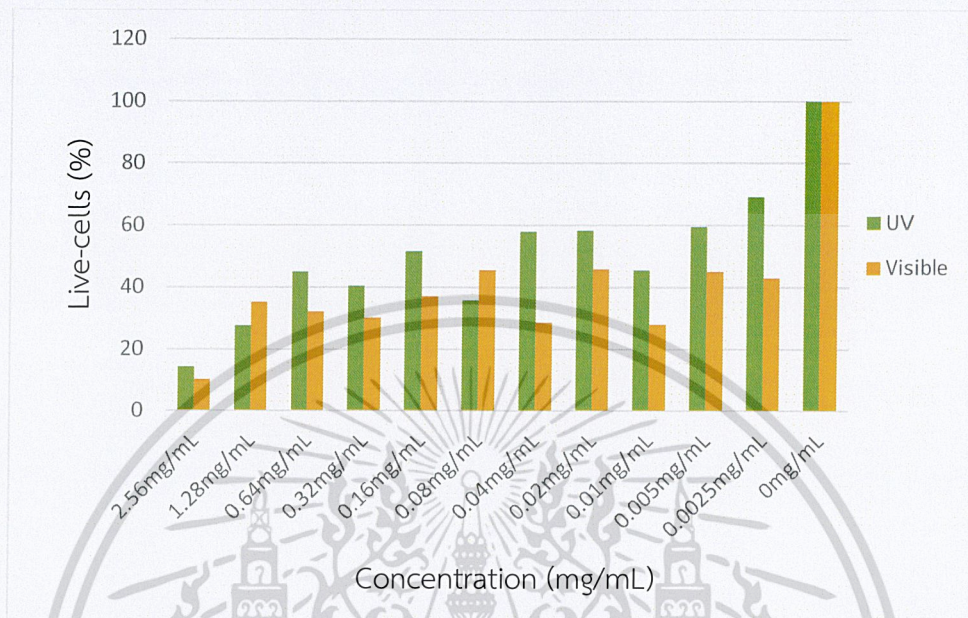
เพื่อทดสอบเปอร์เซ็นต์การจับกับโลหะเชิงซ้อนของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วย UV และ Visible light โดยเติมสารละลาย FeCl_2 33 μL และ Ferrozine 67 μL ลงในหลุมที่มีเซลล์ (As) และหลุมที่เป็นตัวควบคุม (Ac) จากนั้นดูดสารปริมาตร 2 mL จากหลุมทั้ง 24 หลุมลงในคิวเวท แล้วนำเซลล์ (As) และตัวควบคุม (Ac) ที่ดูดใส่คิวเวททั้งหมด 24 อัน มาวัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากโปรแกรม Avasoft 7.4.0 Basic มาคำนวณใน excel และพล็อตกราฟ Ferrous ion chelating (%) ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

จากกราฟจะเห็นได้ว่าแนวโน้มของเปอร์เซ็นต์การจับกับโลหะเชิงซ้อนที่ถูกกระตุ้นด้วย UV ได้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับ Visible light ยกตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 2.56 mg/mL เปอร์เซ็นต์การจับกับโลหะเชิงซ้อนจะมีค่ามากที่สุด และความยาวคลื่นของ UV มีค่า 200-400 nm ซึ่งเอกส มีค่าใกล้เคียงกับแบนด์แก๊ปของคอปเปอร์ออกไซด์ (3.2 eV) นั้น ไม่น่าจะอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านม เรานำเซลล์มาหยดลงบน Hemacytometer แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อทำการนับเซลล์ จากนั้นนำจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคำนวณแล้ว นำค่าที่คำนวณได้มาพล็อตกราฟ Live-Cell (%) ดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมกับความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

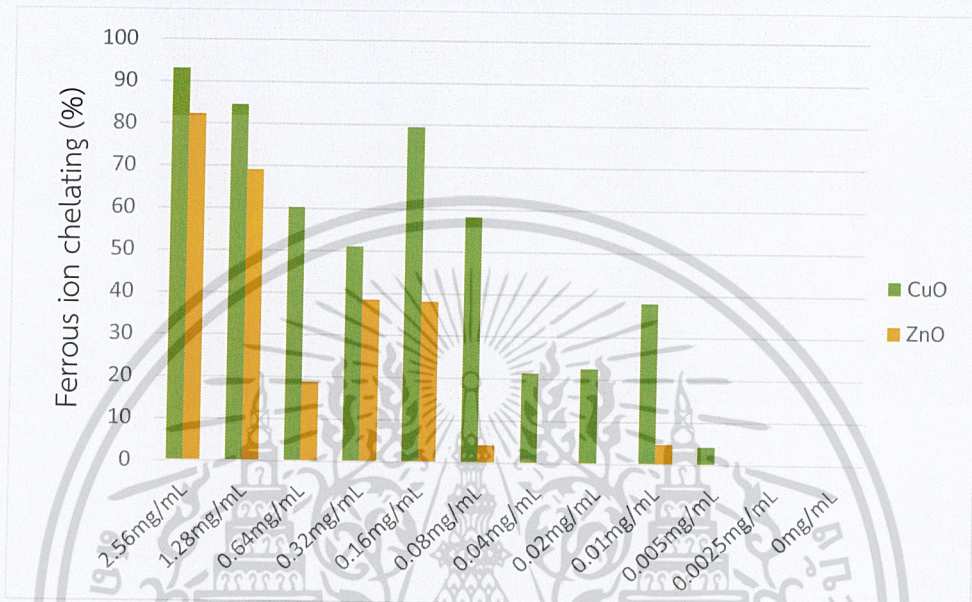
จากกราฟพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุดเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมจะมีค่าต่ำสุด แต่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายต่ำลงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมก็จะเพิ่มขึ้น และแนวโน้มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะได้ผลดีที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วย UV เมื่อเทียบกับ Visible light

4.2.3 ผลกระทบของคอปเปอร์ออกไซด์และซิงค์ออกไซด์ที่มีต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

ในการทดลองของเราสารละลายอนุภาคนาโนจะถูกกล้ำเลียงเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) [2] ซึ่งเป็นการกล้ำเลียงสารขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ กระบวนการเอนโดไซโทซิสมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามกลไกการกล้ำเลียงสาร เช่น ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) พิโนไซโทซิส (pinocytosis) และการนำสารเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับ (receptor-mediated endocytosis) ซึ่งการทดลองเราใช้สารละลายที่เป็นออกไซด์ของโลหะซึ่งเป็นของเหลว สารละลายออกไซด์ของโลหะจะเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมโดยวิธีพิโนไซโทซิส หลังจากทีสารละลายออกไซด์ของโลหะถูกกล้ำเลียงเข้าสู่เซลล์แล้วจะเกิดกระบวนการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้แสง [5] โดยเมื่อแสงเข้าไปกระตุ้นอิเล็กตรอนจะทำให้อิเล็กตรอนที่อยู่ในชั้น Valence Band (VB) ถูกกระตุ้นไปยังชั้น Conduction Band (CB) ซึ่งในชั้นของ Valence Band (VB) จะมี Hole เกิดขึ้น ส่วนอิเล็กตรอนที่อยู่ในชั้น Conduction Band (CB) จะไปรวมตัวกันกับ O_2 เกิดเป็นออกซิเจนไดออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) ใช้เป็นสารตั้งต้นอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species: ROS) และในขณะเดียวกัน Hole ที่อยู่ในชั้น Valence Band (VB) จะไปทำปฏิกิริยากับ H_2O เกิดเป็นไฮดรอกซิล (OH^{\cdot}) และเกิดการ Diffusion เข้าไปรอบๆนิวเคลียสของเซลล์รัศมีไม่เกิน 1 ไมครอน เมื่อสารละลายมีอนุภาคขนาดใหญ่กว่าผนังของนิวเคลียส จะทำให้สารละลายไม่สามารถเดินทางผ่าน

ผนังของนิวเคลียสเข้าไปในนิวเคลียสได้โดยตรง การ Diffusion นี้จะทำให้โครงสร้างของ DNA เปลี่ยนรูปร่างไปจากเดิม ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมถูกทำลาย

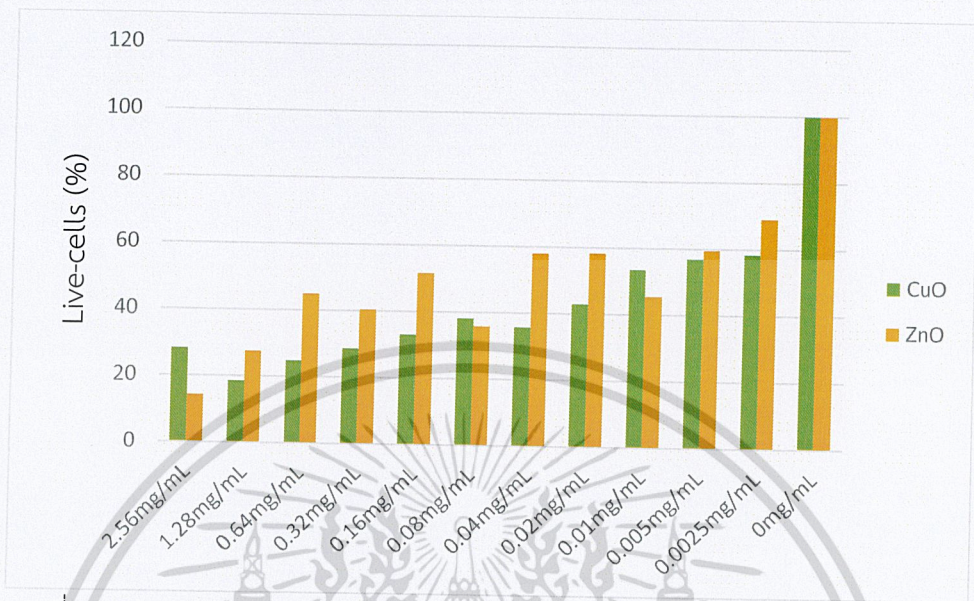
การทดสอบความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 ความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนกับความเข้มข้นของคอปเปอร์ออกไซด์ ที่กระตุ้นด้วย Visible light และซิงค์ออกไซด์ที่กระตุ้นด้วย UV

จากรูปพบว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนได้ดีกว่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ แสดงว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์แพร่เข้าไปในนิวเคลียสได้น้อยกว่าซิงค์ออกไซด์ ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดมากกว่าซิงค์ออกไซด์

การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ และ อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมกับความเข้มข้นของคอปเปอร์ออกไซด์ ที่กระตุ้นด้วย Visible light และซิงค์ออกไซด์ที่กระตุ้นด้วย UV

จากรูปพบว่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ส่งผลให้เซลล์มีชีวิตรอดมากกว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ ซึ่งผลที่ไม่สอดคล้องนี้เกิดจากการที่เราใช้อนุภาคขนาดต่างกันดังนี้ อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ขนาด $\phi < 100$ nm และใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ขนาด $\phi < 50$ nm ซึ่งขนาดของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีขนาดเล็กกว่า เมื่อเทียบกับขนาดของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ในปริมาณที่เท่ากัน และเนื่องจากขนาดที่เล็กกว่านี้ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสของวัสดุเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีกว่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามถ้าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีขนาดเทียบเท่ากับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ $\phi < 100$ nm นั้นหมายความว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์จะทำลายเซลล์มะเร็งได้น้อยกว่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ซึ่งข้อมูลนี้จะสนับสนุนกับผลของ Diffusion rate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าสารละลายที่เป็นออกไซด์ของโลหะที่ถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์ ผ่านกระบวนการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้แสง ทำให้อิเล็กตรอนของออกไซด์ของโลหะที่อยู่ในชั้น Valence Band (VB) ถูกกระตุ้นไปยังชั้น Conduction Band (CB) ซึ่งในชั้นของ Valence Band (VB) จะมี Hole เกิดขึ้น ส่วนอิเล็กตรอนที่อยู่ในชั้น Conduction Band (CB) จะไปรวมตัวกันกับ O_2 เกิดเป็นออกซิเจนไดออกไซด์ ($O_2\cdot^-$) ใช้เป็นสารตั้งต้นอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species: ROS) และในขณะเดียวกัน Hole ที่อยู่ในชั้น Valence Band (VB) จะไปทำปฏิกิริยากับ H_2O เกิดเป็นไฮดรอกซิล ($OH\cdot$) และเกิดการ Diffusion เข้าไปรอบๆนิวเคลียสของเซลล์ เมื่อสารละลายมีอนุภาคขนาดใหญ่กว่าผนังของนิวเคลียส จะทำให้สารละลายไม่สามารถเดินทางผ่านผนังของนิวเคลียสเข้าไปในนิวเคลียสได้โดยตรง การ Diffusion นี้จะทำให้โครงสร้างของ DNA เปลี่ยนรูปร่างไปจากเดิม ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมถูกทำลาย นั้นแสดงว่าผลของการใช้ออนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิส ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง และจากผลการทดลองโดยใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิสโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตและแสงขาว เพื่อก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์เมื่อผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิสโดยใช้แสงขาวกระตุ้น จะได้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับแสงอัลตราไวโอเล็ต เนื่องจากแบนด์แก๊ปของคอปเปอร์ออกไซด์มีค่าประมาณ 1.7 eV หรือ 729 nm ซึ่งใกล้กับความยาวคลื่นของแสงขาว (400-700 nm)

จากการศึกษาผลความเข้มข้นของอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง และเซลล์ปกติ พบว่าเมื่อนำสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ มาวัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (ในการทดลองจะใช้ค่าความเข้มข้นไม่เกิน 2.56 mg/mL เนื่องจากถ้าความเข้มข้นของสารละลายเกิน 2.56 mg/mL สารละลายจะเข้าไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งเปรียบเสมือนเซลล์ปกติ) ผลการทดลองพบว่าสารละลายอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความเข้มข้น 2.56 mg/mL และค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นต่ำลง นั้นแสดงว่าค่าการดูดกลืนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert law) และการดูดกลืนแสงมีพีคสูงสุดตรงกับความยาวคลื่น 734 nm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับแบนด์แก๊ปของคอปเปอร์ออกไซด์ (1.7 eV หรือ 729 nm)

จากการเปรียบเทียบการใช้ออนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์กับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์จากโครงการพิเศษปี พ.ศ.2557 ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง พบว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์มีความสามารถในการจับกับโลหะเชิงซ้อนได้ดีกว่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ แสดงว่าอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์สามารถแพร่เข้าไปในนิวเคลียสได้น้อยกว่าซิงค์ออกไซด์ ดังนั้นอนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมได้ไม่ด้อยกว่าอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ จึงส่งผลให้เซลล์มีชีวิตรอดมากกว่าเมื่อเทียบกับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามเพื่อให้ผลการทดลองออกมาถูกต้อง เราควรจะต้องใช้ออนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ที่มีขนาดเทียบเท่ากับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ $\phi < 100$ nm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมนั้น ควรทำในสภาวะที่มีเซลล์ปกติร่วมด้วย เพื่อทดสอบความเป็นพิษที่จำเพาะของสารละลายอนุภาคนาโนต่อเซลล์มะเร็งโดยไม่ทำลายเซลล์ปกติ

5.2.2 การใช้อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม ควรเพิ่มวิธีอื่น เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิคของกระบวนการโฟโตคะตะไลซิสที่ใช้ในงานวิจัย

5.2.3 อนุภาคนาโนคอปเปอร์ออกไซด์และอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ใช้ ควรมีขนาดเท่ากัน เพื่อจะได้เปรียบเทียบการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมให้ได้ผลอย่างถูกต้อง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- [1] ผไทเทพ รักษา. 2549. “การเตรียมเส้นลวดนาโนคอปเปอร์ออกไซด์โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน.” วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.
- [2] ภัทรดา ชูทอง. ม.ป.ป. เซลล์ของสิ่งมีชีวิต. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.khu.ac.th/partda55/un3endo.html>.
- [3] สาขาศัลยศาสตร์ศีรษะ คอและเต้านม. 2555. มะเร็งเต้านม. กรุงเทพฯ : ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล.
- [4] Altogen Biosystems. 2558. MCF-7 Cells. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.mcf7.com>.
- [5] สมฤทัย ชันซ้าย และพิศมัย วงษ์ละคร. 2555. “การย่อยสลายลิกนินโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตคะตาลีติก.” วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต.
- [6] Glassware Chemical. 2557. ฮีโมไซโตมิเตอร์ Hemocytometer. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://glasswarechemical.com/materials/%E0%B8%AE%E0%B8%B5%E0%B9%82%E0%B8%A1%E0%B9%84%E0%B8%8B%E0%B9%82%E0%B8%95%E0%B8%A1%E0%B8%B4%E0%B9%80%E0%B8%95%E0%B8%AD%E0%B8%A3%E0%B9%8C-hemocytometer/>.
- [7] ศราวุธ แสงอุไร. 2551. เทคนิคปฏิบัติการใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ในการวิเคราะห์ทางเคมี. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.mwit.ac.th/~sarawoot/chem40235.htm>.
- [8] เสาวภาคย์ อีราทรง, รศ.ดร. ภิญโญ พานิชพันธ์ และรศ.ดร.พิณทิพ รื่นวงษา. ม.ป.ป. สีและแสง การวัดการดูดกลืน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light>
- [9] Amrut S. Lanje, Satish J. Sharma, Ramchandara B. Pode, and Raghumani S. Ningthoujam. “Synthesis and optical characterization of copper oxide nanoparticles.” *Advances in Applied Science Research*. 2010(2) : 36-40.
- [10] Sayedeh Fatemeh Shaffiey, Sayed Reza Shaffiey, Mohammad Ahmadi and Farshid Azari. “Synthesis and evaluation of bactericidal properties of CuO nanoparticles against *Aeromonas hydrophila*.” *Nanomedicine Journal*. 2014(3) : 198-204.
- [11] Ameer Azam, Arham S Ahmed, M Oves, MS Khan and Adnan Memic. “Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram positive and -negative bacterial strains.” *International Journal of Nanomedicine*. 2012(7) : 3527-3535.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [12] Dhaneswar Das, Bikash Chandra Nath, Pinkee Phukon, Amarjyoti Kalita and Swapan Kumar Dolui. "Synthesis of ZnO nanoparticles and evaluation of Antioxidant and cytotoxic activity." *Colloid and Surface B: Biointerfaces*. 2013 (111) : 556-560.
- [13] Andrei Ghicov and Patrik Schmuki. "Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO₂ nanotubes and other self-aligned MO_x structures." *The Royal Society of Chemistry*. 2009 : 2791-2808.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้