



รายงานการวิจัย

ผลกระทบทางชีววิทยาของอนุภาคนาโนของเงินต่อกบนา (*Rana rugulosa*)
(Biological impacts of silver nanoparticles on common lowland frogs
(*Rana rugulosa*) frog)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ผลกระทบทางชีววิทยาของอนุภาคนาโนของเงินต่อกบนา *Rana rugulosa*
(Biological impacts of silver nanoparticles on *Rana rugulosa* frog)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.สินีนานู ศิริ

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวคำจันทร์ บำรุงนอก

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558-2559

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องผลกระทบทางชีววิทยาของอนุภาคนาโนของเงินต่อกบนา *Rana rugulosa* ครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2562



บทคัดย่อภาษาไทย

การใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ในผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดความวิตกกังวลมากขึ้นถึงผลทางชีวภาพต่อสัตว์และมนุษย์ ในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาเปรียบเทียบผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันต่อกบนา (*Rana regulosa*) ซึ่งเป็นกบที่มีการบริโภคในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ 3 รูปแบบคือ รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) โดยผลของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์และเทคนิคการเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนในพื้นที่ได้ยืนยันถึงเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้ ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทั้ง 3 รูปแบบมีผลต่อการตาย การเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอกบ โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กมีผลต่อการตาย การลดการเจริญ และพัฒนาการที่ผิดปกติมากที่สุด ซึ่งมีผลแปรผันตามความเข้มข้น ในทำนองเดียวกันอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทั้ง 3 รูปแบบมีผลต่อการเกิดลิฟิตออกซิเดชันในเอ็มบริโอของกบ โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาด 5 นาโนเมตร มีผลต่อการเกิดลิฟิตออกซิเดชันมากที่สุด การสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาด 5 นาโนเมตร พบมากที่สุดที่บริเวณเหงือกของเอ็มบริโอที่กำลังพัฒนา สำหรับกบโตเต็มวัยที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาด 5 นาโนเมตร ทางปาก พบว่ามีการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์มากที่สุดที่กระเพาะอาหาร รองลงมาคือตับ ไต และลำไส้ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าในกบเพศเมียมีการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์มากที่สุดที่ไข่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถขนส่งทางระบบไหลเวียนโลหิตและสามารถผ่านเซลล์ของไข่ได้ การเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลที่ตอบสนองต่ออนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างและขนาดต่างกันได้ทำการศึกษาด้วยเทคนิค Synchrotron-based FTIR micro-spectroscopy ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาด 5 นาโนเมตร มีผลต่อการเปลี่ยนระดับของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดนิวคลีอิก และลิพิดมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปแบบอื่น นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์กับผลชักฟอกในน้ำ โดยมีการติดตามเป็นเวลา 20 วัน ผลการวิเคราะห์จากค่าฟิเคเซอร์เฟสพลาสมอนรี

โซแนนซ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์น่าจะมีการแตกตัวเป็นไอออนซิลเวอร์และจับกับสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังฟอกและตกตะกอน ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อกบขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของอนุภาค



บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Continuously increasing uses of silver nanoparticles (AgNPs) in commercial products raise the concerns on the biological effects of AgNPs on animals and human. This research aimed to compare the effects of different sizes and shapes of AgNPs on common lowland frog (*Rana regulosa*), which is the edible frog commonly found in Thailand and Southeast Asia. In this work, three types of AgNPs were synthesized; small spherical (5 nm), large spherical (100 nm), and large triangular (170 nm) AgNPs. The identity of AgNPs was confirmed by the X-ray diffraction and selected area electron diffraction analyses. The results showed that all types of AgNPs affected the viability, growth, and development of the frog embryos, which the small spherical AgNPs caused the highest mortality, the most decreased growth, and the most abnormal development. These effects were also dose-dependent. Similarly, all types of AgNPs caused lipid peroxidation in frog embryos, while the 5-nm spherical AgNPs caused the highest lipid oxidation. The accumulation of 5-nm AgNPs was predominantly detected in the gill of the developed embryos. For adult frogs, the oral uptake of 5-nm spherical AgNPs caused the highest accumulation in the stomach, followed by livers, kidneys, and intestine, respectively. Besides, the highest accumulation of AgNPs was detected in eggs of female frogs, suggesting that AgNPs potentially transported via a blood circulation system and passed through the cell membrane of eggs. The biomolecular changes in response to different sizes and shapes of AgNPs were also determined by Synchrotron-based FTIR micro-spectroscopy. The results showed that 5-nm spherical AgNPs caused the most modulated levels of carbohydrates, proteins, nucleic acids, and lipids as compared with the other types of AgNPs. Also, under the aqueous condition, the changes of AgNPs in the washing detergent were monitored in a time course of 20 days. As monitored by the surface plasmon resonance peak of AgNPs, the AgNPs were likely changed into silver ions and interacted with other components in the washing detergent to precipitate. Taken together, the results of this work strongly suggested that the biological effects of AgNPs on frogs depended on their size and concentration.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	5
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ลักษณะ และสมบัติที่โดดเด่นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	6
2.1.1 สมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย.....	7
2.1.2 คุณสมบัติเชิงแสง.....	9
2.2 การใช้ประโยชน์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในอุตสาหกรรม.....	10
2.2.1 อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์.....	10
2.2.2 อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภค.....	11
2.2.3 อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์.....	11

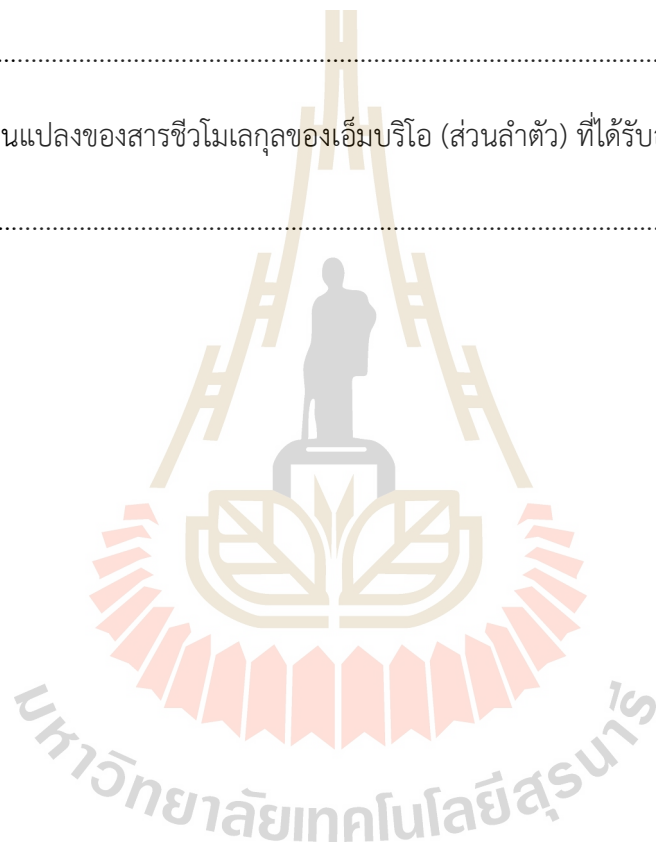
2.3 การตกค้างของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสิ่งแวดล้อม.....	12
2.4 อนุภาคนาโนซิลเวอร์และความเป็นพิษ.....	12
2.4.1 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่รับเข้าร่างกายทางปาก.....	13
2.4.2 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่รับเข้าร่างกายทางการหายใจ.....	14
2.4.3 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทางด้านพันธุกรรม.....	14
2.4.4 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ.....	14
2.4.5 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก.....	16
2.4.6 กลไกการเกิดพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสิ่งมีชีวิต.....	17
2.5 กบนา.....	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	20
3.1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	20
3.1.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	21
3.1.3 การศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	21
3.2 การศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเจริญ พัฒนาการ และอัตราการตายของ เอ็มบริโอของกบ.....	22
3.3 การศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อของกบ.....	23
3.3.1 การศึกษาจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์.....	23
3.3.2 การศึกษาจากการวิเคราะห์ด้วย Atomic Absorption Spectrometer.....	24
3.4 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	24
3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real time reverse transcription- polymerase chain reaction.....	25

3.6 การออกซิเดชันของลิพิด.....	27
3.7 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค Synchrotron-based Fourier Transform Infrared (FTIR) micro-spectroscopy.....	28
3.8 ศึกษาการกระจายตัวและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากผลิตภัณฑ์การค้ำไ น้ำ.....	29
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	30
3.10 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล.....	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย.....	31
4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน.....	31
4.1.1 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก.....	31
4.1.2 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่.....	32
4.1.3 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่.....	33
4.2 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	35
4.2.1 การศึกษารูปร่าง ขนาด และการกระจายขนาดของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ สังเคราะห์ได้.....	35
4.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้.....	37
4.3 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย.....	39
4.4 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการตายของเอ็มบริโอของ.....	43
4.5 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีต่อการเจริญของเอ็มบริโอของกบนา.....	46
4.6 การศึกษาอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อพัฒนาการเอ็มบริโอของกบนา.....	47
4.7 การสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของเอ็มบริโอของกบ นา.....	50

4.8 การศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในอวัยวะของกบนาและไข่.....	53
4.9 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของลิวพิด	54
4.10 การศึกษาการแสดงออกของยีน.....	56
4.11 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลโดยใช้ Synchrotron-based FTIR Micro-spectroscopy.....	60
4.11.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเอ็มบริโอในส่วนหัว.....	61
4.11.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเอ็มบริโอในส่วนลำตัว.....	66
4.12 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในน้ำ.....	70
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	75
เอกสารอ้างอิง.....	78
ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก วัสดุสารเคมี.....	89
ภาคผนวก ข Output of the research.....	91
ประวัตินักวิจัย.....	94
ผู้ร่วมโครงการ.....	96

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ไพร์เมอร์ ยีน และหน้าที่ของยีน.....	26
ตารางที่ 4.1 การสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในอวัยวะและไข่ของกบนาจากการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค AAS	54
ตารางที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเอ็มบริโอ (ส่วนหัว) ที่ได้รับอนุภาคนาโน ซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ	65
ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเอ็มบริโอ (ส่วนลำตัว) ที่ได้รับอนุภาคนา โนซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ	70



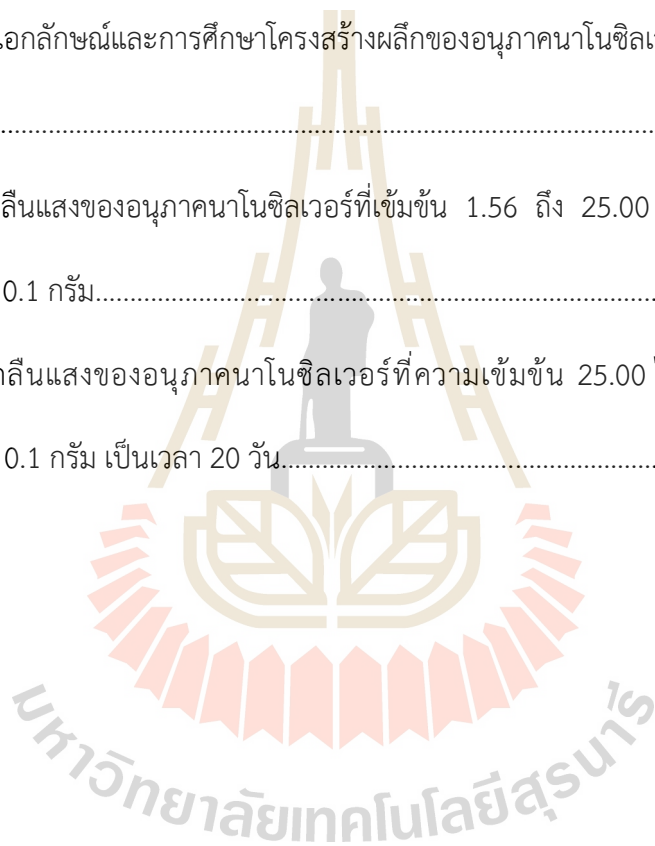
สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 1 สีของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แขวนลอยในน้ำและลักษณะของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดแตกต่างกันในช่วง 5 ถึง 100 นาโนเมตร.....	7
ภาพที่ 2.2 กลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย.....	9
ภาพที่ 2.3 สมบัติเชิงแสงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	10
ภาพที่ 2.4 อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ถูกนำมาใช้เป็น Nanoconnector Nanoelectrode และ Data storage device	11
ภาพที่ 2.5 กบนา <i>Rana rugulosa</i>	19
ภาพที่ 4.1 สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก.....	31
ภาพที่ 4.2 สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่.....	32
ภาพที่ 4.3 สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่.....	33
ภาพที่ 4.4 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กที่สังเคราะห์ได้	35
ภาพที่ 4.5 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ได้.....	36
ภาพที่ 4.6 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ได้.....	36
ภาพที่ 4.7 การวิเคราะห์อนุภาคนาโนรูปร่างกลมขนาดเล็กที่สังเคราะห์ได้.....	37
ภาพที่ 4.8 การวิเคราะห์อนุภาคนาโนรูปร่างกลมขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ได้.....	38
ภาพที่ 4.9 การวิเคราะห์อนุภาคนาโนรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ได้.....	39
ภาพที่ 4.10 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> และ <i>E. coli</i>	41

ภาพที่ 4.11 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> และ <i>E. coli</i>	42
ภาพที่ 4.12 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการตายของเอ็มบริโอของกบ.....	45
ภาพที่ 4.13 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กต่อการเจริญของเอ็มบริโอของกบนา.....	47
ภาพที่ 4.14 พัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอของกบนาเมื่อได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ที่ 6 ชั่วโมง.....	48
ภาพที่ 4.15 พัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอของกบนาเมื่อได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ที่ 12 ชั่วโมง.....	49
ภาพที่ 4.16 พัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอของกบนาเมื่อได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ที่ 18 ชั่วโมง.....	49
ภาพที่ 4.17 พัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอของกบนาเมื่อได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ที่ 24 ชั่วโมง.....	50
ภาพที่ 4.18 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ในการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของกบนา.....	51
ภาพที่ 4.19 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของกบนา.....	52
ภาพที่ 4.20 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของกบนา.....	52
ภาพที่ 4.21 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ต่อการเกิดออกซิเดชันของลิพิด.....	55
ภาพที่ 4.22 อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเอ็มบริโอของกบนาบน 1% อะกาโรสเจล.....	56

ภาพที่ 4.23 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>cyp19</i> และ β -actin.....	58
ภาพที่ 4.24 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>fgf8</i> และ β -actin.....	58
ภาพที่ 4.25 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>MT</i> และ β -actin.....	59
ภาพที่ 4.26 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>P53</i> และ β -actin.....	59
ภาพที่ 4.27 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>SOX9</i> และ β -actin.....	60
ภาพที่ 4.28 ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของเนื้อเยื่อส่วนหัวของเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดใหญ่.....	62
ภาพที่ 4.29 การกระจายกลุ่มตัวอย่างของเอ็มบริโอ (บริเวณส่วนหัว) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แตกต่างกัน.....	62
ภาพที่ 4.30 ค่า loading ของ PC1 (บริเวณส่วนหัว).....	63
ภาพที่ 4.31 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 1000 ถึง 1800 ต่อเซนติเมตร.....	64
ภาพที่ 4.32 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 2800 ถึง 3000 ต่อเซนติเมตร (บริเวณส่วนหัว).....	65
ภาพที่ 4.33 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 1000 ถึง 3000 ต่อเซนติเมตร (ส่วนลำตัว).....	67
ภาพที่ 4.34 การกระจายกลุ่มตัวอย่างของเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แตกต่างกัน (ส่วนลำตัว).....	67
ภาพที่ 4.35 แสดงถึงค่า loading ของ PC1 (ส่วนลำตัว).....	68
ภาพที่ 4.36 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 1000 ถึง 1800 ต่อเซนติเมตร (ส่วนลำตัว).....	68

ภาพที่ 4.37 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 2800 ถึง 3000 ต่อเซนติเมตร (ส่วนลำตัว).....	69
ภาพที่ 4.38 ลักษณะของผงซักฟอกที่นำมาศึกษา และการแยกชั้นของผงซักฟอกเมื่อนำมาปั่น ตกตะกอน.....	71
ภาพที่ 4.39 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 ถึง 900 นาโนเมตร ของแต่ละชั้นที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกชั้นของผงซักฟอก.....	71
ภาพที่ 4.40 การระบุเอกลักษณ์และการศึกษาโครงสร้างผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แยกได้จากผงซักฟอก.....	72
ภาพที่ 4.41 การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เข้มข้น 1.56 ถึง 25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อผงซักฟอก 0.1 กรัม.....	73
ภาพที่ 4.42 การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อผงซักฟอก 0.1 กรัม เป็นเวลา 20 วัน.....	74



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในปี พ.ศ. 2550 ตลาดของผลิตภัณฑ์นาโนเทคโนโลยีทั่วโลกมีมูลค่า 4 หมื่นล้านบาท และคาดการณ์ว่าจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นถึง 43 ล้านล้านบาท ในปี พ.ศ. 2558 (Malanowski, 2006) ผู้ผลิตสินค้าทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทย จึงมุ่งเน้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีความโดดเด่นและประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นโดยมีการนำวัสดุนาโนเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น การนำอนุภาคนาโนสังกะสีที่ใช้เป็นส่วนผสมของสีทาบ้านเพื่อป้องกันเชื้อราอันเกิดจากความชื้นและชะลอการซีดจางของสี อนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เป็นส่วนผสมในครีมกันแดด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวัน เช่น เสื้อผ้า ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเด็ก ยาสีฟัน วัสดุปิดแผล ท่อกรองอากาศ ตู้เย็น เครื่องซักผ้า และ ผงซักฟอก (Klaine et al., 2008) อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ มีโอกาสค่อนข้างสูงที่จะเข้าสู่ชั้นดิน แหล่งน้ำผิวดิน และแหล่งน้ำใต้ดินจากการทิ้ง การทำลาย หรือการซึบลง ที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในสิ่งแวดล้อมดังกล่าวได้ (Yan and Chen, 2019) นอกจากนี้การที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ปนเปื้อนจากชั้นดินสามารถไหลลงไปสู่แหล่งน้ำใต้ดินที่สุด ระบบนิเวศแหล่งน้ำจึงเป็นระบบนิเวศที่มีความเสี่ยงในการได้รับการปนเปื้อนของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ซึ่งควรมีการศึกษาถึงผลกระทบของอนุภาคนาโนนี้ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำด้วย จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ามีการศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 500 ไมโครกรัม/ลิตร ว่าไม่มีผลต่ออัตราการตายของ *Daphnia magna* ซึ่งเป็นสัตว์ในกลุ่ม Crustacean แต่พบว่าเกิดการสะสมในร่างกายได้สูงถึง 83.5 มิลลิกรัม/น้ำหนักแห้ง (Zhao and Wang, 2011) เมื่อศึกษาในสาหร่ายเซลล์เดียว *Chlamydomonas reinhardtii* พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถส่งผลกระทบต่ออัตราการ

สังเคราะห์แสงของสาหร่าย (Nam et al., 2018) นอกจากนี้มีการทดสอบผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในปลาหม้อลาย พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีส่วนในการทำให้อัตราการตายของปลาหม้อลายเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังลดอัตราการฟักออกจากไข่ ขณะเดียวกันก็ส่งผลทำให้รูปร่างของโนโตคอร์ตผิดปกติ การไหลเวียนของเลือดช้าลง เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ และมีสภาวะการเต้นของหัวใจผิดปกติ (Xiu et al., 2012) มากไปกว่านั้น Scown และทีมนักวิจัยจากสถาบันวิจัยเชิงนิเวศวิทยา และชีววิทยาสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเอ็กเซเตอร์ สหราชอาณาจักร รายงานว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *cyp 1a2* ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายของปลาเรนโบว์เทราต์ และยังพบการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในตับและเหงือกของปลาที่ใช้ในการศึกษาอีกด้วย (Scown et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีชีวิตจำพวกสาหร่าย พืชน้ำ ครัสเตเชียน และปลาแล้ว สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นสัตว์อีกกลุ่มหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาผลกระทบของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากกบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติ การแพร่พันธุ์ของกบต้องอาศัยความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติถึง 75 เปอร์เซ็นต์ หากจำนวนประชากรกบลดลง อาจบ่งชี้ถึงการเสียสมดุลของระบบนิเวศของแหล่งน้ำนั้นได้ กบจึงสามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลกระทบของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อกบนา *Rana rugulosa* ซึ่งเป็นตัวแทนของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบได้ทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งนอกจากจะมีความสำคัญในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำและเป็นสิ่งมีชีวิตที่สำคัญในห่วงโซ่อาหารแล้ว ยังมีบทบาทที่สำคัญต่อมนุษย์ในการใช้เป็นแหล่งอาหารของประชาชนในภูมิภาคนี้ ดังนั้นการศึกษากาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อกบนา นอกจากจะมีประโยชน์ต่อความเข้าใจผลกระทบของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศแล้ว ยังทำให้เข้าใจถึงผลกระทบที่อาจมีต่อมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคในห่วงโซ่อาหารนี้อีกด้วย นอกจากนี้ขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนซิลเวอร์คาดว่าจะยังมีผลกระทบท่อกบนาได้แตกต่างกัน แต่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลกระทบทางชีววิทยาของอนุภาคนาโนซิล

เวอร์ที่มีรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกันต่อกบนา (*R. rugulosa* หรือ *Hoplobaatrachus rugulosus*) ซึ่งใช้เป็นโมเดลของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและเป็นอาหารของมนุษย์ เพื่อประเมินผลความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อพัฒนาการและชีววิทยาระดับเซลล์ของกบ ตลอดจนการศึกษาการกระจายตัวและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในน้ำ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาผลของขนาด รูปร่าง และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อความเป็นพิษ การเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอกบนา (*R. rugulosa*)
- 2) เพื่อศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อของกบนา
- 3) เพื่อศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาระดับโมเลกุลภายในเซลล์ของกบนา
- 4) เพื่อศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการไปสะสมในไข่ของกบนา
- 5) เพื่อศึกษาการกระจายตัวและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากผลิตภัณฑ์การค้าในน้ำ (โดยใช้ผงซักฟอกเป็นโมเดลในการศึกษา)

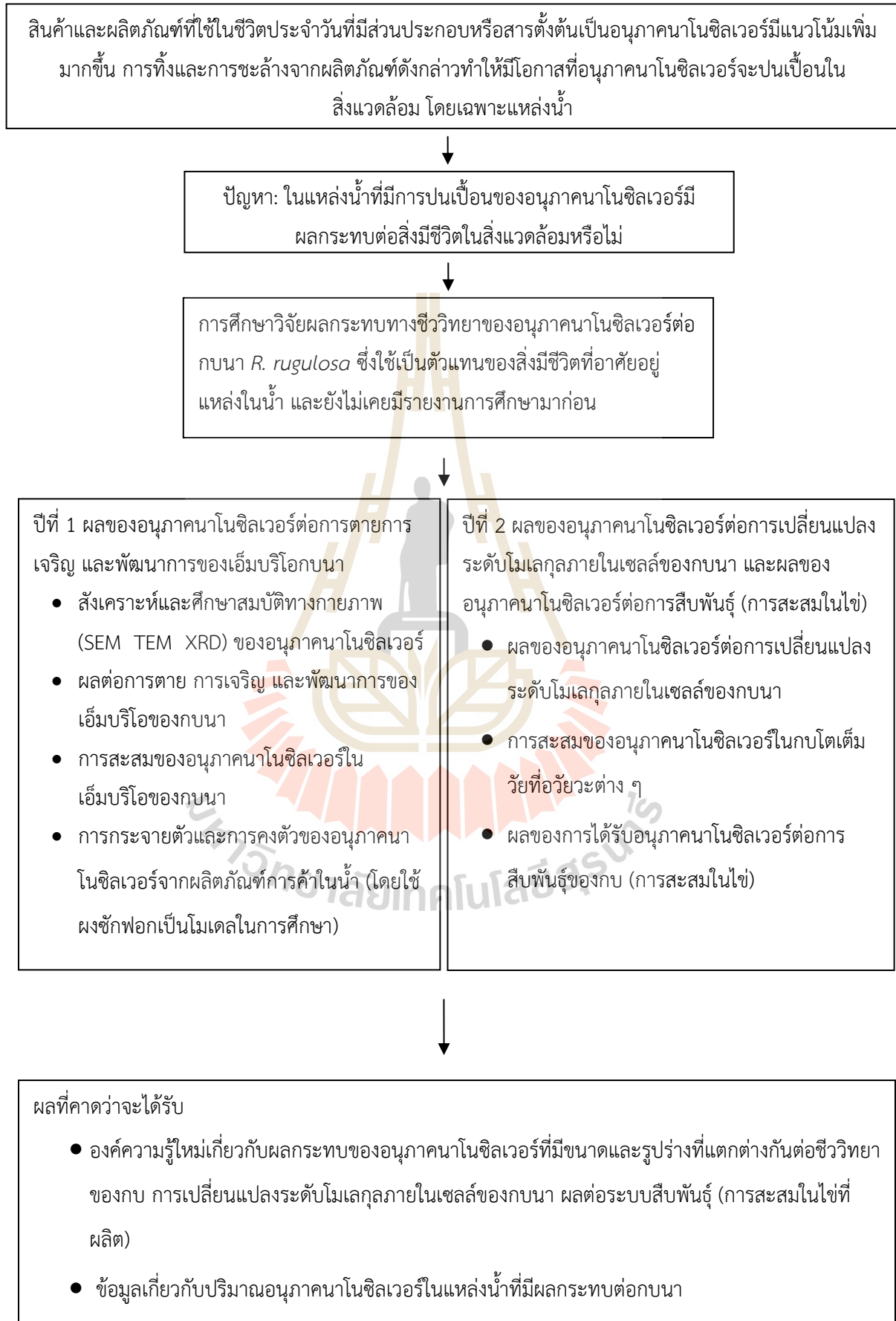
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีขอบเขตรอบคลุมการศึกษาผลกระทบทางชีววิทยาของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาด รูปร่าง และความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อกบนา *R. rugulosa* โดยครอบคลุมการศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการตาย การเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอกบนา ตลอดจนการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล ตลอดจนศึกษาผลของการได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการนำไปสะสมในไข่ของกบนาโตเต็มวัย การศึกษาการกระจายตัว

และการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากผลิตภัณฑ์การค้ำในน้ำ (โดยใช้ผงซักฟอกเป็นโมเดลในการศึกษา)



1.4 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

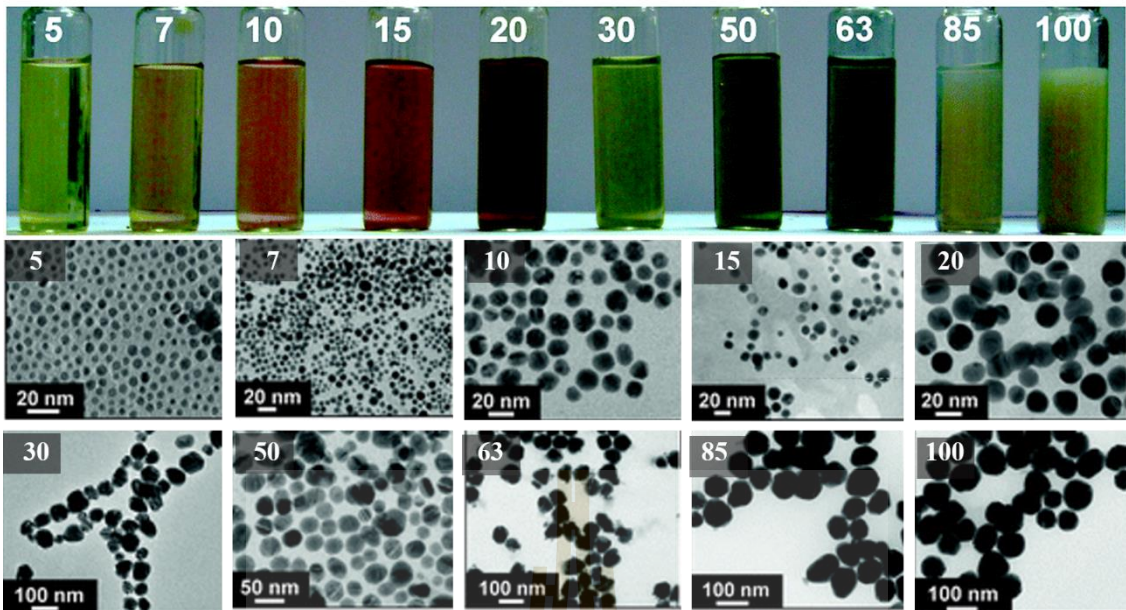


บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะ และสมบัติที่โดดเด่นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ คือ อนุภาคของโลหะซิลเวอร์ ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1 ถึง 100 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในรูปของแข็งที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายหรือที่เรียกว่าคอลลอยด์ สีของสารละลายที่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นองค์ประกอบขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ขนาด และรูปร่างของอนุภาคนาโนดังกล่าว Agnihotri และทีมวิจัยจากศูนย์นาโนเทคโนโลยีและวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีบอมเบย์ ประเทศอินเดีย ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน ตั้งแต่ 5 ถึง 100 นาโนเมตร (Agnihotri et al., 2014) โดยสีของสารแขวนลอยและลักษณะของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้แสดงดังภาพที่ 2.1 เนื่องจากอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีขนาดเล็กมาก จึงมีผลทำให้มีพื้นที่ผิว ชนิดประจุบนพื้นผิว และลักษณะเชิงควอนตัมแตกต่างออกไปจากไปโลหะซิลเวอร์ขนาดใหญ่โดยสิ้นเชิง (Deshmukh et al., 2019) อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน จะส่งผลให้แสดงสมบัติที่แตกต่างกันด้วย เช่น สมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และสมบัติเชิงแสง โดยมีรายละเอียดดังนี้



ภาพที่ 2.1 สีของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แขวนลอยในน้ำและลักษณะของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดแตกต่างกันในช่วง 5 ถึง 100 นาโนเมตร (ที่มา: (Agnihotri et al., 2014))

2.1.1 สมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

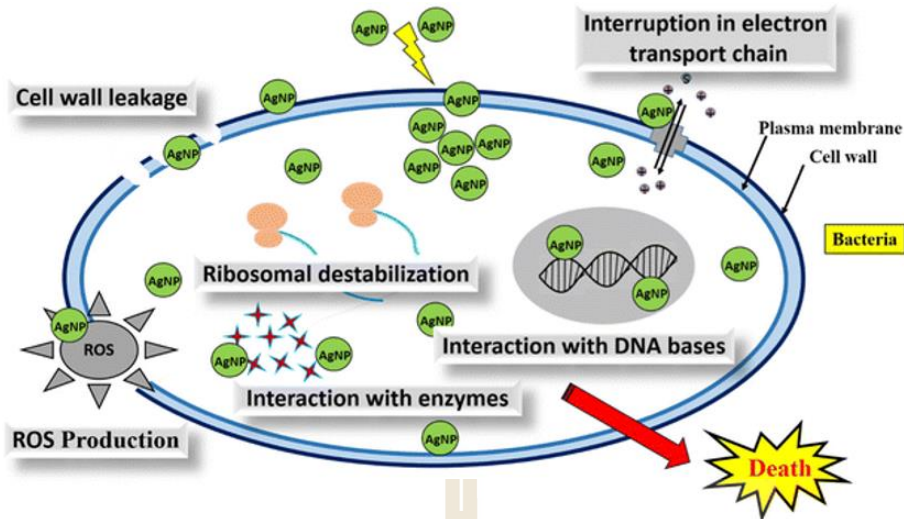
เป็นที่ทราบกันดีว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีสมบัติที่โดดเด่นในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* *Clostridium* *Enterococcus* *Staphylococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น แบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* *Escherichia* *Pseudomonas* *Salmonella* *Vibrio* และ *Acinetobacter* เป็นต้น (Qing et al., 2018) ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ โดย Pal และทีมวิจัยจากมหาวิทยาลัยโซล ประเทศเกาหลี มีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างแตกต่างกัน ได้แก่ ทรงกลม สามเหลี่ยม และแท่ง และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทั้ง 3 แบบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเป็นที่น่าสังเกตว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างสามเหลี่ยม สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สูงที่สุด คาดว่า

เป็นผลเนื่องมาจากมุมของรูปร่างสามเหลี่ยมที่สามารถหุ้มแทงเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลายได้ง่าย (Pal et al., 2007) การอธิบายกลไกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ถูกนำเสนอในงานวิจัยหลายฉบับ ยกตัวอย่างเช่น Xiu และทีมวิจัยจากภาควิชาวิศวกรรมโยธาและสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยไรซ์ สหรัฐอเมริกา ได้เสนอกลไกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยมีเนื้อหา ดังนี้ (ภาพที่ 2.2)

1) อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 10 นาโนเมตร สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้โดยผ่านรูของเยื่อหุ้มเซลล์ภายในเซลล์แบคทีเรีย อนุภาคนาโนซิลเวอร์เหล่านี้สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนอิสระ (Ag^+) ซึ่งประจุบวกของซิลเวอร์ไอออนสามารถเกิดอันตรกิริยากับประจุลบของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ เช่น การเกิดอันตรกิริยากับหมู่ไทออล ($-SH$) ของโปรตีน และหมู่ซัลเฟต ($-PO_4^{2-}$) ของกรดนิวคลีอิก ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นไม่สามารถทำหน้าที่ได้ ส่งผลให้ระบบเมแทบอลิซึมของเซลล์ และกระบวนการทำงานของเซลล์ที่ต้องอาศัยสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ หยุดชะงัก จนกระทั่งเซลล์แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด

2) อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 นาโนเมตร สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียได้ยากกว่า จึงมักอยู่รอบ ๆ เซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเมื่อเกิดการแตกตัวเป็นซิลเวอร์ไอออน ก็สามารถเกิดอันตรกิริยากับประจุลบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ ส่งผลให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเสียโครงสร้างและเกิดรูขนาดใหญ่ ทำให้สารภายในเซลล์ของแบคทีเรียไหลออกภายนอก เกิดการเสียสมดุลของสารละลายภายในเซลล์แบคทีเรีย และทำให้เซลล์แตกได้ในที่สุด

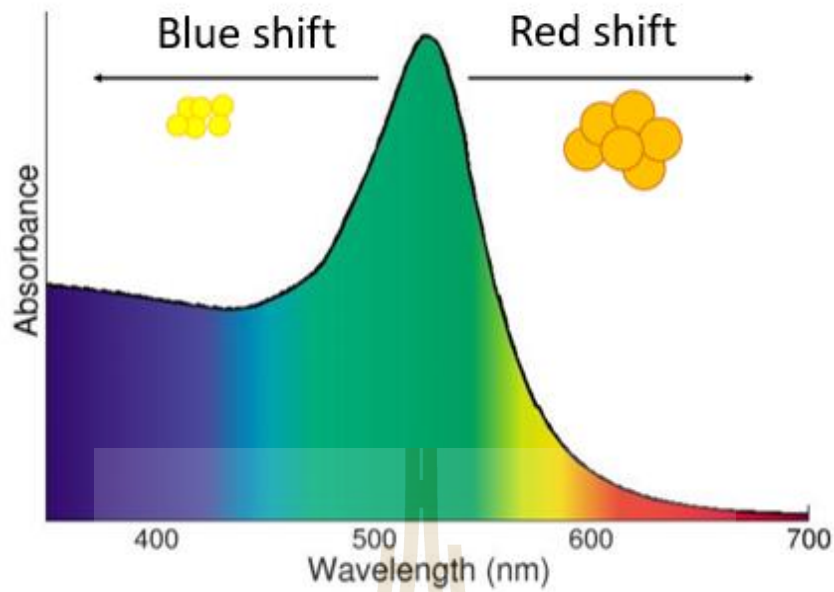
3) อนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถกระตุ้นการหลั่งสารอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species หรือ ROS) ภายในเซลล์ โดยสารอนุมูลอิสระมีผลต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ (โปรตีน เอนไซม์ กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิก) และส่งผลให้สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นทำงานผิดปกติ สามารถเกิดอันตรกิริยากับบริเวณแอกทีฟของผนังเซลล์ ทำให้เกิดรูขนาดใหญ่และเสียสมดุลของของเหลวภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Xiu et al., 2012)



ภาพที่ 2.2 กลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (ที่มา: (Patil and Kim, 2017)

2.1.2 คุณสมบัติเชิงแสง

เป็นที่ทราบกันดีว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีสมบัติเชิงแสงที่โดดเด่นมาก โดยทำให้เกิดปรากฏการณ์เชิงแสงหรือที่เรียกว่า Surface plasmon resonance หรือ SPR ที่ส่งผลให้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ดูดกลืนแสงสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่นที่ 400 ถึง 500 นาโนเมตร (Moore and Goettmann, 2006) โดยพบว่าขนาดของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แตกต่างกัน จะส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกัน Thomas และทีมวิจัยรายงานว่า อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดเล็ก จะมีช่วงการดูดกลืนแสงในช่วงสั้นลงหรือเกิดปรากฏการณ์ Blue shift ในทางตรงกันข้ามอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น จะมีผลต่อการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น หรือที่เรียกว่า Red shift ดังภาพที่ 2.3 (Thomas et al., 2008) สมบัติเชิงแสงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ทำให้มีการนำอนุภาคนาโนซิลเวอร์ไปประยุกต์ใช้กับระบบแสงเลเซอร์ และระบบการตรวจวัดสารสำคัญโดยใช้คุณสมบัติเชิงแสง (Skirtach et al., 2004)



ภาพที่ 2.3 สมบัติเชิงแสงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (ที่มา: (Skirtach et al., 2004)

2.2 การใช้ประโยชน์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในอุตสาหกรรม

2.2.1 อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีสมบัติเชิงแสง การนำกระแสไฟฟ้า และถ่ายเทความร้อนได้ดี วัสดุอิเล็กทรอนิกส์ที่มีการนำอนุภาคนาโนซิลเวอร์มาใช้ ได้แก่ Nanoconnector Nanoelectrode และเวฟไกด์หรือท่อนำคลื่น (Decharat et al., 2015) มากไปกว่านั้น อนุภาคนาโนซิลเวอร์ยังสามารถนำมาผลิตเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิต Data storage device และ Recording devices (Roldan et al., 2007; Tolaymat et al., 2010)



ภาพที่ 2.4 อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ถูกนำมาใช้เป็น Nanoconnector Nanoelectrode และ Data storage device (ที่มา: (Roldan et al., 2007; Tolaymat et al., 2010

2.2.2 อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภค

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภค โดยผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีวัตถุประสงค์หลักในการใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นส่วนประกอบ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณสมบัติในการป้องกัน/ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคและแบคทีเรีย (Kim et al., 2007; Luoma, 2008) และทำให้เกิดการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เช่น เครื่องกรองอากาศ เครื่องฟอกอากาศ เครื่องซักผ้า ตู้เย็น สเปรย์ปรับอากาศ เสื้อผ้า ถุงเท้า หมอน รองเท้า หน้ากาก ผ้าอ้อม สบู่ ผงซักฟอก แชมพู ยาสีฟัน เป็นต้น (Varner et al., 2010)

2.2.3 อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์

อนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ในหลายด้าน ได้แก่ การตรวจโรค การรักษา ระบบนำส่งยา และการเคลือบเครื่องมืออุปกรณ์ทางการแพทย์ โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ถูกนำมาใช้ในการเคลือบผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์หลายชนิด เช่น อุปกรณ์สำหรับการผ่าตัด การรักษาเกี่ยวกับหัวใจ การฉีดยา และการระงับความรู้สึก เป็นต้น (Wijnhoven et al., 2009) นอกจากนี้ยังได้มีการนำอนุภาคนาโนซิลเวอร์ไปใช้ในผลิตภัณฑ์ทั่วไปทางการแพทย์ เช่น ผ้าปิดแผล ถุงเท้า ผ้าหรือสิ่งทอทางการแพทย์ สายสวนปัสสาวะ และวัสดุปลูกเนื้อ ในทางการแพทย์ อนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับกระดูก เช่น การเป็นสาร Additive ใน Bone cement ใช้ในการ

เคลื่อนข้อต่อและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับกระดูก (Tolaymat et al., 2010) และได้นำไปใช้ในการทำฟันปลอมอีกด้วย (Koroglu et al., 2016) นอกจากนี้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ยังได้ถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (Asharani et al., 2007) และการรักษาในระบบนำส่งยาร่วมกับเลเซอร์ รวมไปถึงการกำจัดเชื้อไวรัส HIV-1 (Elechiguerra et al., 2005)

2.3 การตกค้างของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสิ่งแวดล้อม

อนุภาคนาโนซิลเวอร์เมื่ออยู่ในน้ำสามารถแตกตัวเป็นซิลเวอร์ไอออนอิสระได้ ขณะเดียวกันบางส่วนยังคงลักษณะสมบัติเป็นคอลลอยด์ด้วย ซึ่งสภาพความเป็นประจุบวกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถเกิดอันตรกิริยากับประจุลบของสารชีวโมเลกุล หรือสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมได้ ส่งผลให้เกิดสารเชิงซ้อนขนาดใหญ่ที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้ง่าย เช่น ดิน ตะกอนดิน เป็นต้น อนุภาคนาโนซิลเวอร์จะรวมตัวกันเป็นก้อนที่ใหญ่ขึ้น และก่อกองสะสมอยู่บริเวณหน้าผิวดินตะกอน ซึ่งเมื่อมีการสะสมปริมาณสูงขึ้นอาจส่งผลให้ดินตะกอนบริเวณนั้นมีสภาพความเป็นกรดได้ (Deshmukh et al., 2019) อนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถสะสมในเซลล์จุลชีพ และสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น แบคทีเรีย สาหร่าย เต่า หอย ปลา ปู กุ้ง เป็นต้น (Chen and Zhang, 2014) โดย Rosa ได้รายงานค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Kp) ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสิ่งแวดล้อม ดังนี้ 1) ดิน/น้ำเท่ากับ 2.6 ลิตร/กิโลกรัม 2) ดินตะกอน/น้ำ เท่ากับ 3.6 ลิตร/กิโลกรัม และ 3) สารแขวนลอย/น้ำ เท่ากับ 4.9 ลิตร/กิโลกรัม จากรายงานข้างต้นจะพบว่า อนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถกระจายตัวในลักษณะแขวนลอยในตัวกลางที่เป็นน้ำมากที่สุด รองลงมาคือ ดินตะกอน/น้ำ และ ดิน/น้ำ ตามลำดับ (Rosa et al., 2016)

2.4 อนุภาคนาโนซิลเวอร์และความเป็นพิษ

อนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กในระดับ 1 ถึง 100 นาโนเมตร ซึ่งถูกนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในชีวิตประจำวันมากที่สุด เนื่องด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

การเจริญและทำลายแบคทีเรีย จึงมีการนำอนุภาคนาโนซิลเวอร์มาประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสมบัติของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส และการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์บางชนิด (Shahverdi et al., 2007) การที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ถูกนำมาใช้ในภาคอุตสาหกรรมและเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ทำให้มีความกังวลเกี่ยวกับผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมถึงมนุษย์ ดังนั้นจึงมีการวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสัตว์ ซึ่งมีข้อมูลดังนี้

2.4.1 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่รับเข้าร่างกายทางปาก

ในการทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากการได้รับทางปากนั้น ได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับหนู (Rat) ที่มีอายุ 8 วัน โดยใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ขนาด 60 นาโนเมตร และให้หนูได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน ในระดับที่แตกต่างกัน คือ ในปริมาณต่ำ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในปริมาณปานกลาง 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และในปริมาณสูง 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยวัดความเป็นพิษที่มีต่อลักษณะสมบัติทางชีวภาพเคมีของเลือด การตรวจสอบทางโลหิตวิทยา (Hematology) และการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology) ผลการศึกษาพบว่า การได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในการศึกษานี้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนู แต่พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับของเอนไซม์ Alkaline phosphatase และคลอเลสเทอรอลเมื่อหนูได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในปริมาณที่สูงกว่า 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในขณะที่ผลจากการตรวจสอบด้าน Micronucleated polychromatic erythrocytes (MN PCEs) หรือ การตรวจสอบสัดส่วนของ Polychromatic erythrocytes เทียบกับ Erythrocytes ที่มีทั้งหมด พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง และจากการตรวจวัดอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ พบว่าการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อจะสัมพันธ์กับปริมาณการได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ของหนู (Sung et al., 2008a)

2.4.2 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่รับเข้าร่างกายทางการหายใจ

Sung และทีมวิจัยได้มีการทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อกับหนู (Rat) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 20 นาโนเมตร ในปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 1) ปริมาณต่ำ 0.7×10^6 อนุภาค/ลูกบาศก์เมตรอากาศ 2) ปริมาณปานกลาง 1.4×10^6 อนุภาค/ลูกบาศก์เมตรอากาศ และ 3) ปริมาณสูง 2.9×10^6 อนุภาค/ลูกบาศก์เมตรอากาศ อย่างต่อเนื่องทุก ๆ 6 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 90 วัน ผลการศึกษาพบว่าหนูมีปริมาตรอากาศในการหายใจเข้า-ออกในอัตราที่ลดลง นอกจากนี้ถ่วงของหนูที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีอาการอักเสบเพิ่มขึ้นแบบแปรผันตรงกับปริมาณอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เมื่อศึกษาความหนาของชั้นผนังของถุงลม พบว่าชั้นผนังของถุงลมหนาขึ้นซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับถ่วงของหนูปกติที่ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ยิ่งไปกว่านั้นพบก้อนเนื้อขนาดเล็กปริมาณมากกระจายอยู่บริเวณเยื่อเยื่อถุงลมของหนูที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (Sung et al., 2008b)

2.4.3 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทางด้านพันธุกรรม

Ahamed และทีมวิจัยจากสาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ ศูนย์ฟื้นฟูและวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มหาวิทยาลัย Dayton ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษทางพันธุกรรมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสารพันธุกรรมในเซลล์ตัวอ่อนและรังไข่ ซึ่งเป็นตัวแทนของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม จากการทดลองพบว่าสารพันธุกรรมในเซลล์ตัวอ่อนและรังไข่ของหนูที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีการถูกทำลายอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับสารพันธุกรรมของหนูในชุดควบคุม (Ahamed et al., 2008)

2.4.4 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ

แม้จะมีการศึกษาถึงความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ แต่มีการศึกษาค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกระทบของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ในแหล่งน้ำ และพฤติกรรมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เกิดขึ้นเมื่ออยู่ในน้ำ ทั้งนี้หากอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีการกระจาย

การรวมกลุ่มกันเป็นก้อน การรวมตัวกับสารอื่น หรือการแตกตัวเป็นประจุ จะมีผลต่อความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำแตกต่างกัน จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ปริมาณต่ำ (น้อยกว่า 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับ นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของวัฏจักรของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่มปริมาณอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (มากกว่า 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร) พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เซลล์หดตัว และมีรูปร่างผิดปกติ นอกจากนี้พบว่าการรวมตัวของไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้น $47.9 \pm 3.2\%$ ในช่วงที่เซลล์มีการแบ่งนิวเคลียส (Binucleated cells) โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีผลต่อการทำลายโครโมโซมมากกว่าอนุภาคนาโนโพลิสไตรีนและไอออนของ Ag^+ โดยกรดอะมิโนซิสเตอีนซึ่งมีความเป็นประจุสูงสามารถจับกับ Ag^+ จากอนุภาคนาโนซิลเวอร์และมีผลให้พัฒนาการของไมโครนิวเคลียสถูกยับยั้ง เมื่อพิจารณาผลของ Ag^+ พบว่ายังไม่สามารถอธิบายกลไกในเชิงชีวภาพได้ จากผลการอภิปรายสามารถสรุปได้ว่าทั้งอนุภาคนาโนซิลเวอร์ระดับนาโนตลอดจน Ag^+ ที่ได้จากอนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษได้ (Kawata et al., 2009) สำหรับการศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสิ่งมีชีวิต มีศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสภาวะเฉียบพลันและเรื้อรังต่อสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ *Daphnia pulex* *Ceriodaphnia* *Ceriodaphnia dubia* *Caenorhabditis elegans* *Daphnia magna* และ *Ceriodaphnia dubia* ซึ่งในสภาวะที่ไม่ให้อาหารแก่สัตว์ทดลอง อนุภาคนาโนซิลเวอร์ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำมีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง แต่หากสัตว์เหล่านี้ได้รับอาหารเป็นปกติ จะสามารถทนต่อความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการศึกษาในสัตว์น้ำที่มีกระดูกสันหลัง มีการศึกษาใน *Pimephales promelas* (fathead minnow) *Danio rerio* (zebra fish) และ *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) การศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสัตว์มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในน้ำ โดยมากมีการศึกษาผลของอนุภาคนาโนต่อการเจริญเติบโต พัฒนาการ และอัตราการตายของสัตว์ทดลอง ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อปลาหมอสี (Zebra fish) ซึ่งพบว่ามีผลต่ออัตราการฟักไข่ อัตราการรอดชีวิต

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระยะตัวอ่อน รูปร่างของโนโตคอร์ต การไหลเวียนของเลือด และความผิดปกติของหัวใจ (Asharani et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีผลให้เกิดการตายอย่างเฉียบพลัน มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการทำลายดีเอ็นเอ ยีนที่ควบคุมการลดความเป็นพิษของโลหะ ยีนที่ควบคุมเมแทบอลิซึมต่าง ๆ และยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะออกซิเดชันของเซลล์ (Chae et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยถึงผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อตัวอ่อนของปลา ซึ่งมีผลพัฒนาการของระบบหัวใจและระบบประสาทส่วนกลาง พัฒนาการของตัวอ่อนและรูปร่างตัวอ่อน และมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะความเครียดที่เกิดจากสภาวะออกซิเดชัน (Laban et al., 2010) ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่ากลไกผลกระทบของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อตัวอ่อนของปลาตามที่กล่าวมาข้างต้น อาจเกิดขึ้นบนสมมติฐาน 2 แบบ ได้แก่ การเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษด้านผิวของเซลล์ และการรับอนุภาคนาโนซิลเวอร์เข้าเซลล์แล้วทำให้เกิดผลภายในเซลล์

2.4.5 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในปลา กบยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่ามีเพียงกบ 2 ชนิด ที่ได้ถูกรายงานถึงผลที่เกิดจากการได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ คือ Marsh frog (*Pelophylax ridibundus* or *Rana ridibunda*) และ American claw frog (*Xenopus laevis*) โดย Johari และคณะได้เปรียบเทียบผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีและวิธีทางกายภาพต่อลูกอ๊อดของ Marsh frog ผลการศึกษาพบว่าวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์มีผลต่อระดับความเป็นพิษของอนุภาค โดยค่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ทำให้ลูกอ๊อดตายเป็นจำนวนครึ่งหนึ่ง มีค่าเท่ากับ 0.055 ± 0.004 และ 0.296 ± 0.085 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (Johari et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของสารเคลือบผิวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อระดับความเป็นพิษของอนุภาค โดยที่สารเคลือบที่มีประจุบวกจะมีผลต่อการสืบพันธุ์และพัฒนาการของ *X. laevis* มากกว่าสารเคลือบที่เป็นประจุลบ (Saibene et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *X. laevis* และมีผลรบกวนการ

ทำงานของไทรอยด์ฮอร์โมน (Carew et al., 2015) เนื่องจากว่าในกลุ่มของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (โดยเฉพาะตัวอ่อน) ค่อนข้างมีความไวต่อสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำ จึงได้รับความสนใจในการใช้เป็น ตัวแทนของสิ่งมีชีวิตในการศึกษาผลกระทบของอนุภาคนาโนในแหล่งน้ำ แต่อย่างไรก็ตามกบจากการศึกษาข้างต้นนี้ ไม่ใช่ชนิดที่เป็นสัตว์ประจำถิ่นในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อกบชนิดที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จึงมีความสำคัญและควรมีการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งกบนาถูกใช้เป็นอาหารในภูมิภาคนี้ ดังนั้นผลกระทบต่อห่วงโซ่อาหารต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ รวมถึงมนุษย์ จึงควรมีการศึกษาต่อไป

2.4.6 กลไกการเกิดพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสิ่งมีชีวิต

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ พบว่าผลกระทบจากการใช้ อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ กำลังได้รับความสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัญหาการตกค้างในสิ่งแวดล้อม การสะสมในสิ่งแวดล้อม และผลความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต จากรายงาน วิจัยต่าง ๆ พบว่ามีการศึกษาถึงความเป็นพิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อสิ่งมีชีวิตตั้งแต่ระดับสิ่งมีชีวิต เซลล์เดี่ยวไปจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยมีรายงานวิจัยระบุว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีผลยับยั้งการ เจริญของแบคทีเรียและเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมในการศึกษาระดับ *In vitro* ผลต่อการลดลง ของอัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Chlamydomonas reinhardtii* (Navarro et al., 2008) จากความเป็นพิษต่ออนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่กล่าวมาข้างต้นนั้น คาดการณ์ถึงกลไกการเกิด พิษของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ใน 2 แบบ คือ การเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษจากการเกาะภายนอก เซลล์ และการเข้าสู่ภายในเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษโดยตรงจากภายในเซลล์

สำหรับกลไกโดยทั่วไปที่คาดว่าน่าจะเกิดขึ้น และก่อให้เกิดความเป็นพิษของอนุภาคนาโน ซิลเวอร์ต่อสิ่งมีชีวิต เริ่มจากการเข้าสู่สิ่งมีชีวิตซึ่งเกิดจากการดูดซึมอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากสิ่งแวดล้อม โดยตรง ส่วนกระบวนการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในสัตว์ ส่วนใหญ่ผ่านทางระบบลำเลียง อาหารแล้วจึงถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ อนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถเข้าสู่เซลล์โดยการแพร่ผ่านเยื่อเซลล์

ด้วยกระบวนการ Endocytosis (Kim et al., 2006) หลังจากนั้นอนุภาคนาโนซิลเวอร์จะถูกสะสมจนถึงระดับที่เซลล์ไม่สามารถจัดการได้ แล้วส่งผลกระทบต่อกลไกต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต เช่น 1) ผลกระทบในระดับโปรตีน เนื่องจากอนุภาคนาโนซิลเวอร์กระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ส่งผลกระทบต่อกลไกการลำเลียงสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ การสังเคราะห์พลังงานภายในเซลล์ และในที่สุดทำให้เซลล์ถูกทำลาย และ 2) ผลกระทบในระดับสารพันธุกรรม อนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถทำให้เกิดผลกระทบต่อดีเอ็นเอ และความผิดปกติของการแสดงออกของยีน จากการศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการแสดงออกของยีนในตัวอ่อนของปลาหมอเลี้ยง พบความผิดปกติในการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พลังงาน และการสังเคราะห์โปรตีน (Ankley et al., 1998)

2.5 กบนา

กบนา (Common lowland frog) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *R. rugulosa* (Wiegmann, 1834) และ *H. rugulosus* อยู่ในวงศ์ Ranidae (ภาพที่ 2.5) เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก พบได้ในทุกภาคของประเทศไทย โดยมีลักษณะที่สำคัญคือ ผิวด้านหลังมีสีน้ำตาลจุดดำ ผิวหนังขรุขระมีรอยย่น มีแถบดำบนริมฝีปาก ใต้คางมีจุดสีดำหรือแถบลายดำ ขนาดของตัวเมียจะใหญ่กว่าตัวผู้ ซึ่งตัวเมียเต็มวัยมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 200–400 กรัม และตัวผู้เต็มวัยมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 150–250 กรัม เมื่อเข้าสู่ระยะผสมพันธุ์ ท้องของตัวเมียจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เคลื่อนไหวช้าและมีตุ่มอยู่ข้างลำตัว ส่วนตัวผู้ลำตัวจะมีสีเหลือง พบถุงเสียง (Vocal sac) เป็นรอยย่นสีดำที่ใต้คางใช้ในการส่งเสียงร้อง นิ้วเท้าด้านหน้ามีตุ่มที่ขยายใหญ่ขึ้น สามารถมองเห็นได้ชัดเจนทำหน้าที่สำหรับยึดเกาะบนหลังของตัวเมียและตุ่มนี้จะหายไปเมื่ออยู่ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ (Suriya et al., 2014)

กบนาได้รับความนิยมบริโภคเป็นอาหารมากขึ้น เนื่องจากเนื้อกบมีปริมาณโปรตีนสูง สามารถนำมาปรุงอาหารได้หลายชนิด ซึ่งเป็นที่ต้องการทั้งในและต่างประเทศ ทำให้ความต้องการของตลาดขยายตัวสูงขึ้น ไม่เพียงพอกับความต้องการบริโภค ปัจจุบันสามารถขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงในฟาร์มเพื่อให้

สอดคล้องกับความต้องการของตลาด สำหรับกบนาในธรรมชาติพบว่ามีปริมาณลดลง สาเหตุเนื่องจากการขยายตัวของพื้นที่ชุมชนเมืองและทางการเกษตร การปนเปื้อนของสารเคมีพวกสารกำจัดแมลงและอ็อกซอนของโลหะหนัก ทำให้เกิดการสะสมที่อาจส่งผลกระทบต่อพัฒนาการและการเจริญเติบโตของกบนา ดังนั้นการนำกบนาที่มีสารปนเปื้อนมาบริโภคอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ (Bradford et al., 2009)



ภาพที่ 2.5 กบนา (*R. rugulosa*)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์

3.1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์

ในงานวิจัยนี้ต้องการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกัน 2 ขนาด (เล็กและใหญ่) และได้รูปร่างแตกต่างกัน (กลมและสามเหลี่ยม) โดยวิธี Chemical reduction ในการสังเคราะห์จะแบ่งเป็น 3 วิธี เพื่อให้ได้ขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน ดังนี้

1) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก ใช้วิธีของ Darroudi และคณะ (Darroudi et al., 2011) โดยละลายเจลาตินในน้ำปราศจากไอออน 2 กรัม ปริมาตร 190 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 2 โมลาร์ หลังจากนั้นก็เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยขณะที่ทำปฏิกิริยาจะหลีกเลี่ยงไม่ให้โดนแสง

2) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ ใช้วิธีของ Wongravee และคณะ (Wongravee et al., 2013) โดยใช้น้ำตาลทรายความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซิลเวอร์ไนเตรดความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที เติมนโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หลังปฏิกิริยาเก็บสารโดยหลีกเลี่ยงไม่ให้โดนแสง

3) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ใช้วิธีของ Liang และคณะ (Liang et al., 2009) โดยใช้ซิลเวอร์ไนเตรดความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone หรือ PVP มวลโมเลกุล 40,000) 1 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และพอลิเอ

ทีลีนไกลคอล (Polyethylene glycol หรือ PEG มวลโมเลกุล 6,000) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

3.1.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนซิลเวอร์

การตรวจสอบการเกิดอนุภาคนาโนซิลเวอร์โดยวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วง 300 ถึง 900 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS soectrophotometer, Analytik Jena, Germany) เพื่อวิเคราะห์พิกเอกลักษณะ หรือ พิก SPR ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ สำหรับการศึกษารูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้ รูปร่างของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้ ทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope หรือ TEM, Hillsboro, OR, USA) โดยใช้ค่าความตักย์ 200 kV ขนาดของอนุภาควิเคราะห์จากภาพ TEM โดยใช้โปรแกรม Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) ซึ่งทำการวัดอย่างสุ่มจาก 300 อนุภาค คำนวณหาค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยและสร้างฮิสโตแกรมการกระจายขนาดของอนุภาค สำหรับตรวจสอบเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ทำการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction, Bruker, Gemany) โดยใช้ค่าการเลี้ยวเบนของ Cu K α radiation (λ = 1.54 Å; 50 kV and 40 mA) และวัดมุม 2θ ระหว่าง 30 องศา และ 80 องศา

3.1.3 การศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซิลเวอร์

นำสารแขวนลอยของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้มาเจือจางลงครึ่งละสองเท่า โดยเริ่มจากความเข้มข้นที่ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยในการทดลองนี้ใช้แบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ ในการทดลองได้เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร ในอาหารเหลว Mueller Hinton (MH) จากนั้นได้ผสมเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารแขวนลอยของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเหลว MH ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดความขุ่นของแบคทีเรียโดยวัด Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

(OD₆₀₀) โดยในแต่ละการทดลองใช้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 5 เพื่อหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง ในการหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ เป็นการวิเคราะห์จากค่า OD₆₀₀ สำหรับการหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) หรือค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ 99.99% ในการทดลองได้นำแบคทีเรียที่บ่มกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น MIC และสูงกว่าอีก 2 ค่า มากระจายบนอาหารวุ้น MH จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง และบันทึกผลโดยการเจริญของแบคทีเรียทดสอบบนพื้นผิวของอาหารดังกล่าว

3.2 การศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเจริญ พัฒนาการ และอัตราการตายของเอ็มบริโอของกบนา

เอ็มบริโอของกบได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดนครราชสีมา โดยจะใช้กบ *R. rugulosa* ตัวผู้และตัวเมียมาผสมพันธุ์ในสถานที่ที่จัดไว้ให้ กบเป็นสัตว์ที่มีการผสมพันธุ์ภายนอกร่างกาย โดยกบตัวเมียจะปล่อยไข่ออกมาสวมกับน้ำเชื้อของกบตัวผู้ที่ปล่อยออกมาในน้ำ ไข่ที่ได้รับการผสมจะมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอซึ่งระยะนี้เกิดในน้ำที่ไข่ถูกปล่อยออกมา เอ็มบริโอที่นำมาศึกษาผลกระทบของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จะอยู่ในระยะบลาสตูลา (Blastula) ซึ่งเป็นระยะที่พัฒนาหลังจากที่ไข่ได้รับการผสมพันธุ์ประมาณ 3 ชั่วโมง

ในการศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเจริญ พัฒนาการ และอัตราการตายของเอ็มบริโอของกบนา ได้นำเอ็มบริโอของกบนาในระยะบลาสตูลามาแช่ในน้ำที่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่) ที่ความเข้มข้น 0 1 10 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ 50 เอ็มบริโอในแต่ละความเข้มข้น และแต่ละความเข้มข้นมีการทำ 5 ซ้ำ (โดยใช้น้ำบ่อที่กรองด้วยฟिलเตอร์ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และปรับ pH ให้มีสภาพเป็นกลางก่อนทดสอบ) ติดตามการเจริญ พัฒนาการ และอัตราการตายของเอ็มบริโอทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง สำหรับการวัดการเจริญของเอ็มบริโอ ทำการ

ถ่ายภาพและวิเคราะห์การเจริญโดยวัดความยาวจากหัวถึงปลายหาง (Head tip to tail tip) การศึกษาพัฒนาการของเอ็มบริโอ ทำการวิเคราะห์จากภาพถ่ายดิจิทัลที่บันทึกการเปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอ ส่วนอัตราการตายของเอ็มบริโอ คำนวณจากร้อยละของจำนวนที่ตายต่อจำนวนเริ่มต้น ทั้งนี้ น้ำที่มีการปนเปื้อนของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้รวบรวมและส่งกำจัดโดยศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 การศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อของกบ

3.3.1 การศึกษาจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์

ในการศึกษานี้ นำเอ็มบริโอของกบในระยะบลาสตูลาแชในน้ำที่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาแช่ในบัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน (10% formaline ใน 1X phosphate buffer) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (1X phosphate buffer) 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์ 15 นาที โดยค่อย ๆ เพิ่มสัดส่วนของแอลกอฮอล์ ตั้งแต่ร้อยละ 50 ถึงร้อยละ 100 จากนั้นแช่ในไซลิน เพื่อให้ตัวอย่างใส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่ตัวอย่างลงในพาราฟินเหลว (60 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนพาราฟินเหลว และนำมาวางที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้แข็งตัว นำไปตัดด้วยเครื่องตัด Microtome (Leica RM 2125 RT rotary microtome, Germany) ให้มีความหนาของชิ้นตัวอย่าง 5 ไมโครเมตร จากนั้นล้างพาราฟินออกด้วยการลอยตัวอย่างในอ่างน้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตีรังตัวอย่างลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วย้อมสีตัวอย่างด้วยอีโอซิน (Eosin) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยเอทานอล 70% และเอทานอล 100% เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ (Goto-Inoue et al., 2016) ศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และถ่ายภาพเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและบริเวณที่มีการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์

3.3.2 การศึกษาจากการวิเคราะห์ด้วย Atomic Absorption Spectrometer

การศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อของกบนาด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS) (Perkin Elmer, USA) ใช้วิธีของ Sellami และคณะ (Sellami et al., 2017) ในการศึกษาที่ใช้กบนาโตเต็มวัยอายุ 6 เดือน เพศเมีย โดยได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กทางปาก ในปริมาณ 1,000 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวของกบ 1 กิโลกรัม ทุก ๆ 5 วัน เป็นเวลา 30 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการแยกเก็บอวัยวะภายในของกบนา (กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ ไต และไข) จากนั้นนำเนื้อเยื่อของกบมาย่อยด้วยกรดไนตริกเข้มข้น (0.5 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร) โดยใช้ความร้อนช่วยย่อยเนื้อเยื่อ (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) จนเนื้อเยื่อละลายหมด ทำการปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน กรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ด้วยเครื่อง AAS โดยใช้สารละลายซิลเวอร์ในเตรทเป็นสารมาตรฐาน

3.4 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ในการศึกษานี้ นำเอ็มบริโอของกบนาที่แช่ในน้ำที่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเอ็มบริโอของกบนาชุดควบคุมที่ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้สาร Trizol ตามวิธีของบริษัทผู้จำหน่าย (Invitrogen, USA) โดยใช้สาร Trizol 500 ไมโครลิตร ต่อ 3 เอ็มบริโอ (น้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัม) บดตัวอย่างให้ละเอียด แล้วเติม Trizol ให้ครบ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวใสส่วนบน แล้วเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวใสส่วนบน แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอ แล้วล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้ง ผึ่งให้

แอลกอฮอล์ที่เหลื้ระเหย ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำปราศจาก RNase วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) และหาค่าสัดส่วนของ A260/A280 ทำการตรวจสอบอาร์เอ็นเอที่สกัดโดยการแยกขนาด ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% เจลอะกาโรส (1% Agarose gel)

3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real time RT-PCR)

ศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนบางชนิด โดยใช้ เอ็มบริโอระยะบลาสตูลาแช่ในน้ำที่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ รูปร่าง สามเหลี่ยมขนาดใหญ่) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เอ็มบริโอที่ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ใช้เป็นชุดควบคุม) การศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน ใช้วิธี Real time RT-PCR ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน ได้เลือกใช้ยีนที่ เกี่ยวกับการพัฒนาการของกบนา 2 ยีน ยีนที่เกี่ยวกับการตอบสนองต่อภาวะเครียดเมื่อสัมผัสกับสารพิษ 3 ยีน และยีนควบคุมอีก 1 ยีน ดังตารางที่ 3.1

ในการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ ใช้ปฏิกิริยา Reverse transcription (RT) ที่มีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร โดยนำอาร์เอ็นเอ 2 ไมโครกรัม ผสมกับ oligo dT (10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ dNTP (10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปต้มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ใน น้ำแข็งทันที จากนั้นเติม 5X First stand buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร DTT (0.1 โมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Superscript reverse transcriptase (Thermo Scientific, USA) (200 unit/ ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปต้มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที นำไปหยุด ปฏิกิริยาที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ ยีน และหน้าที่ของยีน

ที่	ยีน	ลำดับไพรเมอร์	คำอธิบาย	Accession No.
1	<i>cyp19-F</i>	5-GTCCTTCTTCCTGGATTCC-3	เกี่ยวกับภาวะเครียดออกซิเดชัน	FJ644565
	<i>cyp19-R</i>	5-GAGGATCTGGTCAGCTTGG-3		
2	<i>sox9-F</i>	5-CCAGCACAAGAAGGATCAC-3	พัฒนาการกระดูกสันหลังในช่วงที่เป็นตัวอ่อน	AB035887
	<i>sox9-R</i>	5-GCGGAGTTGGTGGACCTTG-3		
3	<i>fgf8-F</i>	5-CATGGCAGAAGACGGCGAC-3	สร้างไฟโบรพลาสต์โปรตีน ในระยะที่กำลังสร้างกระดูกสันหลัง	NM_001090435
	<i>fgf8-R</i>	5-CCTTCGTAATTGACATTCTG-3		
4	<i>p53-F</i>	5-GATCGTCGCACAGAGGAAG-3	ตอบสนองต่อภาวะเครียด	M36962
	<i>p53-R</i>	5-CAAGTGCATTCAGTTTC-3		
5	<i>MT-F</i>	5-GTGCAGCTGCTGTAAGT-3	ตอบสนองต่อความเครียด ในการกำจัดโลหะ	M96729
	<i>MT-R</i>	5-CTGGAATCTCCAAGACAAC-3		
6	<i>actin-F</i>	5-CTGCCTCCTCCTCATCCCTG-3	ยีนควบคุม	JQ511828
	<i>actin-R</i>	5-CGTCGCACTTCATGATTGAG-3		

จากนั้นใช้ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้สาร ฟลูออเรสเซนต์ SYBR Green เป็นตัวติดตามปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ ในปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร SYBR® green RT-PCR master mix (TOYOBO, Japan) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Forward (10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Reverse (10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่อง PCR (Roche รุ่น 480 light cyber, BIO-RAD, USA) โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR คือ ขั้นตอน Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอน Denaturation-annealing-extension จำนวน 40 รอบ โดยแต่ละ

รอบประกอบด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที วัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา และคำนวณค่า หลอมเหลวของผลผลิตพีซีอาร์ หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยโปรแกรม CFX Manager™ Version 3 (BIO-RAD, USA) การแสดงออกของยีนจะรายงานเป็นจำนวนเท่าของความสัมพันธ์ (Relative normalized expression; $\Delta\Delta Cq$) ระหว่างยีนที่ศึกษาและยีนควบคุม Beta Actin (San-Segundo et al., 2016)

$$\Delta Cq = Cq (\text{Target gene}) - Cq (\text{reference gene})$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{treated sample}) - \Delta Cq (\text{untreated sample})$$

3.6 การออกซิเดชันของลิพิด (lipid peroxidation)

ในการศึกษาการออกซิเดชันของลิพิด ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) การเกิดการออกซิเดชันของลิพิด จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ Malondialdehyde ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสาร Thiobarbituric acid ในสถานะที่เป็นกรดจะให้สารประกอบสีชมพู ซึ่งสามารถวัดได้โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าดูดกลืนแสง 535 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ออกซิเดชันของลิพิดด้วยวิธี TBARS ทำโดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างเอ็มบริโอของกบนา (หลังจากแช่ในน้ำที่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่) ที่ความเข้มข้น 1 10 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) โดยมีเอ็มบริโอที่ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำตัวอย่างมา 0.1 กรัม ผสมกับ Butylhydroxytoluene ปริมาตร 15 ไมโครลิตร แล้วบดให้ละเอียด ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 \times g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 200 ไมโครลิตรของสารละลาย TCA-TBA-HCl (15% Trichloroacetic acid, 0.375% Thiobarbituric acid และ 0.25 N HCl) นำส่วนผสมไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 \times g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร หลังจากนั้นคำนวณหาค่าออกซิเดชันของลิพิดจากสาร Malondialdehyde ที่เกิดขึ้น

โดยแสดงค่าเป็น MDA/mg protein โดยสารมาตรฐานที่ใช้คือ Tetraethoxypropane (Zeb and Ullah, 2016)

3.7 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค Synchrotron-based Fourier Transform Infrared (FTIR) micro-spectroscopy

ในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลในเอ็มบริโอและอวัยวะของกบ (หลังจากแช่กับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) และการให้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กทางปากของกบโตเต็มวัย ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 30 วัน ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ทำโดยการนำเอ็มบริโอที่เก็บรักษาในบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน มาแช่ใน Optimal cutting temperature compound (OCT; Bio-Optica, Italy) ทำให้เย็นอย่างเฉียบพลันในไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 12 ชั่วโมง แล้วตัดตัวอย่างด้วยเครื่องตัด Microtome (CR-X Cryosectioning system, USA) ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ให้มีความหนา 7 ไมโครเมตร วางแผ่นตัวอย่างที่ตัดบนแคลเซียมฟลูออไรด์วินโดว (Calcium Fluoride Window; 13 มิลลิเมตร \times 2 มิลลิเมตร) นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย Synchrotron-based FTIR micro-spectroscopy ณ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอนแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ประเทศไทย โดยใช้เครื่อง Bruker Vertex 70 FTIR spectrometer เชื่อมกับ Bruker Hyperion 2000 FTIR microscope (Bruker, Germany) และมีตัวตรวจวัดชนิด Liquid nitrogen cooled mercury cadmium telluride (MCT) ซึ่งพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คือ ขนาดของ aperture ที่ใช้ 10×10 ไมโครเมตร ด้วยอัตราเร็ว 64 scans และใช้ Spectral resolution ที่เลขคลื่นละ 4 ต่อเซนติเมตร อินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้จากการตรวจวัดถูกวิเคราะห์ด้วยการทำ Second derivative ด้วย 9 Smoothing points และ Third order polynomial หลังจากนั้นวิเคราะห์ด้วยการทำ Extended multiplicative scattering correction (EMSC) เพื่อใช้ในการ

ปรับฐานของกราฟสเปกตรัม แล้วทำการวิเคราะห์หลายตัวแปรด้วย Principal component analysis (PCA) โดยโปรแกรม Unscrambler® 10.1 (CAMO, Norway) ในตำแหน่งลายพิมพ์สเปกตรัม (1800–1000 ต่อเซนติเมตร และ 2800–2000 ต่อเซนติเมตร)

3.8 ศึกษาการกระจายตัวและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากผลิตภัณฑ์การค้ำในน้ำ (โดยใช้ผงซักฟอกเป็นโมเดลในการศึกษา)

การศึกษาการกระจายและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ผสมในผงซักฟอก นำผงซักฟอกที่มีส่วนผสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นส่วนประกอบมาทำการแยกส่วนประกอบในผงซักฟอก ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 ×g ตรวจสอบอนุภาคนาโนซิลเวอร์ด้วยการสแกนความยาวคลื่นด้วยเครื่อง UV – VIS spectrophotometer ในแต่ละชั้นที่แยกได้ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ด้วย ทำการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction, Bruker, Germany) โดยใช้ค่าการเลี้ยวเบนของของ Cu K α radiation ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$; 50 kV and 40 mA) และวัดที่มุม 2θ ระหว่าง 30 องศา และ 80 องศา

ในการศึกษาการกระจายตัวและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์โดยใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างทรงกลมขนาดเล็กผสมกับผงซักฟอกเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อการศึกษาการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ โดยใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ 1.56–25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อ 0.1 กรัม ของผงซักฟอก และเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาการติดตามการกระจายและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นเวลา 20 วัน

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษานี้ได้ทำการทดลองโดยมีจำนวนตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลองอย่างน้อย 30 ตัวอย่าง และแต่ละการทดลองมีการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS for windows version 11.5 ด้วยวิธี One-way ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าที่ $p < 0.05$ ในทุกการทดลอง หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อน ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test at $p < 0.05$

3.10 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดนครราชสีมา อ. เมือง จ. นครราชสีมา สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000



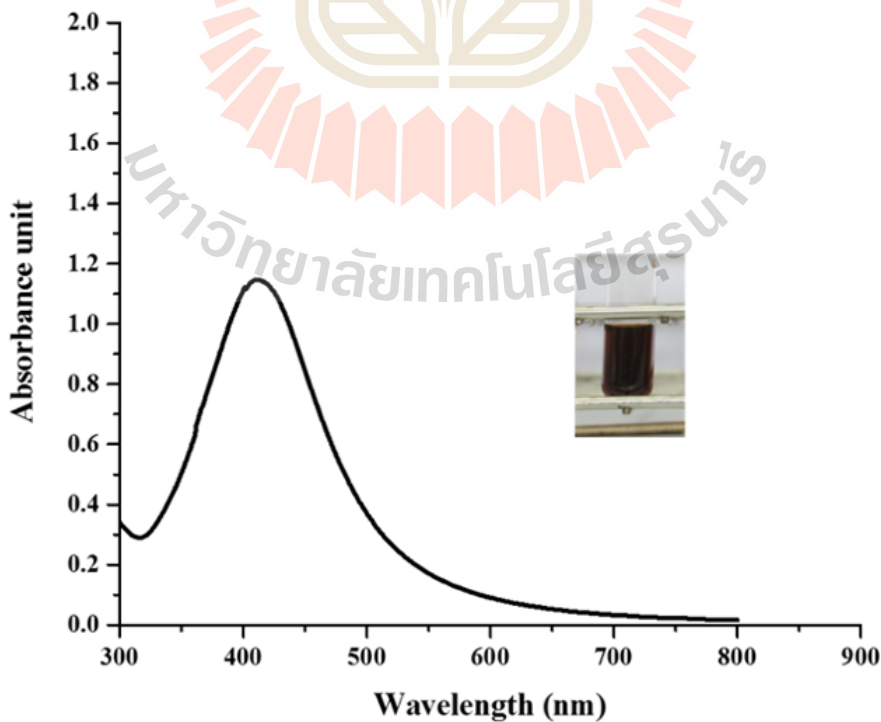
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน

4.1.1 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก

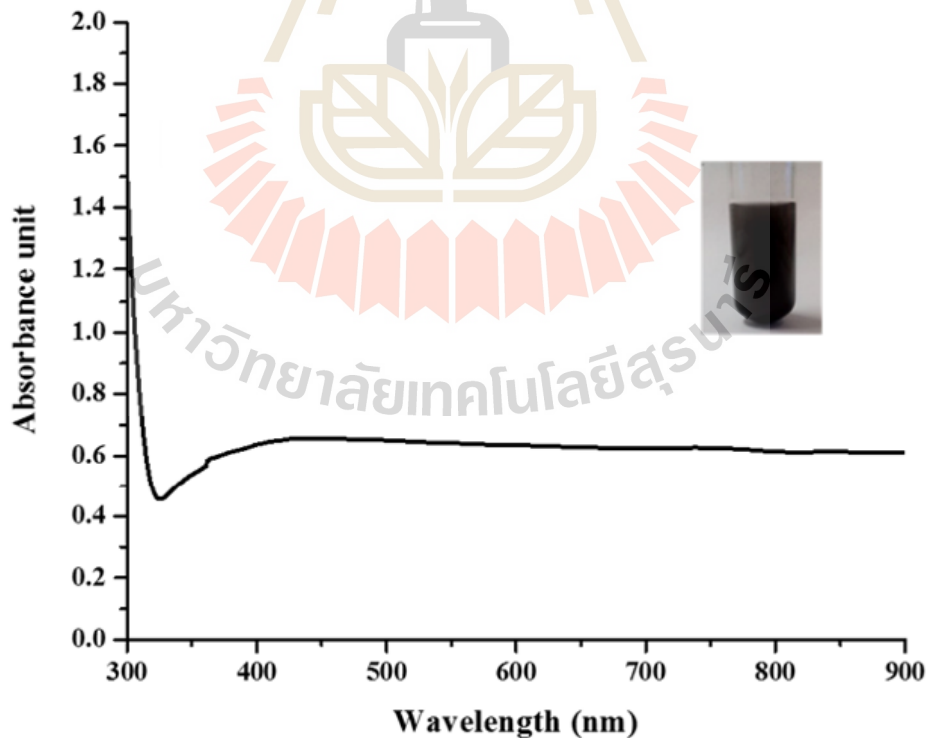
ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก ใช้กลูโคสเป็นตัวให้อิเล็กตรอน และใช้เจลาตินเป็นสารให้ความคงตัว เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป พบว่าสารละลายในปฏิกิริยาเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้เมื่อเกิดอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และเมื่อนำสารละลายของปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 300–900 นาโนเมตร พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 412 นาโนเมตร ดังภาพที่ 4.1 ซึ่งจากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดไม่เกิน 100 นาโนเมตร จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 390–450 นาโนเมตร (Alsammarraie et al., 2018)



ภาพที่ 4.1 สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก

4.1.2 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่

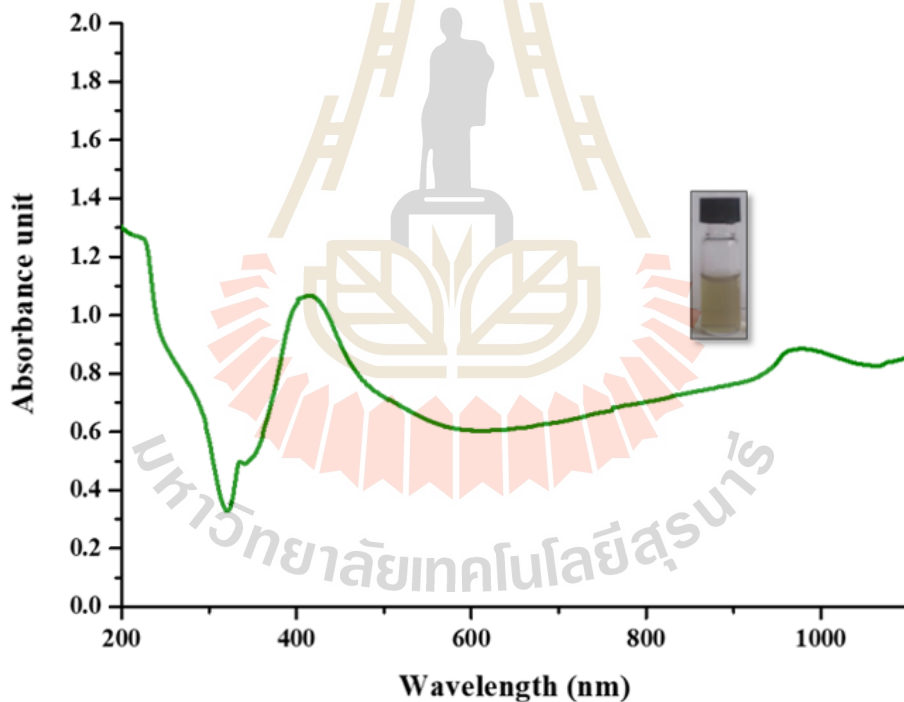
การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ ทำได้โดยใช้วิธีการที่คล้ายกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ขนาดเล็ก แต่มีการเปลี่ยนตัวให้อิเล็กตรอนจากสารละลายกลูโคส เป็นสารละลายน้ำตาลซูโครสเพื่อให้ได้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ผลการศึกษาพบว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเปลี่ยนจากสารละลายไม่มีสีเป็นตะกอนสีน้ำตาลเข้มเมื่อมีการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 300–900 นาโนเมตร พบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 465 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงพีคเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (Paramelle et al., 2014) แต่สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงมีความกว้างมาก ดังภาพที่ 4.2 ซึ่งเป็นรูปแบบของกราฟที่มีรายงานเมื่อสังเคราะห์ได้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดใหญ่และมีการกระจายของขนาดค่อนข้างกว้าง ซึ่งคาดว่าเกิดจากการเกาะกลุ่มของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น



ภาพที่ 4.2 สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่

4.1.3 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ด้วยวิธีการทางเคมีโดยใช้โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVP) และโพลีเอทีลีนไกลคอล (PEG) เป็นสารรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว โดยทำปฏิกิริยาที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ปฏิกิริยาเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายใส ไม่มีสี เป็นสีน้ำตาลแดง และเปลี่ยนเป็นสีเขียวขุ่นในตอนท้ายของปฏิกิริยา เมื่อตรวจสอบค่าดูดกลืนแสงพบว่า เกิดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 2 ช่วง คือ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และที่ 900 นาโนเมตร ดังภาพที่ 4.3 ซึ่งเป็นรูปแบบของสเปกตรัมที่มีรายงานเมื่อสังเคราะห์ได้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (Wijaya et al., 2017)



ภาพที่ 4.3 สเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมให้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ให้มีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกันมีหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสารให้อิเล็กตรอนและสารให้ความคงตัว อัตราส่วน

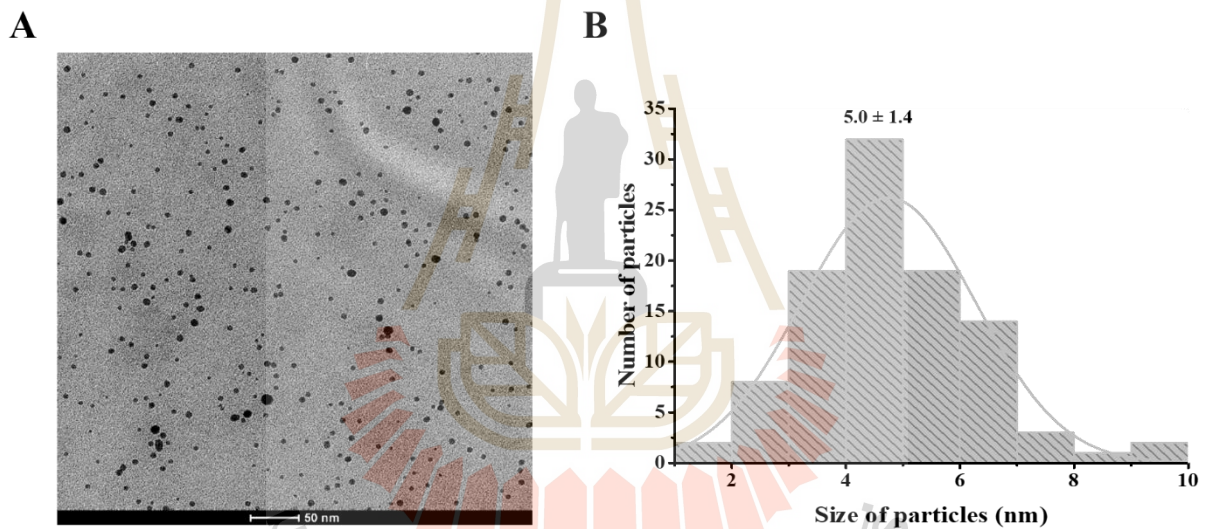
ระหว่างสารให้อิเล็กตรอนและสารให้ความคงตัว เพื่อของสารละลาย อุณหภูมิของปฏิกิริยา ระยะเวลาในการสังเคราะห์ (Qin et al., 2010) เป็นต้น โดย Agnihotri และทีมวิจัยจากศูนย์นาโนเทคโนโลยีและวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีบอมเบย์ ประเทศอินเดีย ประสบผลสำเร็จอย่างมากในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยอนุภาคดังกล่าวมีขนาด 5 7 10 15 20 30 50 63 85 และ 100 นาโนเมตร โดยผู้วิจัยได้ชี้ให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณของสารละลายซิลเวอร์ในตรต่อ Sodium borohydride (สารรีดิวซ์) และ Trisodium citrate (สารรีดิวซ์และให้ความคงตัว) มีผลต่อการผลิตอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ต่างกัน โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดเล็กจะปรากฏพีค SPR เป็นเอกลักษณ์ประมาณ 380–420 นาโนเมตร ขณะที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดใหญ่จะปรากฏพีคเอกลักษณ์ประมาณ 450–600 นาโนเมตร (Agnihotri et al., 2014) สำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างนอกเหนือจากทรงกลมนั้น Cobley และทีมวิจัยจากภาควิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ มหาวิทยาลัยวอชิงตัน สหรัฐอเมริกา ประสบผลสำเร็จในการผลิตอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างแบบพีระมิดด้านคู่ แบบแท่ง แบบบาร์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งรูปร่างสามเหลี่ยม ทั้งนี้ผู้วิจัยระบุว่า สัดส่วนของสารละลาย Ethylene glycol ต่อสารละลาย Glycoaldehyde ที่ใช้ทำหน้าที่เป็นทั้งตัวให้อิเล็กตรอนและสารให้ความคงตัว และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน มีผลต่อการเกิดรูปร่างของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ไม่เหมือนกัน (Cobley et al., 2009) จากการศึกษาการเกิดพีค SPR ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างแบบสามเหลี่ยมจากวารสารที่มีการตีพิมพ์ระดับนานาชาติ พบว่าลักษณะพีค SPR ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมแตกต่างจากอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างทรงกลม โดยจะปรากฏ 2 ตำแหน่งที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด ได้แก่ ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 300–400 นาโนเมตร ซึ่งแสดงเอกลักษณ์ของการดูดกลืนจากระนาบ 100 และการปรากฏช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 900–1,000 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการดูดกลืนแสงของระนาบ 111 ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างสามเหลี่ยม (Mansouri and Ghader, 2009)

4.2 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนซิลเวอร์

4.2.1 การศึกษารูปร่าง ขนาด และการกระจายขนาดของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้

การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ได้แก่ การศึกษาขนาด รูปร่าง และลักษณะการกระจายตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ โดยใช้ TEM

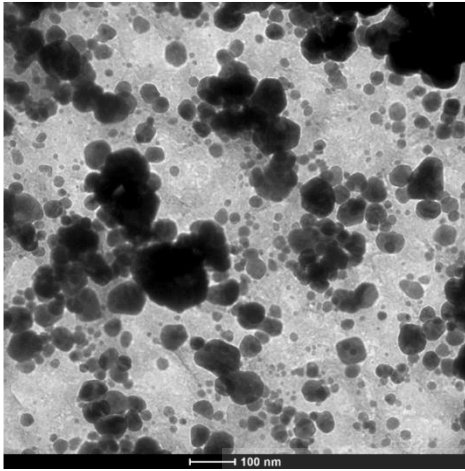
จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีที่ 1 เพื่อให้ได้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก ผลการศึกษาจากภาพถ่าย TEM พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก (ภาพที่ 4.4) จากการวัดขนาดของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จำนวน 300 อนุภาค พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5.0 ± 1.4 นาโนเมตร โดยมีการกระจายขนาดในช่วง 2–9 นาโนเมตร



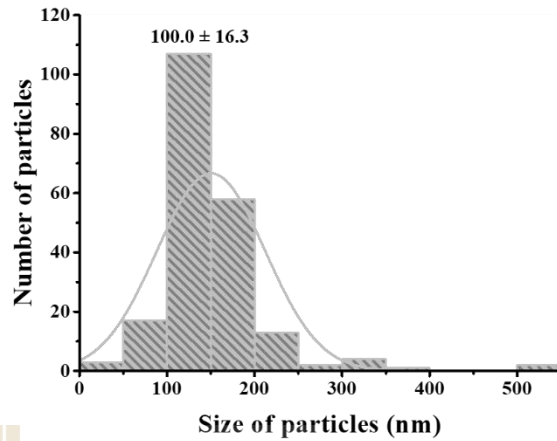
ภาพที่ 4.4 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กที่สังเคราะห์ได้ โดย A) ภาพ TEM และ B) ฮิสโตแกรมการกระจายขนาดของอนุภาค

จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีที่ 2 เพื่อให้ได้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ ผลการศึกษาจากภาพถ่าย TEM แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างกลม (ภาพที่ 4.5) ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 100.0 ± 16.3 นาโนเมตร โดยมีการกระจายขนาดในช่วง 83.7–116.3 นาโนเมตร

A



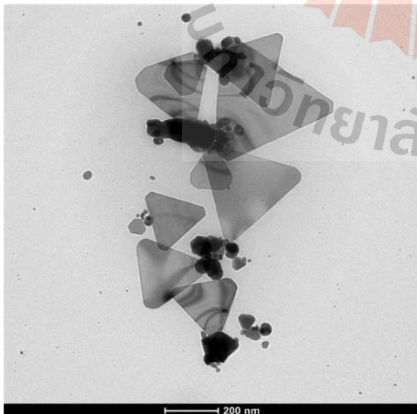
B



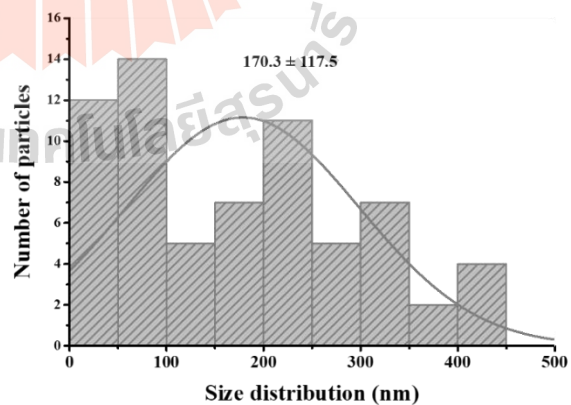
ภาพที่ 4.5 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ได้ โดย A) ภาพ TEM และ B) ฮิสโตแกรมการกระจายขนาดของอนุภาค

จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีที่ 3 เพื่อให้ได้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ผลการศึกษาจากภาพถ่าย TEM แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างสามเหลี่ยม (ภาพที่ 4.6) ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเฉลี่ย 170.3 ± 117.5 นาโนเมตร (เส้นตั้งฉากผ่านกลางสามเหลี่ยม) โดยมีการกระจายขนาดในช่วง 52.8–450.8 นาโนเมตร

A



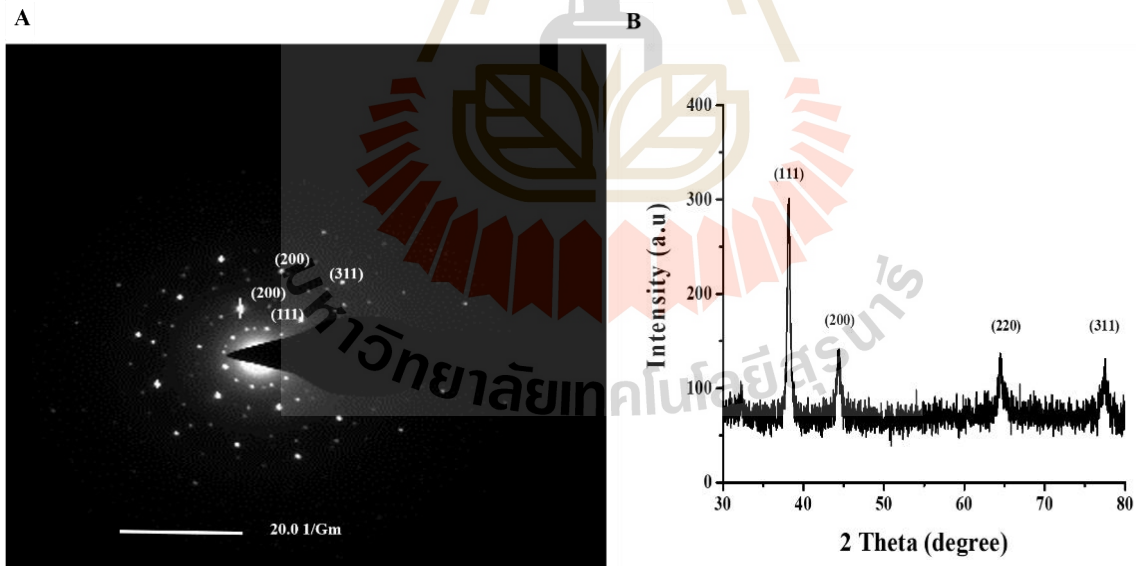
B



ภาพที่ 4.6 อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ได้ โดย A) ภาพ TEM และ B) ฮิสโตแกรมการกระจายขนาดของอนุภาค

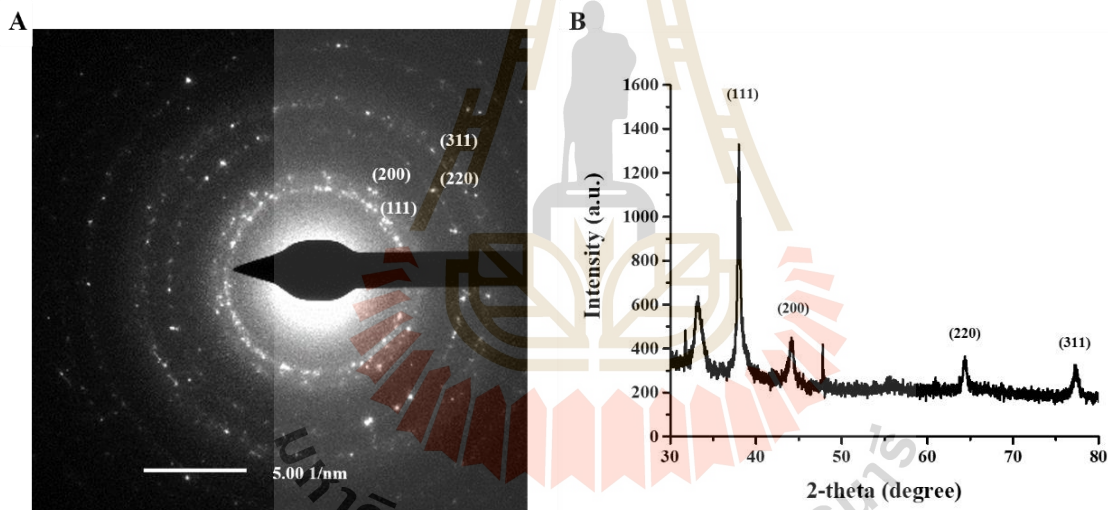
4.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ว่าเป็นอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ได้วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Selected Area Electron Diffraction TEM (SAED-TEM) และเทคนิค X-ray Diffraction (XRD) ซึ่งผลการวิเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กดังภาพที่ 4.7 ผลวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SAED-TEM (ภาพที่ 4.7A) เมื่อคำนวณค่า d -spacing พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.37 2.05 1.44 และ 1.23 อังสตรอม ซึ่งสัมพันธ์กับค่าระนาบของผลึกในชั้น hkl คือ (111) (200) (220) และ (311) ตามลำดับ ของโครงสร้างแบบ Face centered cubic (FCC) อนุภาคนาโนซิลเวอร์ เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐาน JCPDS Silver File No. 04-0783 (Sowmya and Lakshmi, 2018) สำหรับผลการวิเคราะห์ XRD (ภาพที่ 4.7B) ปรากฏพีคเอกลักษณ์มุม 2θ เท่ากับ 38.11° 44.30° 64.44° และ 77.39° ซึ่งบ่งบอกถึงระนาบ (111) (200) (220) และ (311) ตามลำดับ สอดคล้องกับของโครงสร้างแลตทิซ (lattice) แบบ FCC ของโลหะซิลเวอร์ (Anandalakshmi et al., 2016)



ภาพที่ 4.7 การวิเคราะห์อนุภาคนาโนรูปร่างกลมขนาดเล็กที่สังเคราะห์ได้ โดย A) ภาพจากการวิเคราะห์ด้วย SAED-TEM และ B) ภาพจากการวิเคราะห์ด้วย XRD

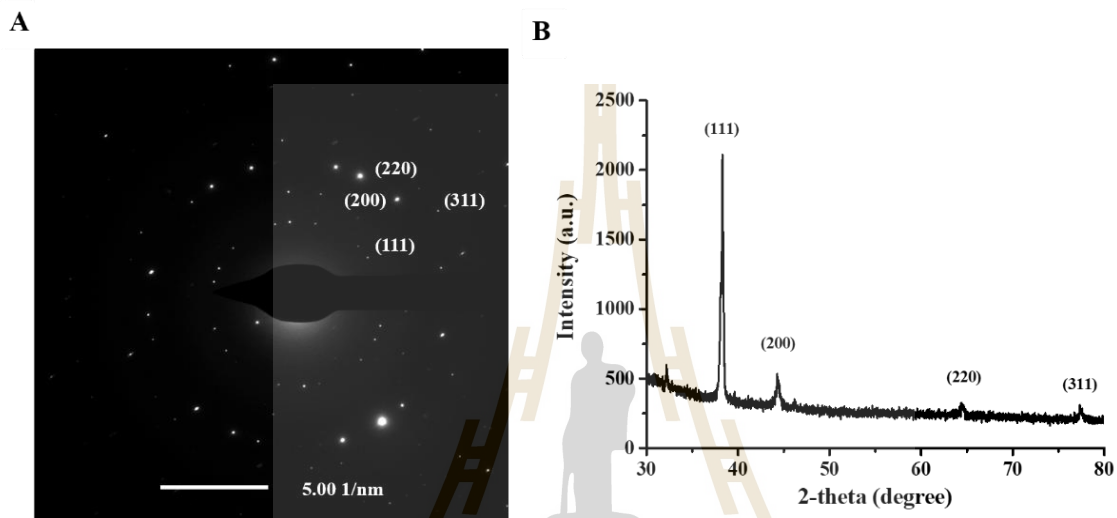
ผลการวิเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ดังภาพที่ 4.8 ผลวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SAED-TEM (ภาพที่ 4.8A) ได้คำนวณค่า d -spacing ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.37 2.05 1.43 และ 1.25 อังสตรอม ซึ่งสัมพันธ์กับค่าระนาบของผลึกในชั้น hkl คือ (111) (200) (220) และ (311) ตามลำดับ ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน JCPDS Silver File No. 04-0783 (Sowmyya and Lakshmi, 2018) สำหรับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค XRD (ภาพที่ 4.8B) ปรากฏพิกัดเอกลักษณ์มุม 2θ เท่ากับ 38.11° 44.30° 64.44° และ 77.39° ซึ่งบ่งบอกถึงระนาบ (111) (200) (220) และ (311) ตามลำดับ สอดคล้องกับของโครงสร้างแลตทิซแบบ FCC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (Anandalakshmi et al., 2016)



ภาพที่ 4.8 การวิเคราะห์อนุภาคนาโนรูปร่างกลมขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ได้ โดย A) ภาพจากการวิเคราะห์ด้วย SAED-TEM และ B) ภาพจากการวิเคราะห์ด้วย XRD

ผลการวิเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ดังภาพที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SAED-TEM (ภาพที่ 4.9A) ได้คำนวณค่า d -spacing ซึ่งเท่ากับ 2.37 2.02 1.48 1.23 อังสตรอม ซึ่งสัมพันธ์กับค่าระนาบของผลึกในชั้น hkl คือ (111) (200) (220) และ (311) ตามลำดับ ของ

อนุภาคนาโนซิลเวอร์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน JCPDS Silver File No. 04-0783 (Sowmya and Lakshmi, 2018) นอกจากนั้นผลของ XRD ปรากฏพีคเอกลักษณ์มุม 2θ เท่ากับ 38.11° 44.30° 64.44° และ 77.39° ซึ่งบ่งบอกถึงระนาบ (111) (200) (220) และ (311) ตามลำดับ สอดคล้องกับของโครงสร้างแลตทิซแบบ FCC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (Anandalakshmi et al., 2016)



ภาพที่ 4.9 การวิเคราะห์อนุภาคนาโนรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ได้ โดย A) ภาพจากการวิเคราะห์ด้วย SAED-TEM และ B) ภาพจากการวิเคราะห์ด้วย XRD

4.3 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

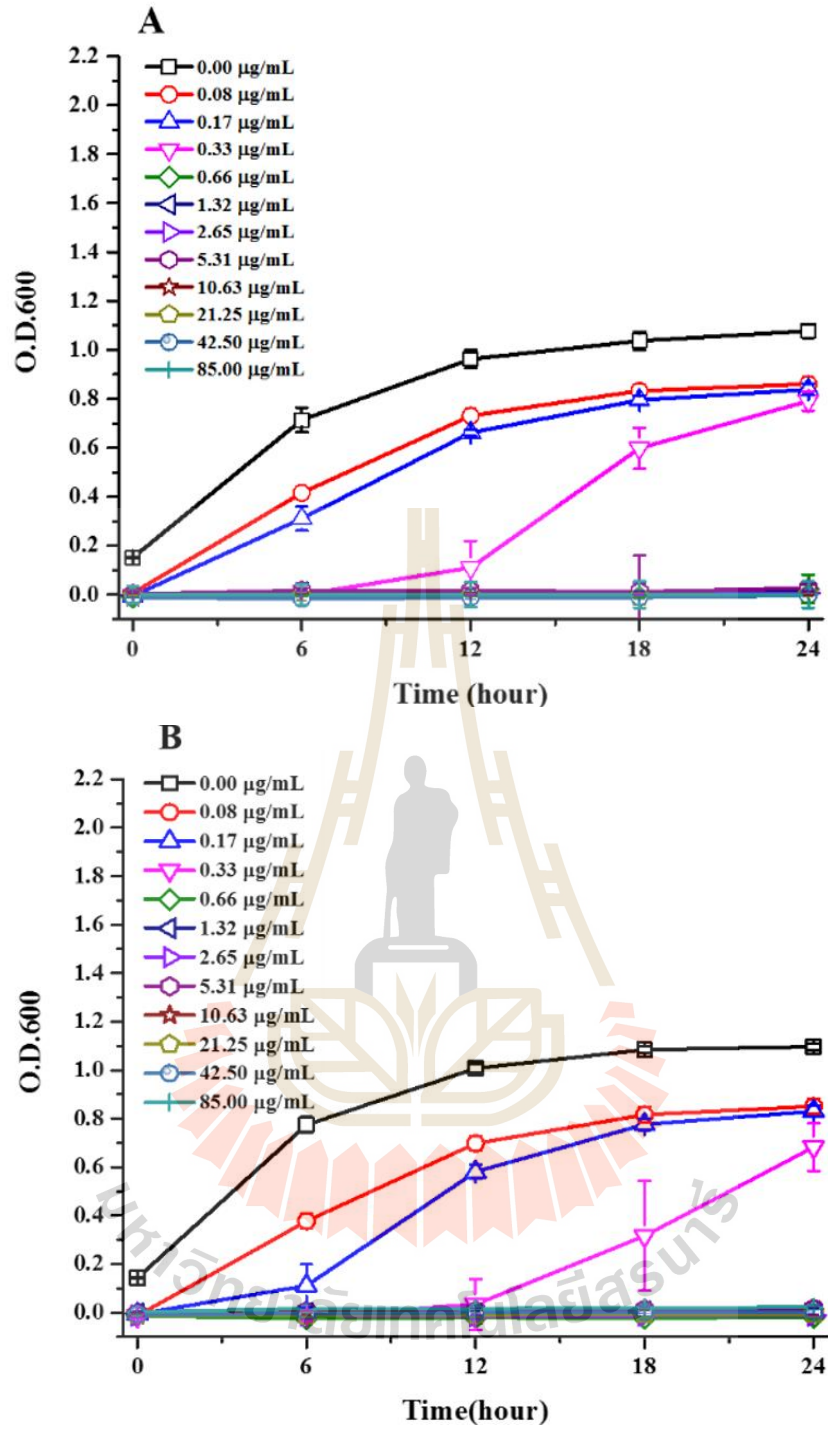
ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างและความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ระยะเวลาในการบ่ม และชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* และ *E. coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ใช้ในการทดสอบคือ อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) และอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) โดยบ่มแบคทีเรียกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 0.08 0.17 0.33 0.66 1.32

2.65 5.31 10.63 21.25 42.50 และ 85.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ดังภาพที่ 4.10 โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กมีค่า MIC ต่อ *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากันที่ 0.66 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (วิเคราะห์จากค่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ได้ OD₆₀₀ เป็น 0) และมีค่า MBC ต่อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับ 5.31 และ 1.32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

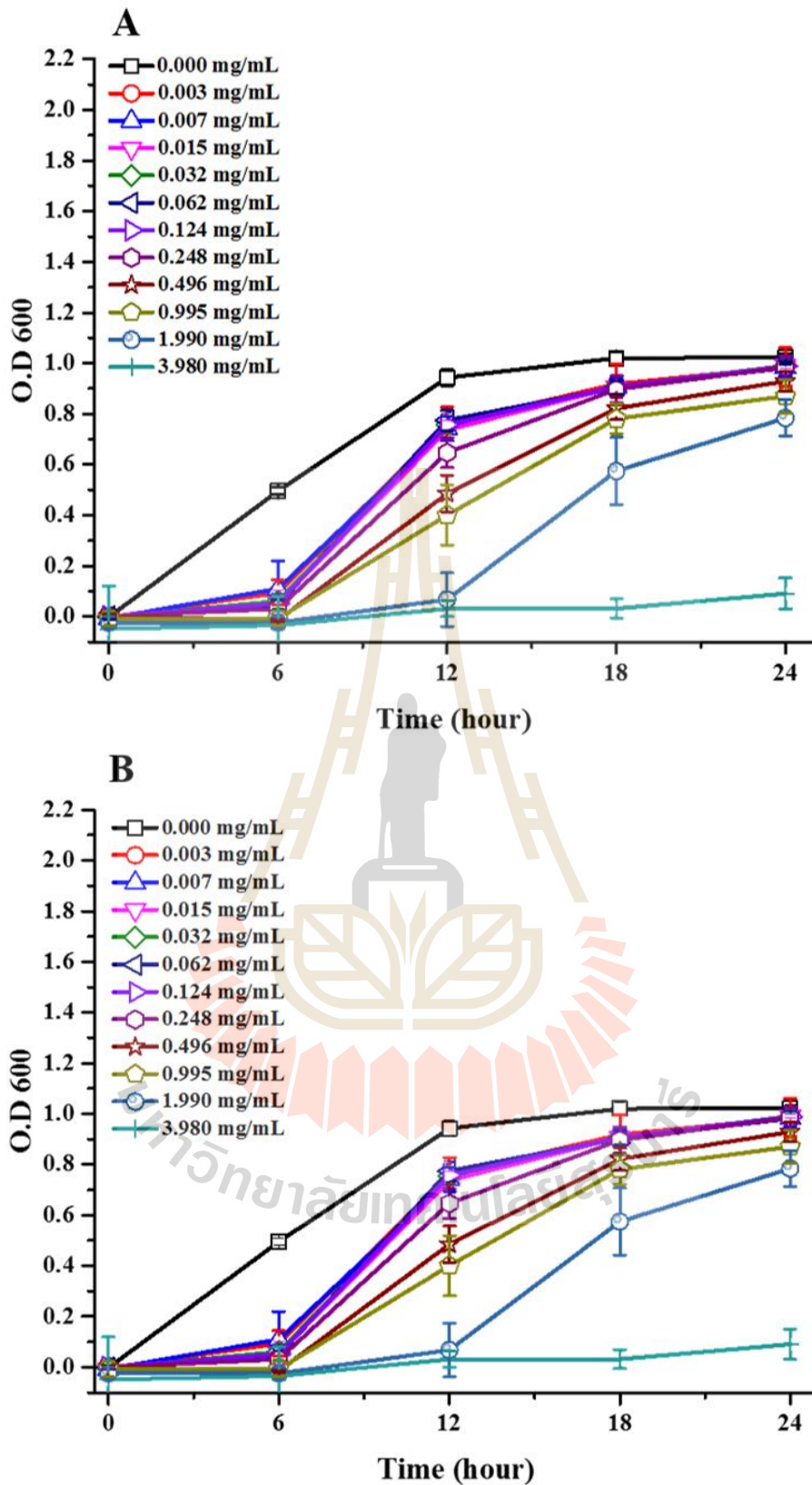
ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ดังภาพที่ 4.11 ผลการทดลองพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่มีค่า MIC ต่อ *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากันที่ 3.98 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ไม่สามารถหาค่า MBC ได้ เนื่องจากอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมได้มีค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 3.98 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

หากเปรียบเทียบอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมทั้งสองขนาด พบว่าอนุภาคขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า เนื่องจากมีค่า MIC ในระดับนาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่อนุภาคขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) ต้องใช้ค่าความเข้มข้นในระดับ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้งนี้คาดว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในขนาด 5 นาโนเมตร สามารถผ่านผนังเซลล์และเยื่อเซลล์ของแบคทีเรียได้ ทำให้เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์ได้สูง โดยสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างซิลเวอร์กับหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน เอนไซม์ และกรดนิวคลีอิก ส่งผลต่อการทำงานที่ผิดปกติของสารชีวโมเลกุลดังกล่าว อีกทั้งอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เข้าสู่ภายในเซลล์ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์แบคทีเรียได้ ซึ่งมีผลต่อการตอบสนองที่คล้ายอะพอพโทซิส (Apoptosis-like response) การเกิดออกซิเดชันของลิพิด (Lipid peroxidation) และเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ (Mohanbaba and Gurunathan, 2016)



ภาพที่ 4.10 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย A) *S.*

aureus และ B) *E. coli*



ภาพที่ 4.11 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย A) *S.*

aureus และ B) *E. coli*

นอกจากนี้หากพิจารณาจากค่า MBC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ขนาดเล็ก พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* มีความไวต่ออนุภาคนาโนซิลเวอร์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ซึ่งคาดว่าเป็นผลเนื่องมาจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบมีองค์ประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์ที่แตกต่างกันอย่างมาก แบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของเพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ N-acetyl glucosamine สลับกันกับ N-acetyl muramic acid) ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Qing et al., 2018)

4.4 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการตายของเอ็มบริโอของกบ

ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กและขนาดใหญ่ (5 และ 100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยม (170 นาโนเมตร) ต่อการตายของเอ็มบริโอของกบนา โดยใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ 1 10 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร และติดตามอัตราการตายของเอ็มบริโอทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเอ็มบริโอเจริญจนถึงระยะลูกอ๊อด

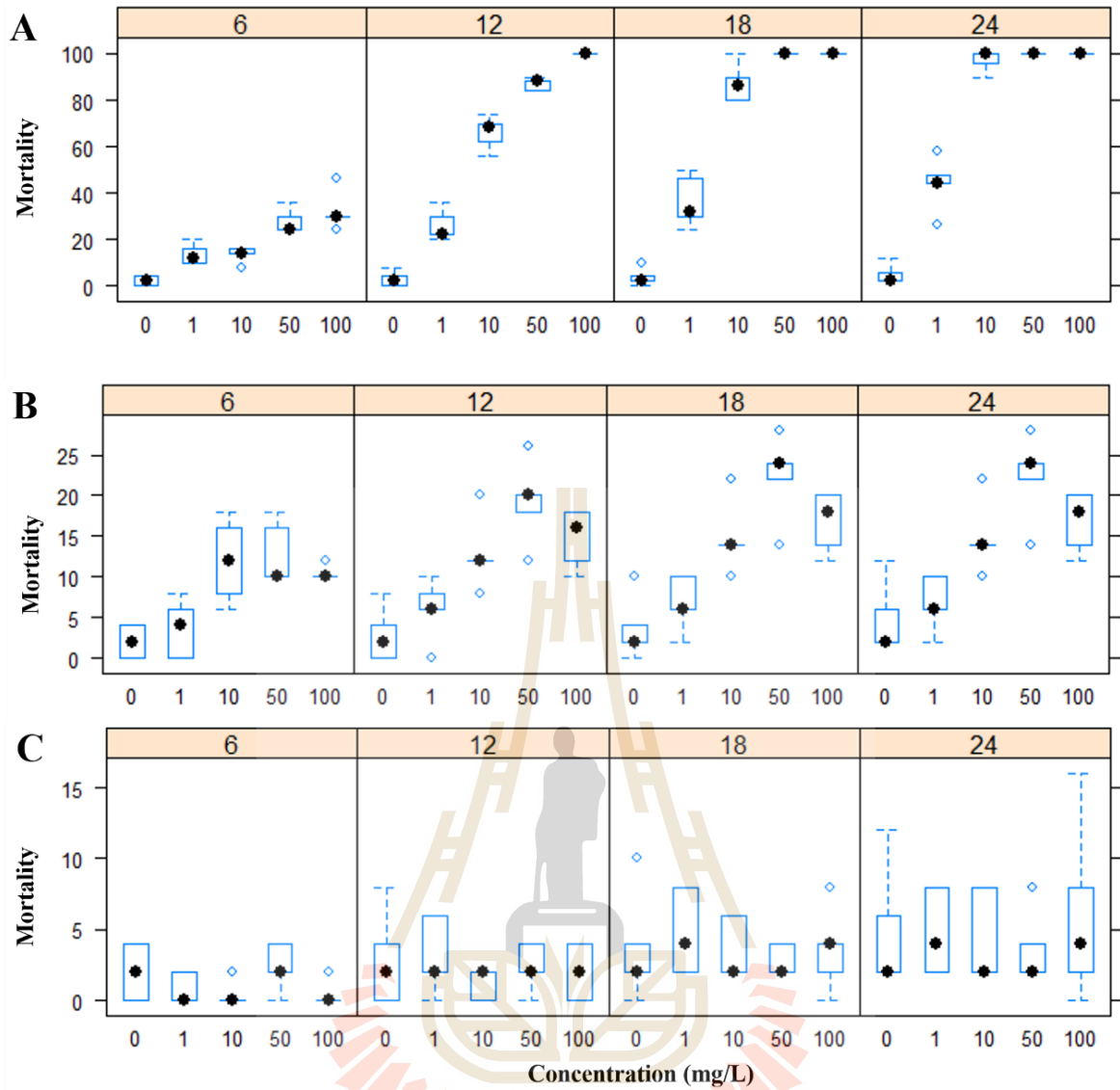
ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กต่อการตายของเอ็มบริโอของกบนา ดังภาพที่ 4.12A โดยพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กทำให้เอ็มบริโอมีการตายมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ โดยมีร้อยละการตาย (% Mortality) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และระยะเวลา โดยที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลให้เอ็มบริโอตาย 100% ที่ระยะ 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลให้เอ็มบริโอตาย 100% ที่ระยะ 18 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลให้เอ็มบริโอตาย 100% ที่ระยะ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ข้อมูลข้างต้นพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) ในความเข้มข้นต่ำ (1 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร) ยังได้รับในระยะเวลาที่นานขึ้น ยิ่งส่งผลต่อร้อยละการตายมากขึ้น

ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) ต่อการตายของเอ็มบริโอของกบนา ดังภาพที่ 4.12B พบว่ามีผลให้อัตราการตายทำให้เอ็มบริโอมีการตายเป็นอันดับสองเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก แต่พบอัตราการตายมากกว่ารูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร)

โดยมีร้อยละการตายค่อนข้างเป็นไปตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ขนาดเล็ก ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ร้อยละการตายของเอ็มบริโอพบเพียง 16.8 ± 3.6 ในขณะที่ร้อยละการตายที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตรพบที่ 22.4 ± 5.2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ต่อการตายของเอ็มบริโอภavn แสดงในภาพที่ 4.12C พบว่ามีผลให้อัตราการตายทำให้เอ็มบริโอมีการตายน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) และขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) แนวโน้มการตายไม่แตกต่างกันทั้งในเรื่องความเข้มข้นและระยะเวลา โดยมีร้อยละการตายที่ความเข้มข้น 0 1 10 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบการตายร้อยละ 4.8 ± 4.4 4.8 ± 3.0 4.4 ± 3.2 3.6 ± 2.6 และ 6.0 ± 6.3 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละระยะเวลา

จากการทดลองพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) มีผลต่อร้อยละการตายของเอ็มบริโอมากกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีขนาดเล็กมากพอที่จะข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์ด้วยช่องทาง Phagocytosis (Moore, 2006) อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เข้ามาภายในเซลล์แล้วอาจเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น เอ็นไซม์ โปรตีน ดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นไม่สามารถทำหน้าที่ได้ นอกจากนี้การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เข้ามาภายในเซลล์อาจจะไปรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ จากเหตุผลดังกล่าวอาจส่งผลให้ระบบเมแทบอลิซึมของเซลล์ และกระบวนการทำงานของเซลล์ที่ต้องอาศัยสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ หยุดชะงัก ทำให้เอ็มบริโอหยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด (Foldbjerg et al., 2011)



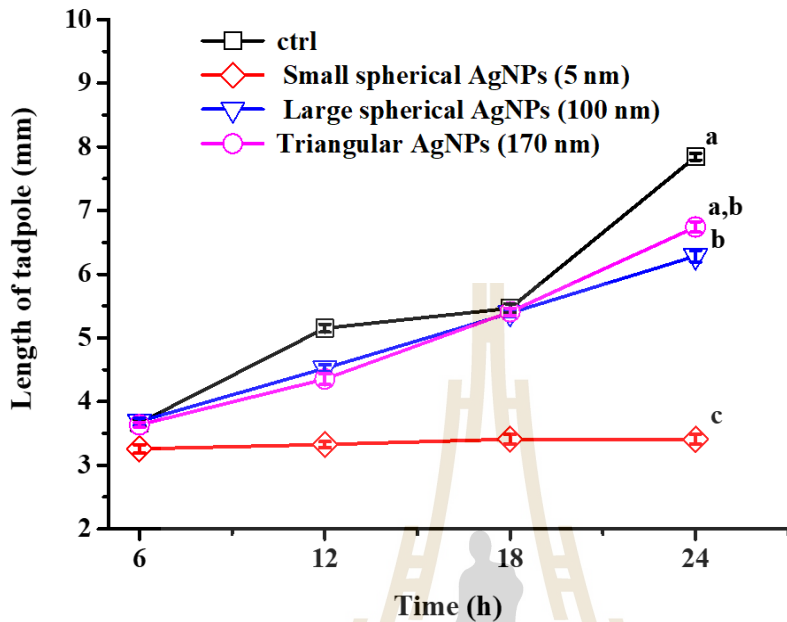
ภาพที่ 4.12 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการตายของเอ็มบริโอของปลา โดย A) อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) B) อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และ C) อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร)

4.5 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีต่อการเจริญของเอ็มบริโอกบนา

ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเจริญของเอ็มบริโอกบนาดังภาพที่ 4.13 โดยวิเคราะห์การเจริญของเอ็มบริโอจากความยาวส่วนหัวถึงปลายหาง ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร

ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กมีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอกบนามากที่สุด (ที่ 24 ชั่วโมง เอ็มบริโอมีความยาว 3.40 ± 0.08 มิลลิเมตร) โดยมีผลหยุดการเจริญของเอ็มบริโอตั้งแต่ 6-24 ชั่วโมง โดยความยาวของเอ็มบริโอมีค่าคงที่ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอในชุดควบคุม (ไม่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์) ทั้งนี้สันนิษฐานว่าการที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ขนาดเล็ก (<10 นาโนเมตร) สามารถข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปข้างในเซลล์ได้ ซึ่งในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ผ่านเข้ามาในเซลล์สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์และทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของแบคทีเรีย (Bao et al., 2015) คาดว่ากลไกนี้สามารถเกิดขึ้นกับเอ็มบริโอกบได้เช่นกัน เมื่อกลไกการแบ่งเซลล์ถูกยับยั้งเป็นผลให้อัตราการเจริญของเอ็มบริโอกบหยุดการเจริญได้ สำหรับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่และอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ มีผลยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอกบอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเช่นกัน หากพิจารณาจากการได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่มีผลยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอสูงกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมอย่างมีนัยสำคัญ (6.28 ± 0.09 และ 6.74 ± 0.08 มิลลิเมตร ตามลำดับ) ซึ่งคาดว่าเกิดจากอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่มีขนาดที่เล็กกว่า เมื่อเทียบกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยม จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่อยู่ในช่วง 40-140 นาโนเมตร บางส่วนจะสามารถเข้าไปในเซลล์ได้จากกระบวนการเอนโดไซโทซิส โดยที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เข้าไปข้างในจะไปรบกวนการทำงานของระบบเมแทบอลิซึมของเซลล์ ทั้งนี้มีบางส่วนเกิดการเกาะที่ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสีย

สภาพ พร้อมกันนี้อาจเกิดการชักนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากผลดังกล่าวส่งผลต่อความเป็นพิษในแง่ของการยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอของกบนาได้ (Morones et al., 2005)



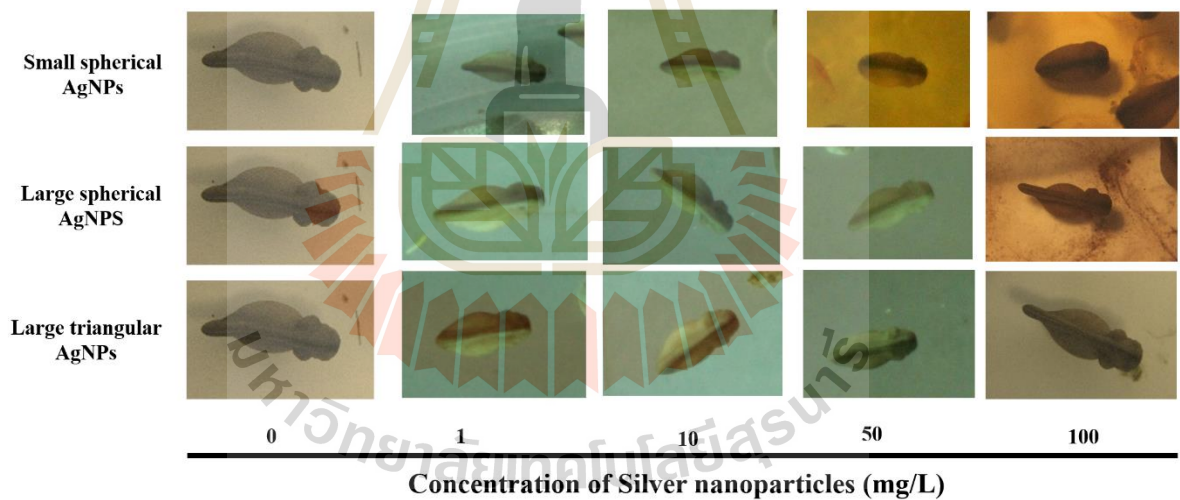
ภาพที่ 4.13 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ต่อการเจริญของเอ็มบริโอของกบนา

4.6 การศึกษาอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อพัฒนาการเอ็มบริโอของกบนา

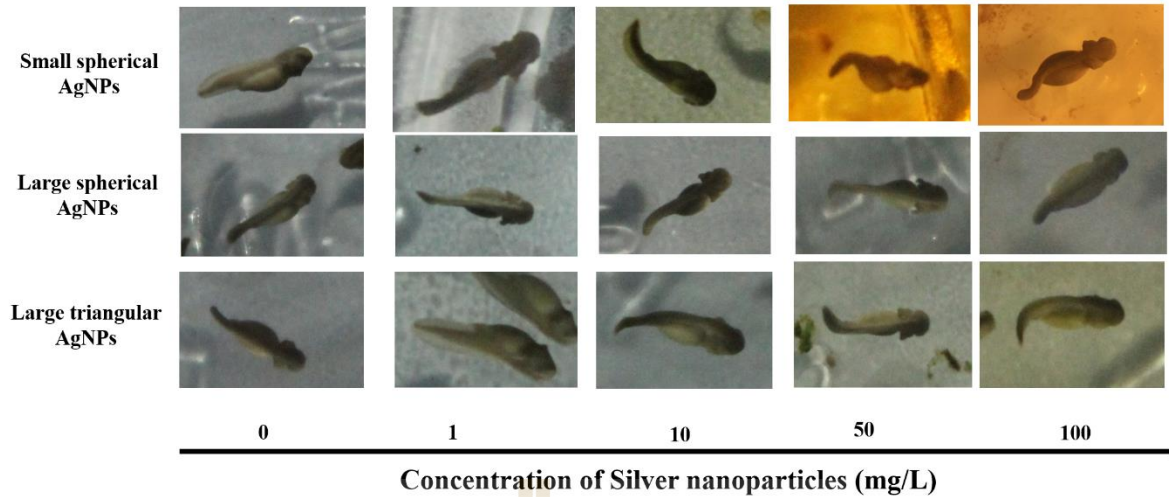
ผลการศึกษาอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ที่ความเข้มข้น 1 10 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ต่อพัฒนาการเอ็มบริโอของกบนา ดังภาพที่ 4.14–4.17 โดยพบว่าเอ็มบริโอของกบนาที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจนคือ ลักษณะของหางที่โค้งงอ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่อนุภาคนาโนรูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) สามารถผ่านเยื่อเซลล์ได้ง่าย และสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Sun et al., 2016) ด้วยเหตุนี้การ

เปลี่ยนแปลงในบริเวณหางของเอ็มบริโอ กบ คาดว่าอาจเกิดจากการที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์เข้าไปในเซลล์
รบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และมีผลต่อการสร้างกระดูกส่วนหางจึงพบลักษณะที่มีความผิดปกติ
ได้ นอกจากนี้พบว่าลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเอ็มบริโอสามารถสังเกตได้ชัดเจนมากเมื่อ
เอ็มบริโอได้รับอนุภาคนาโนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยที่ชั่วโมงที่ 24 พบว่าเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิล
เวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร มีการตาย 100%

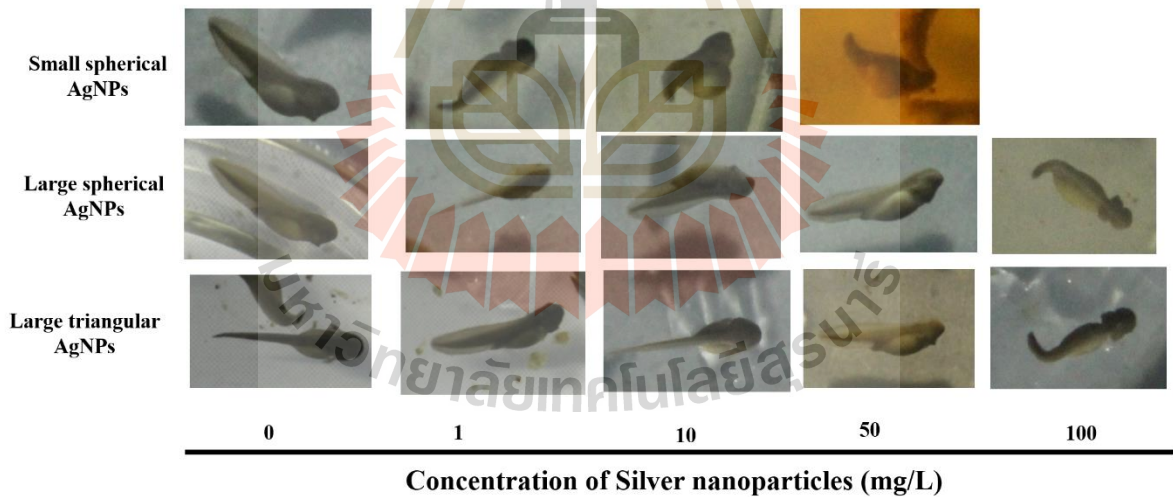
สำหรับเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ มี
ลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนเช่นกัน แต่ไม่มีผลให้เอ็มบริโอตาย โดยลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่พบคือ ช่วง
หางที่สั้นกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้พบว่าหากให้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีความเข้มข้นสูง (100 มิลลิกรัม/ลิตร)
พบว่ามีบางเอ็มบริโอที่มีลักษณะของหางที่โค้งงอและไม่สมบูรณ์



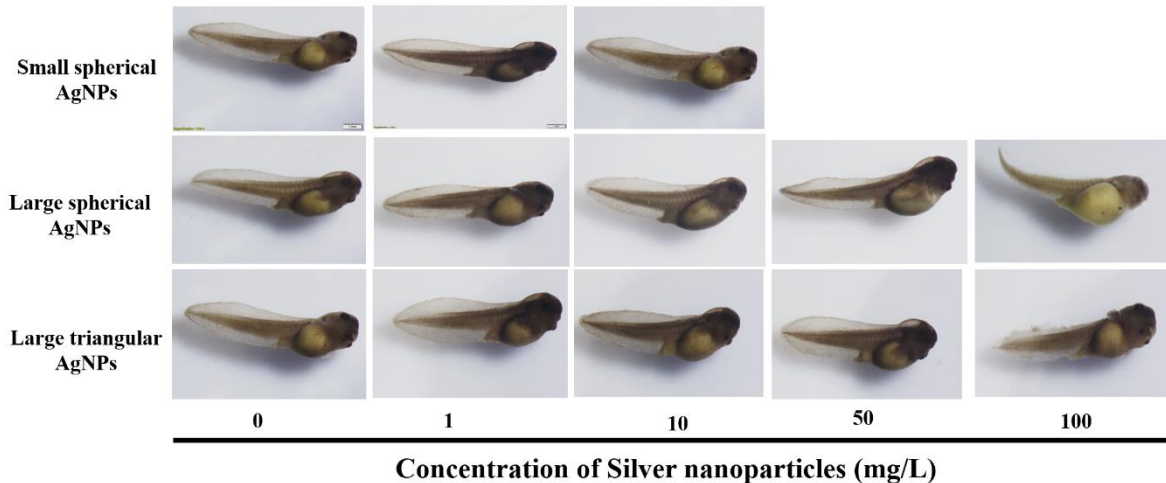
ภาพที่ 4.14 พัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอของกบนาเมื่อได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก
รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ที่มีความเข้มข้น 1 10 50 และ 100
มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.15 พัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอของปลาซันดาเมื่อได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ที่ความเข้มข้น 1 10 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.16 พัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอของปลาซันดาเมื่อได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ที่ความเข้มข้น 1 10 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 18 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.17 พัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอของกบนาเมื่อได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ที่ความเข้มข้น 1 10 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 24 ชั่วโมง

4.7 การสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของเอ็มบริโอของกบนา

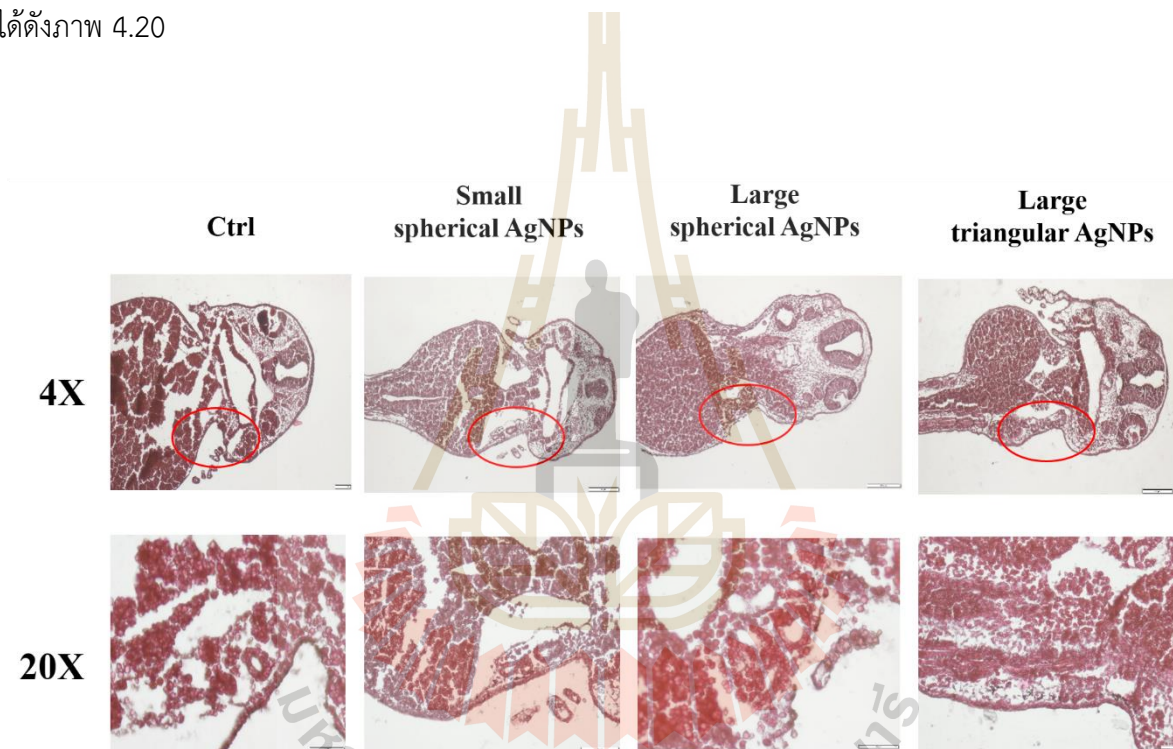
การศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของกบนาที่ 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.18–4.20 โดยนำเนื้อเยื่อเอ็มบริโอมาตัดตามความยาวและย้อมสีอีโอซิน ผลการศึกษาพบการสะสมของอนุภาคสีดำบริเวณเหงือกของเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ซึ่งคาดว่าเป็นการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในปริมาณสูงจนสังเกตเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้ไม่พบอนุภาคสีดำบริเวณเหงือกของกลุ่มควบคุม

ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ 10 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) มีปริมาณการสะสมน้อยมากจนไม่สามารถสังเกตเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังภาพ 4.18

ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่สามารถศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) ได้ เนื่องจากเอ็มบริโอตายทั้งหมด ทั้งนี้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลม

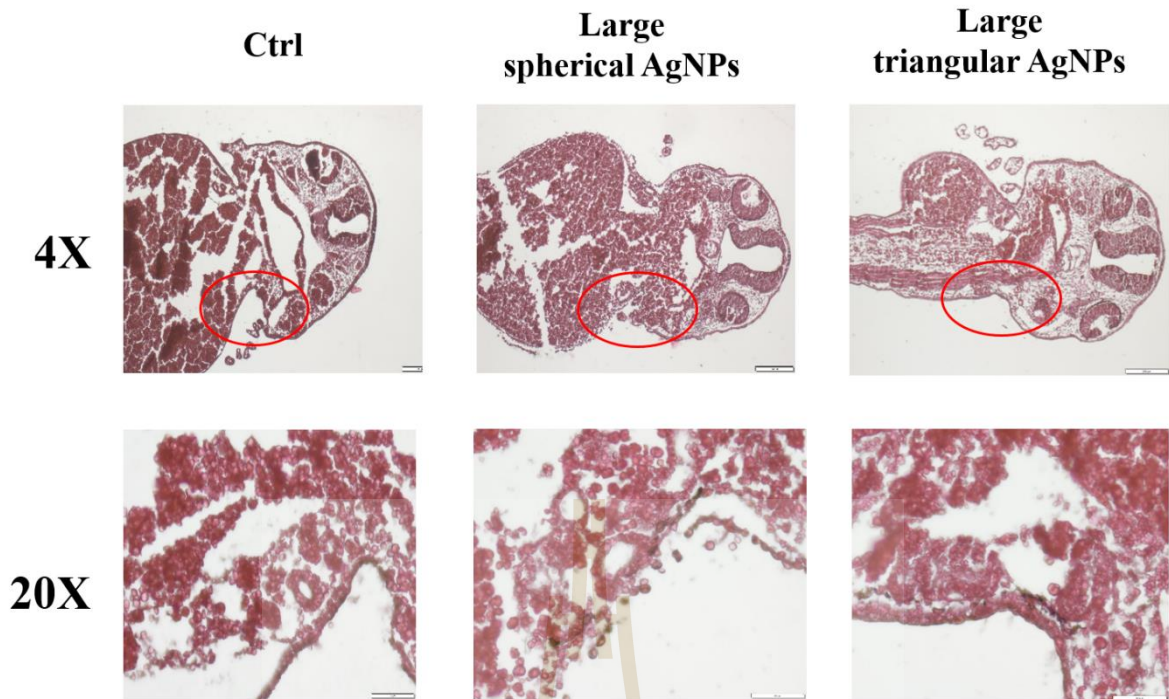
ขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) มีการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อจนสามารถสังเกตเห็นจุดสีดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ดังภาพ 4.19

ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่สามารถศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) ได้ เนื่องจากเอ็มบริโอได้ตายทั้งหมด ทั้งนี้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) มีการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกภายในลำตัวของเอ็มบริโอจนสามารถสังเกตเห็นจุดสีดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ดังภาพ 4.20

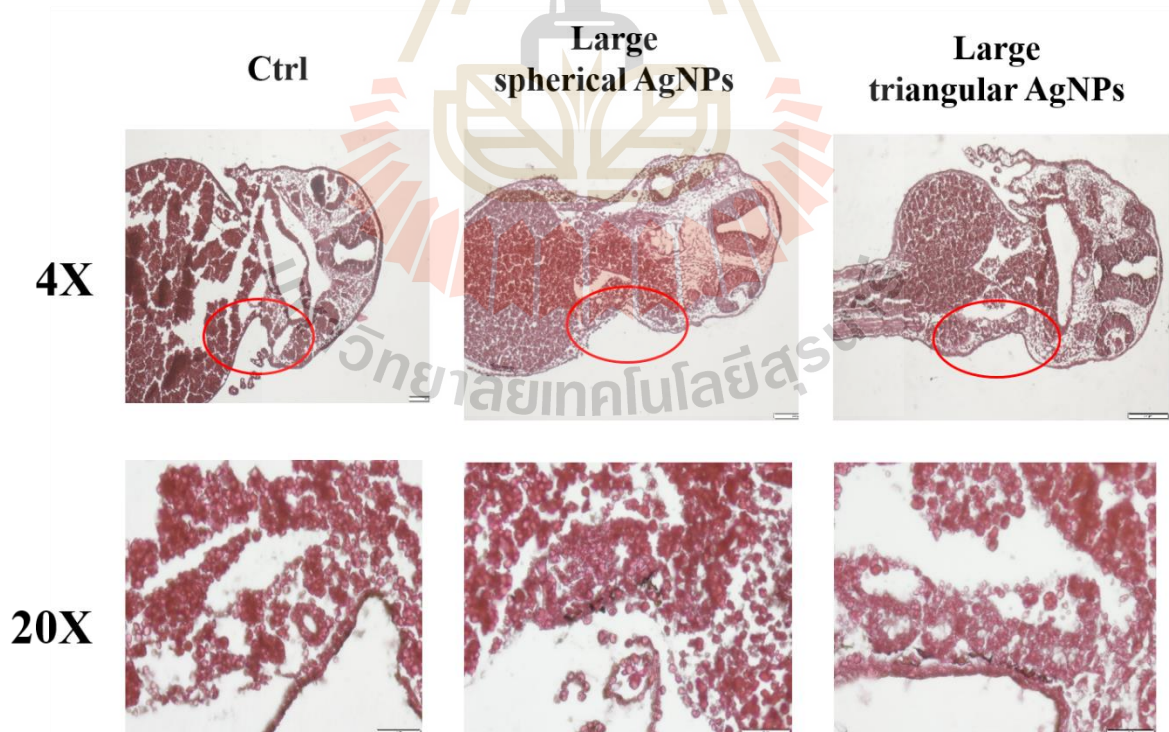


ภาพที่ 4.18 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ในการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอ

กบนา



ภาพที่ 4.19 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอ
กบนา



ภาพที่ 4.20 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อ
เอ็มบริโอ กบนา

4.8 การศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในอวัยวะของกบนาและไข่

การศึกษาการสะสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในอวัยวะของกบนาและไข่ ได้ทำการศึกษาเพื่อตอบคำถามว่า อวัยวะใดเป็นอวัยวะหลักที่มีการเก็บสะสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในปริมาณสูง และมีการสะสมไปยังไข่หรือไม่ เนื่องจากหากมีการสะสมในไข่ จะสะท้อนถึงผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีต่อการเจริญและพัฒนาการของ เอ็มบริโอในรุ่นต่อไป ในการทดลองนี้ได้ให้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กทางปากกับกบโตเต็มวัย อายุ 6 เดือน โดยให้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ทุก 5 วัน เป็นเวลา 30 วัน แล้วทำการแยกอวัยวะคือ ตับ กระจกเพาะอาหาร ลำไส้ และไต นอกจากนี้มีการเก็บไข่ในท่อนำไข่ (Oviduct) มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AAS และผลการศึกษาดังตารางที่ 4.1

ผลการศึกษาพบว่าอวัยวะที่ได้ในระบบทางเดินอาหารและขับถ่าย คือ ตับ กระจกเพาะอาหาร ลำไส้ และไต มีปริมาณการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่พบอวัยวะที่พบการสะสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์สูงสุดคือ กระจกเพาะอาหาร รองลงมา คือ ตับ ไต และลำไส้ ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 91.45 ± 0.37 10.30 ± 0.45 6.02 ± 0.24 และ 5.97 ± 0.32 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่าง ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่กบได้รับ สามารถถูกส่งไปยังตับและไตทางกระแสเลือด โดยตับเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำจัดสารพิษ โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่มีพิษน้อยลง และส่งออกนอกร่างกาย ในขณะที่ไตทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำจัดสารพิษที่มีขนาดเล็ก และสารพิษจากเมแทบอลิซึม (Lankveld et al., 2010)

สำหรับไข่กบในท่อนำไข่ พบว่ามีการสะสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในปริมาณสูงสุด คือ 195.55 ± 0.87 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่าง ซึ่งสูงกว่าปริมาณที่พบในกระจกเพาะอาหารถึง 2.1 เท่า ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากการที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ถูกส่งจากระบบย่อยอาหารไปยังอวัยวะสืบพันธุ์ผ่านทางกระแสโลหิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่มีสร้างไข่ ผลจากการศึกษานี้ทำให้คาดว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่กบได้รับสามารถสะสมในไข่และน่าจะมีผลต่อพัฒนาการของเอ็มบริโอ ซึ่งหากมีการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในปริมาณต่ำอาจมีผลต่อพัฒนาการเล็กน้อย แต่หากมีการสะสมในปริมาณมาก อาจจะทำให้ได้ลูกกบที่มีลักษณะผิดปกติ

หรือตาย ดังนั้นผลกระทบของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อกบนาจึงขึ้นอยู่กับปริมาณที่มีการสะสมภายในร่างกาย นอกจากนี้ผลจากการศึกษายังสะท้อนให้เห็นว่าการปนเปื้อนของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในแหล่งน้ำสามารถส่งผลกระทบต่อปริมาณของกบนาในธรรมชาติ ทำให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศและสายใยอาหารได้

ตารางที่ 4.1 การสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในอวัยวะและไข่ของกบนาจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AAS

อวัยวะที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของธาตุซิลเวอร์ที่ตรวจพบใน (ไมโครกรัม/กรัม)	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง (ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์)
ตับ	0.95 ± 0.13	10.30 ± 0.45*
กระเพาะอาหาร	1.87 ± 0.21	91.45 ± 0.37*
ลำไส้	0.61 ± 0.17	5.97 ± 0.32*
ไต	0.53 ± 0.11	6.02 ± 0.24*
ไข่	0.23 ± 0.11	195.55 ± 0.87*

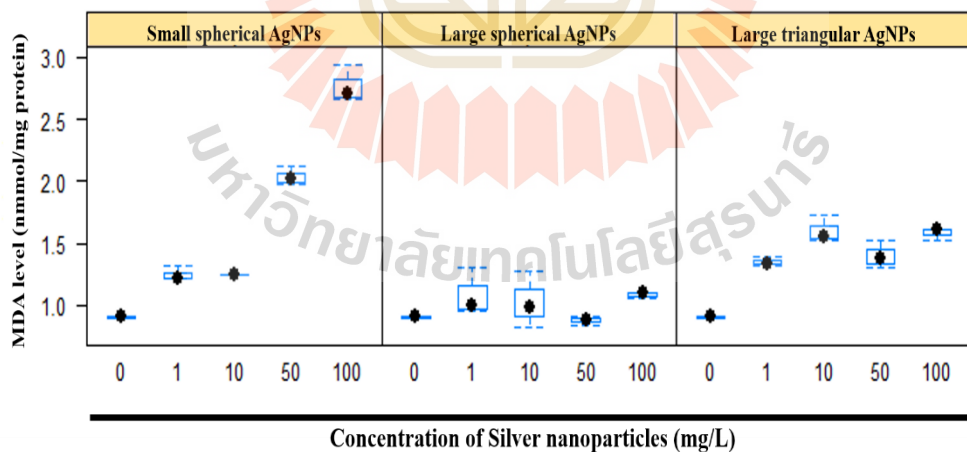
* แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ค่า p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

หมายเหตุ: อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักรูปร่างกบนา

4.9 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของลิพิด

ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาผลกระทบทางชีววิทยาระดับโมเลกุลต่อการตอบสนองของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ โดยวิเคราะห์ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเกิดออกซิเดชันของลิพิด ทั้งนี้ได้เปรียบเทียบผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) โดยนำเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ 18 ชั่วโมง มาวัดค่าออกซิเดชันของลิพิดด้วยวิธี TBARS assay

ผลการศึกษาดังภาพที่ 4.21 โดยพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษามีผลให้เกิดออกซิเดชันของลิพิดในเอ็มบริโอ โดยเกิดการออกซิเดชันของลิพิดในเอ็มบริโอมีค่าสูงขึ้นตามค่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ได้รับ หากเปรียบเทียบระหว่างอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทั้งสามชนิดพบว่า อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กมีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของลิพิดมากที่สุด รองลงมาคือ อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ตามลำดับ การที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กสามารถชักนำให้เซลล์เกิดออกซิเดชันได้สูงที่สุด คาดว่าเกิดจากอนุภาคขนาดเล็ก (<10 นาโนเมตร) สามารถผ่านเยื่อเซลล์และเข้าไปชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้โดยจับการโปรตีน เอนไซม์หรือสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในเซลล์ (Moore, 2006) นอกจากนี้อนุภาคนาโนซิลเวอร์บางส่วนที่ไม่เข้ามาภายในเซลล์แต่เกาะที่เยื่อหุ้มเซลล์ก็มีความสามารถชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน ด้วยเหตุนี้จึงพบอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ก็มีอัตราการเกิดออกซิเดชันเช่นเดียวกันแต่พบได้ในปริมาณที่น้อยกว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีขนาดเล็ก



ภาพที่ 4.21 ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ต่อการเกิดออกซิเดชันของลิพิด

4.10 การศึกษาการแสดงออกของยีน

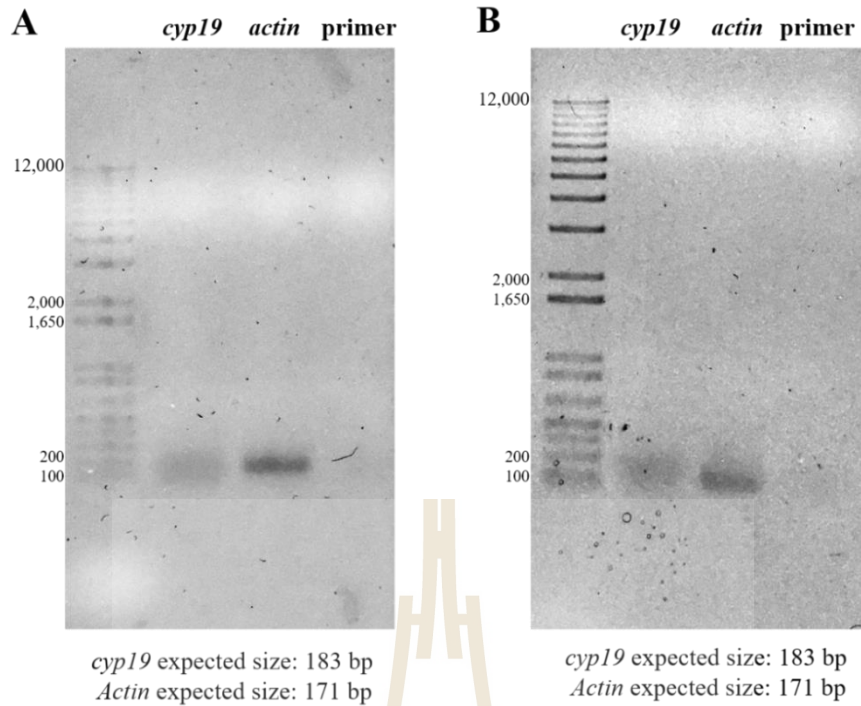
ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนของเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอของเอ็มบริโอด้วย Trizol reagent พบว่าสามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้ปริมาณ 18.4–22.9 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมของเอ็มบริโอ และมีค่า A260/280 เท่ากับ 1.80–1.86 เมื่อนำอาร์เอ็นเอไปแยกบนเจลอะกาโรสเพื่อตรวจสอบลักษณะของแถบอาร์เอ็นเอ พบแถบขนาดของอาร์เอ็นเอ ที่ 23S 16S และ 5S (ภาพที่ 4.22) ผลจากค่า A260/280 และลักษณะของแถบอาร์เอ็นเอบนอะกาโรสเจลแสดงว่าอาร์เอ็นเอที่ได้มีความสมบูรณ์ (Simms et al., 1993)



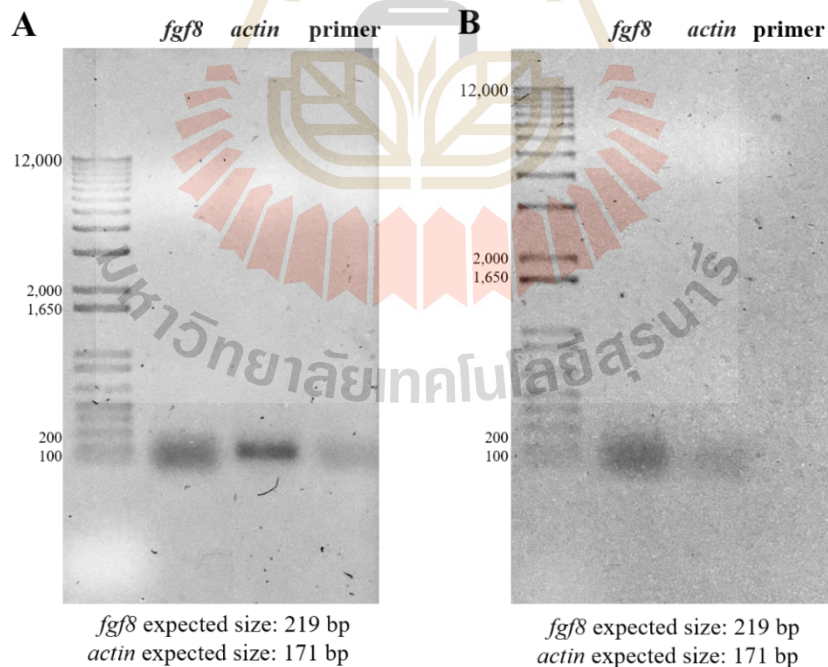
ภาพที่ 4.22 อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเอ็มบริโอของกบนาบน 1% อะกาโรสเจล โดย trt คือเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ ctrl คือเอ็มบริโอในชุดควบคุม

เมื่อนำอาร์เอ็นเอไปทำปฏิกิริยา RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน *cyp19* *fgf8* *MT* *p53* และ *sox9* ซึ่งยีน *cyp19* ทำหน้าที่เกี่ยวกับการตอบสนองภาวะเครียดออกซิเดชัน (Accession No. FJ644565) ยีน *fgf8* ทำหน้าที่สร้างไฟโบรพลาสต์โปรตีนในระยะที่กำลังสร้างกระดูกสันหลัง (Accession No. NM_001090435.1) ยีน *MT* ทำหน้าที่ตอบสนองต่อความเครียดในการกำจัดโลหะ (Accession No. M96729) ยีน *p53* ทำหน้าที่ตอบสนองต่อภาวะเครียด (Accession No. M36962) และยีน *sox9* ทำหน้าที่พัฒนาการกระดูกสันหลังในช่วงที่เป็นตัวอ่อน (Accession No. AB035887) โดยใช้ยีน beta actin เป็น house keeping gene (Accession No. JQ511828) ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวของกบนา *R. regulosa* จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกบ *Xenopus tropicalis* และกบ *X. laevis* โดยหาบริเวณ Conserved sequence ของยีนดังกล่าวเพื่อนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ และตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีนเหล่านี้ด้วยโปรแกรม BLASTn

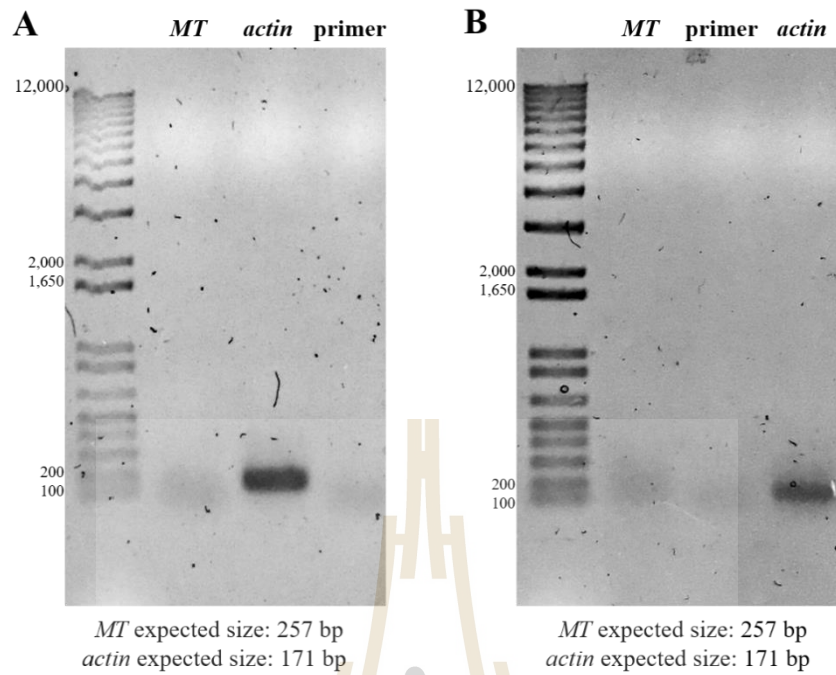
ผลจากการทำ RT-PCR (ภาพที่ 4.23–4.27) พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ข้างต้นได้ ยกเว้นไพรเมอร์ของยีน Beta-actin จากนั้นได้ออกแบบไพรเมอร์อีกชุด โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณอื่น พบว่าไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย RT-PCR ได้ จากอุปสรรคดังกล่าว จึงหาวิธีการอื่นเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเมกุลที่เป็นผลมาจากการที่เอ็มบริโอได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ โดยได้เลือกวิธีวิเคราะห์แบบใหม่คือ Synchrotron-based FTIR Micro-spectroscopy



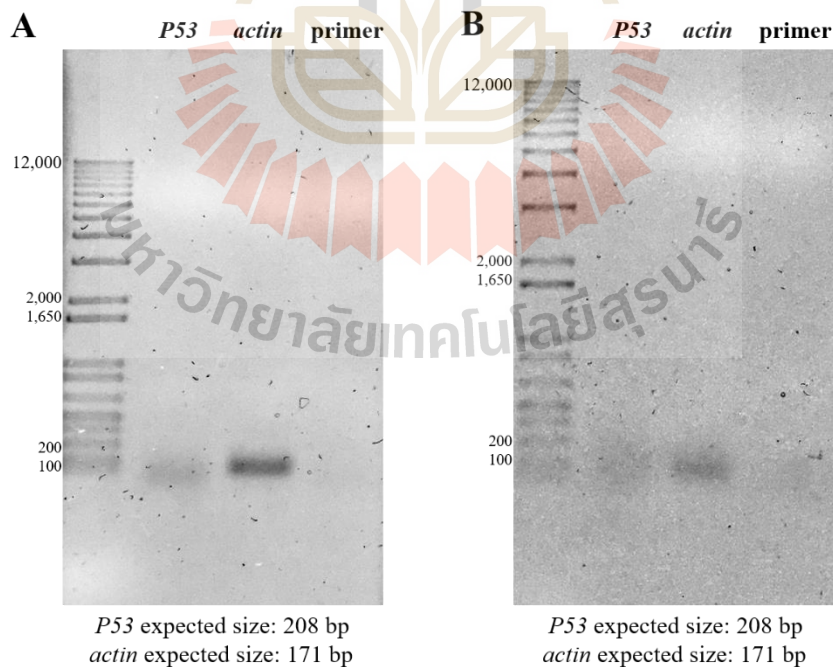
ภาพที่ 4.23 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *cyp19* และ β -actin โดย A) เอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และ B) เอ็มบริโอในชุดควบคุม



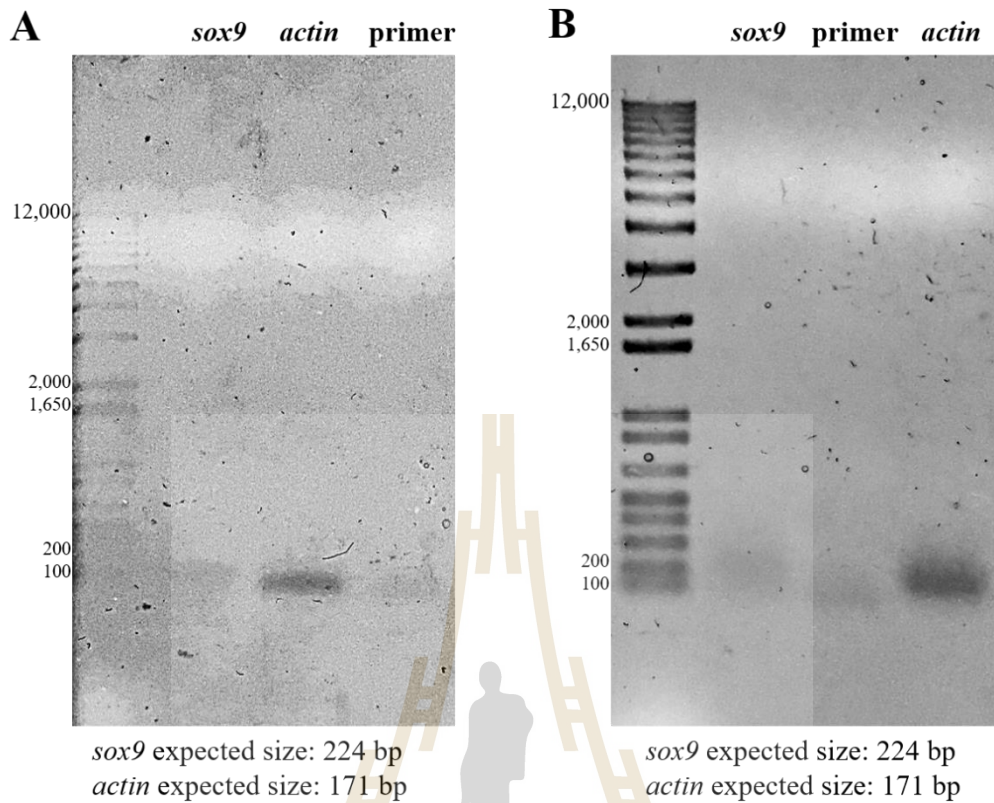
ภาพที่ 4.24 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *fgf8* และ β -actin โดย A) เอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และ B) เอ็มบริโอในชุดควบคุม



ภาพที่ 4.25 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *MT* และ β -*actin* โดย A) เอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และ B) เอ็มบริโอในชุดควบคุม A



ภาพที่ 4.26 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *P53* และ β -*actin* โดย A) เอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และ B) เอ็มบริโอในชุดควบคุม



ภาพที่ 4.27 ผลของปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *sox9* และ β -actin โดย A) เอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และ B) เอ็มบริโอในชุดควบคุม

4.11 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลโดยใช้ Synchrotron-based FTIR Microspectroscopy

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลโดยใช้ Synchrotron-based FTIR Microspectroscopy เป็นการวิเคราะห์โมเลกุลของสาร โดยอาศัยหลักการเกี่ยวกับการสั่น (Vibration) ของโมเลกุลแสงอินฟราเรดช่วงกลาง (2.5 ถึง 25 ไมโครเมตร) ที่มีความถี่ตรงกับความถี่การสั่นของพันธะโควาเลนต์ในโมเลกุลของสาร โดยที่ตัวอย่างได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรดที่พอเหมาะ จะเกิดการสั่นของโมเลกุลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่ (Dipole moment) ของโมเลกุล ทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสงแล้ววัดแสงที่ส่งผ่านออกมาแสดงผล เป็นความสัมพันธ์ของความถี่หรือ Wave Number กับค่าการส่งผ่านของแสง

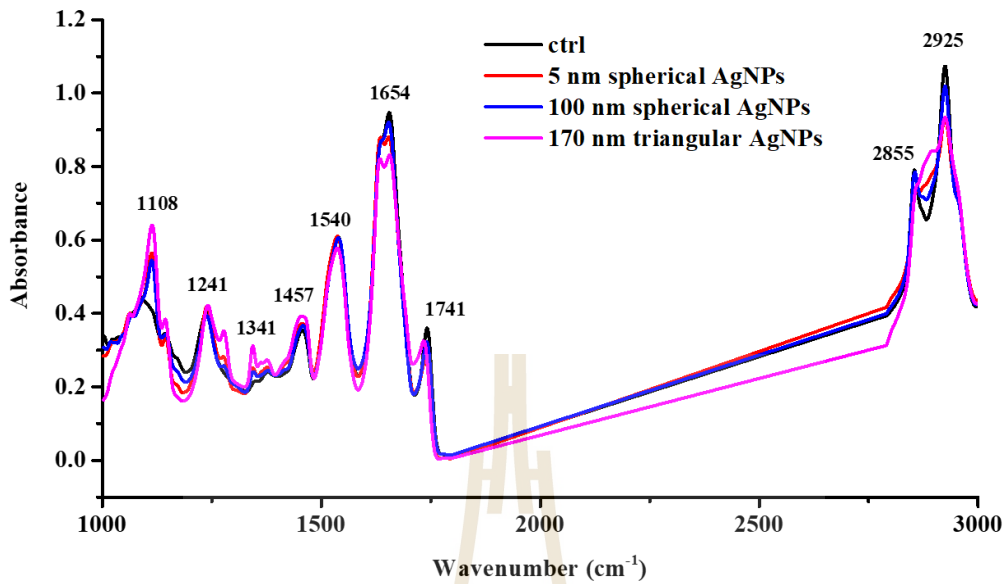
เรียกว่า IR Spectrum ซึ่งลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะโมเลกุลของสาร จึงสามารถดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ที่ความถี่ที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ที่เฉพาะตัวของแต่ละหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างของเอ็มบริโอที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) โดยการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงด้วยการวัดแบบจุด จำนวน 300 จุด โดยแบ่งเป็น 1) ส่วนหัว 300 จุด จำนวน 3 ตัวอย่าง และ 2) ส่วนลำตัว จำนวน 300 จุด จำนวน 3 ตัวอย่าง

4.11.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเอ็มบริโอในส่วนหัว

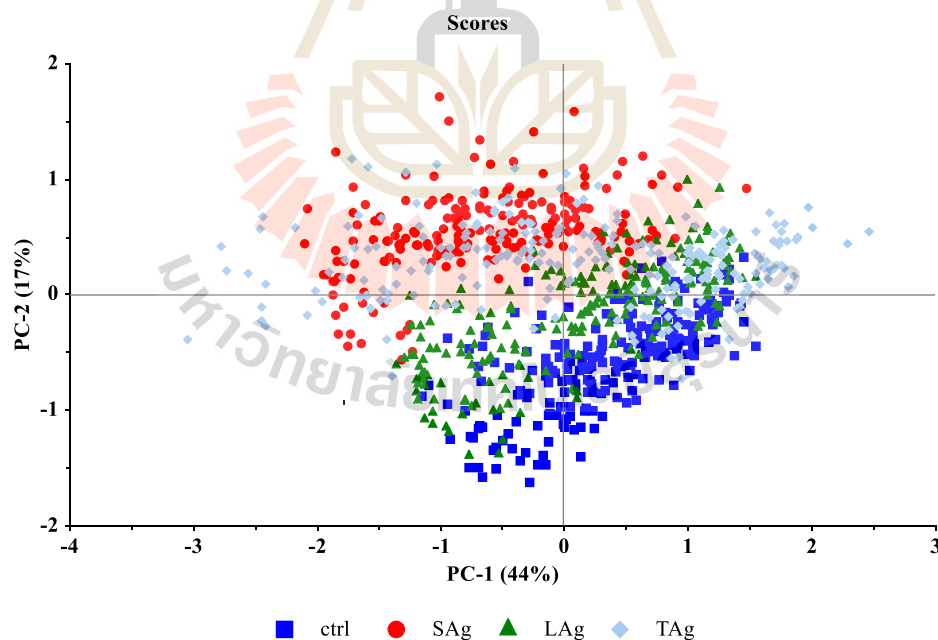
ภาพที่ 4.28 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของกบนาที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ผลการศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัม FTIR ซึ่งคาดว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ซึ่งแตกต่างไปจากเอ็มบริโอในชุดควบคุม เพื่อให้เข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จึงได้นำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Principal Component Analysis (PCA) เพื่อดูกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากการวัดทั้งหมด 300 กลุ่ม ดังภาพที่ 4.29 ซึ่งพบว่าเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) และรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลที่แตกต่างจากเอ็มบริโอในชุดควบคุมอย่างชัดเจน นอกจากนี้พบว่ารูปแบบของข้อมูลบางส่วนมีการซ้อนทับกันระหว่างอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมเล็ก (5 นาโนเมตร) และรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลที่มีความคล้ายคลึงกัน สำหรับเอ็มบริโอที่ได้อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) พบว่ามีรูปร่างของสารชีวโมเลกุลคล้ายคลึงกับเอ็มบริโอในชุดควบคุม (พบว่าอยู่ใน PC เดียวกัน)

เมื่อพิจารณาค่า Loading ใน PC1 (ภาพที่ 4.30) ของการทำ PCA ในส่วนของหัว พบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลที่ทำให้เกิดความแตกต่างกัน คือ กรดไขมัน (ที่พีค 2874 ต่อเซนติเมตร) กรด

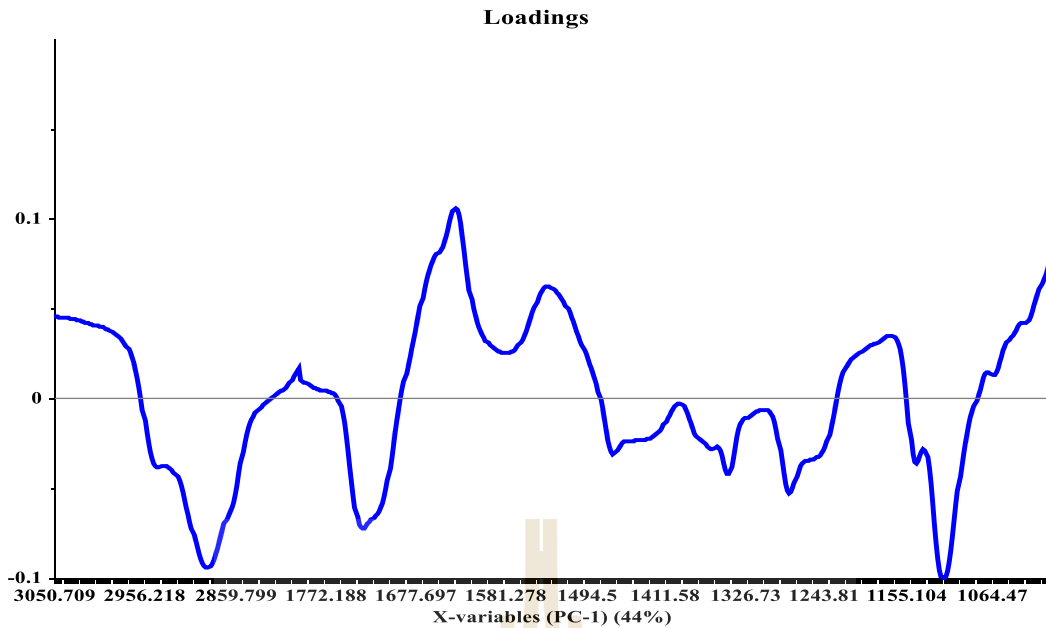
นิวคลีอิก (ที่พีค 1240 ต่อเซนติเมตร) และพันธะฟอสเฟสระหว่างกรดนิวคลีอิกและพอสโพลิพิดที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (ที่พีค 1080 ต่อเซนติเมตร)



ภาพที่ 4.28 ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของเนื้อเยื่อส่วนหัวของเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปทรงสามเหลี่ยมขนาดใหญ่



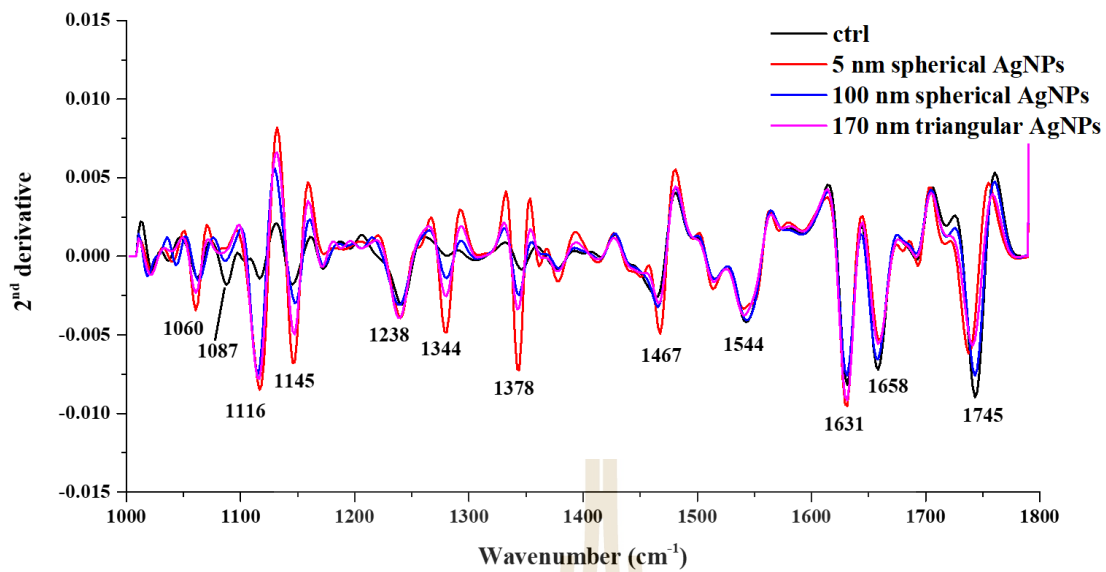
ภาพที่ 4.29 การกระจายกลุ่มตัวอย่างของเอ็มบริโอ (บริเวณส่วนหัว) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แตกต่างกัน โดย ctrl SAg Lag และ Tag คือเอ็มบริโอชุดควบคุม เอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ รูปร่างกลมขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดใหญ่ และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.30 ค่า loading ของ PC1 (บริเวณส่วนหัว)

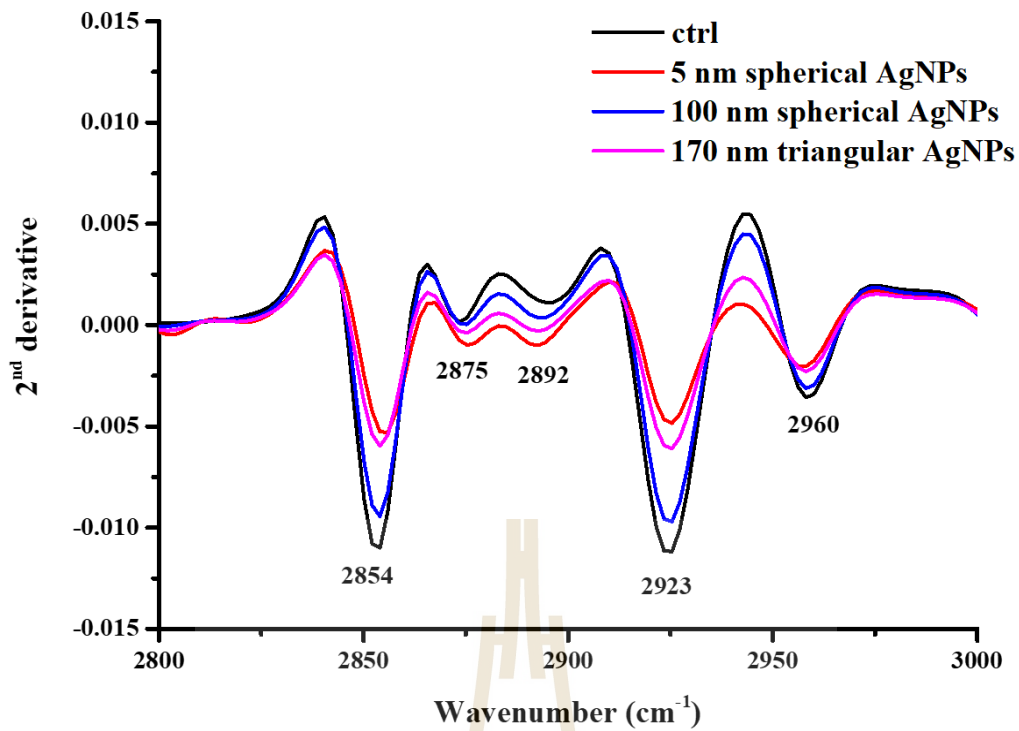
เพื่อให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมที่มีความชัดเจนมากขึ้นจึงได้ใช้ข้อมูลที่ได้จากการทำ PCA มาทำการหาค่า Second derivative spectra ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ช่วงศึกษา และสรุปในตารางที่ 4.2

1) ช่วง 1800 ถึง 1000 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงกรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับกรดไขมัน ผลการศึกษาดังภาพที่ 4.31 ซึ่งแสดงข้อมูล Second derivative spectra พบการเปลี่ยนแปลงพีคที่ตำแหน่ง 1116 1145 และ 1378 ต่อเซนติเมตร สอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชันฟอสเฟสของกรดนิวคลีอิก หมู่ฟังก์ชัน CO-O-C ของคาร์โบไฮเดรต และหมู่ฟังก์ชัน COO- ของโปรตีน ตามลำดับ



ภาพที่ 4.31 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 1000 ถึง 1800 ต่อเซนติเมตร (บริเวณส่วนหัว)

2) ช่วง 2800 ถึง 3000 ต่อเซนติเมตร ในส่วนผลของ Second derivative spectra ในช่วงที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 2,800 ถึง 3,000 ต่อเซนติเมตร (บริเวณส่วนหัว) ดังภาพที่ 4.32 จากการวิเคราะห์พบการเปลี่ยนแปลงของพีคที่ลดลงที่ตำแหน่ง 2854 และ 2925 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชัน $-CH$ และ $-CH_2$ ของกรดไขมัน การเปลี่ยนแปลงนี้พบเฉพาะในเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทรงกลมขนาด 5 นาโนเมตร และรูปทรงสามเหลี่ยมขนาด 170 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.32 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 2800 ถึง 3000 ต่อ เซนติเมตร (บริเวณส่วนหัว)

ตารางที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเอ็มบริโอ (ส่วนหัว) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จาก Second derivative spectra

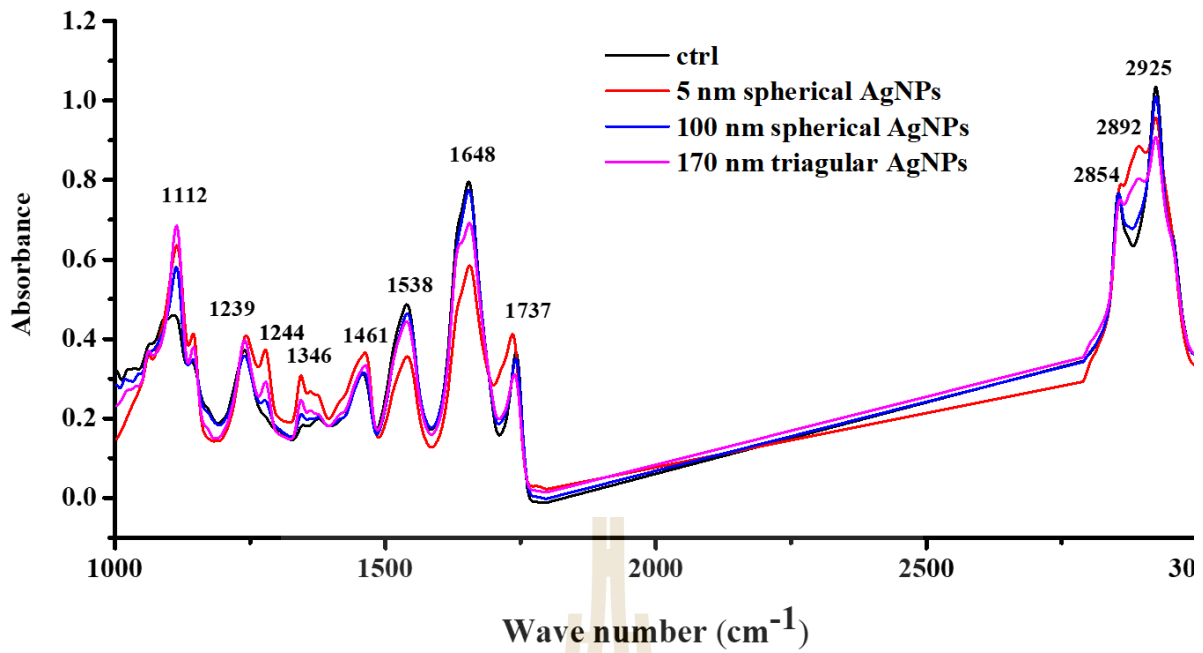
สารชีวโมเลกุล	เอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่าง			
	เอ็มบริโอชุด ควบคุม	กลมเล็ก	กลมใหญ่	สามเหลี่ยมใหญ่
กรดนิวคลีอิก	-0.001 +	-0.008 +++++	-0.007 ++++	-0.007 ++++
คาร์โบไฮเดรต	-0.001 +	-0.006 +++++	-0.002 +++	-0.004 ++++
โปรตีน	-0.001 +	-0.007 +++++	-0.002 ++	-0.003 +++
ลิพิด	-0.011 +++++	-0.004 ++	-0.009 ++++	-0.006 +++

หมายเหตุ + แสดงระดับของการเปลี่ยนแปลง

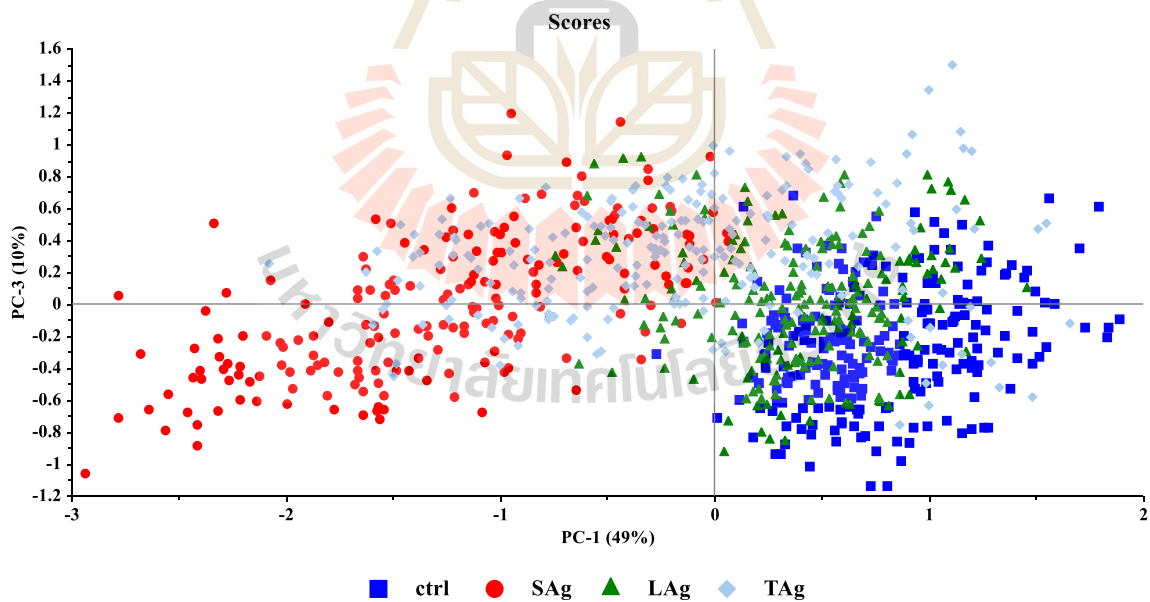
4.11.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเอ็มบริโอในส่วนลำตัว

ผลการศึกษาดังภาพที่ 4.33 ซึ่งแสดงค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างทรงกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ผลการศึกษาพบว่ามีความคล้ายคลึงกับผลการศึกษาในส่วนหัวของเอ็มบริโอ เพียงแต่พบการกระจายข้อมูลของเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างขนาดเล็กแตกต่างจากตัวอย่างในกลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจนมากขึ้น ทั้งนี้พบว่าเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทั้งสามแบบเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลที่แตกต่างไปจากชุดควบคุม จากผลการวิเคราะห์ PCA (ภาพที่ 4.34) พบรูปแบบของหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลที่คล้ายกันระหว่างเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทรงกลมขนาด 100 นาโนเมตร และชุดควบคุม ขณะที่พบรูปแบบของหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลที่คล้ายกันระหว่างชุดทดสอบที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทรงกลมขนาด 5 นาโนเมตร และอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาด 170 นาโนเมตร

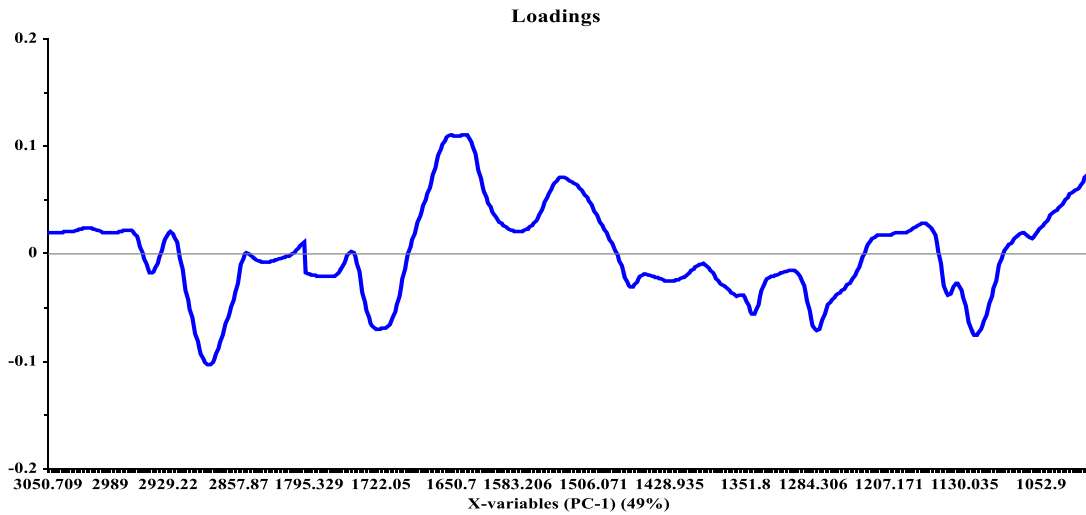
เมื่อพิจารณาค่า loading ใน PC1 ของการทำ PCA (ภาพที่ 4.35) และจากการศึกษาพีคเอกลักษณ์ในช่วง 1,800 ถึง 1,000 ต่อเซนติเมตร (ภาพที่ 4.36) พบการเปลี่ยนแปลงของพีคเอกลักษณ์ที่ตำแหน่ง 1,080 1,240 1,500 และ 1,650 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลประเภทฟอสโฟลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์ Amide I และ Amide II ของโปรตีน และ C=O ของกรดไขมัน ตามลำดับ สำหรับผลการศึกษา Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วง 2,800 ถึง 3,000 ต่อเซนติเมตร (ภาพที่ 4.37) พบการเปลี่ยนแปลงของพีคเอกลักษณ์ที่ตำแหน่ง 2,925 2,892 และ 2,854 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชันของกรดไขมัน โดยผลการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลดังกล่าวสรุปในตารางที่ 4.3



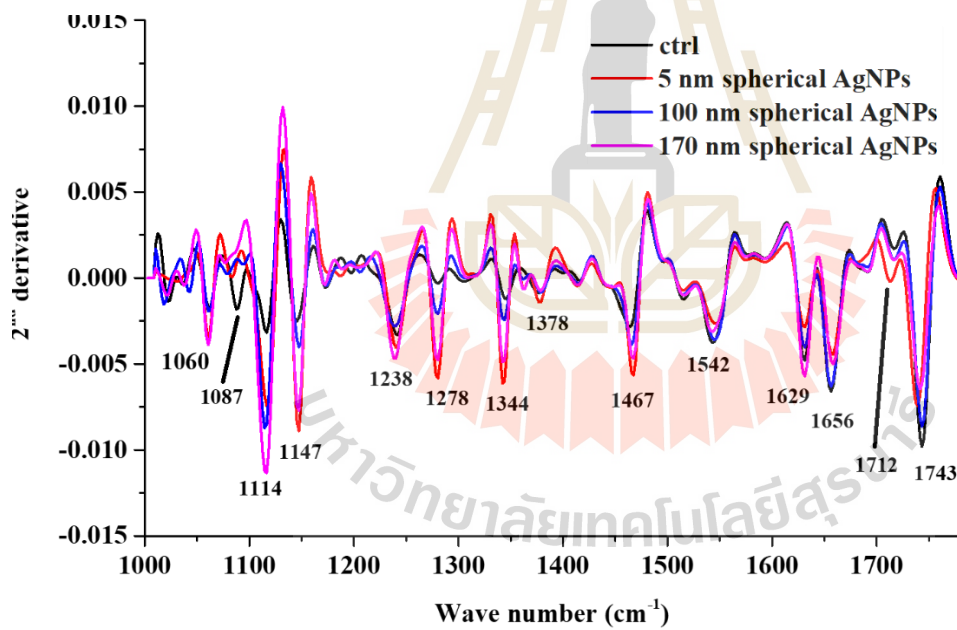
ภาพที่ 4.33 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 1000 ถึง 3000 ต่อ เซนติเมตร (ส่วนลำตัว)



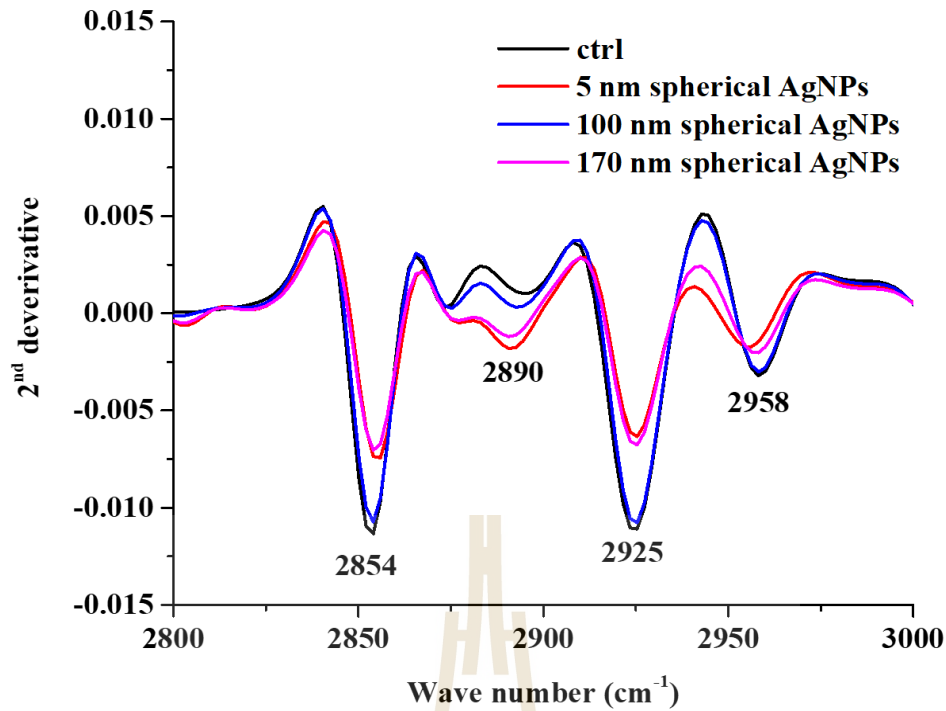
ภาพที่ 4.34 การกระจายกลุ่มตัวอย่างของเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แตกต่างกัน (ส่วนลำตัว)



ภาพที่ 4.35 ค่า loading ของ PC1 (ส่วนลำตัว)



ภาพที่ 4.36 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 1000 ถึง 1800 ต่อ เซนติเมตร (ส่วนลำตัว)



ภาพที่ 4.37 Second derivative spectra โดยการใช้ PCA ในช่วงความยาวคลื่น 2800 ถึง 3000 ต่อ เซนติเมตร (ส่วนลำตัว)

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเอ็มบริโอ (ส่วนลำตัว) ที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จาก Second derivative spectra

สารชีวโมเลกุล	เอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่าง			
	ควบคุม	กลมเล็ก	กลมใหญ่	สามเหลี่ยมใหญ่
กรดนิวคลีอิก	-0.003 ++	-0.007 ++++	-0.008 ++++	-0.011 +++++
คาร์โบไฮเดรต	-0.002 ++	-0.008 +++++	-0.003 +++	-0.007 ++++
โปรตีน	-0.001 +	-0.006 +++++	-0.002 ++	-0.004 ++++
ลิพิด	-0.011 +++++	-0.007 +++	-0.010 +++++	-0.007 +++

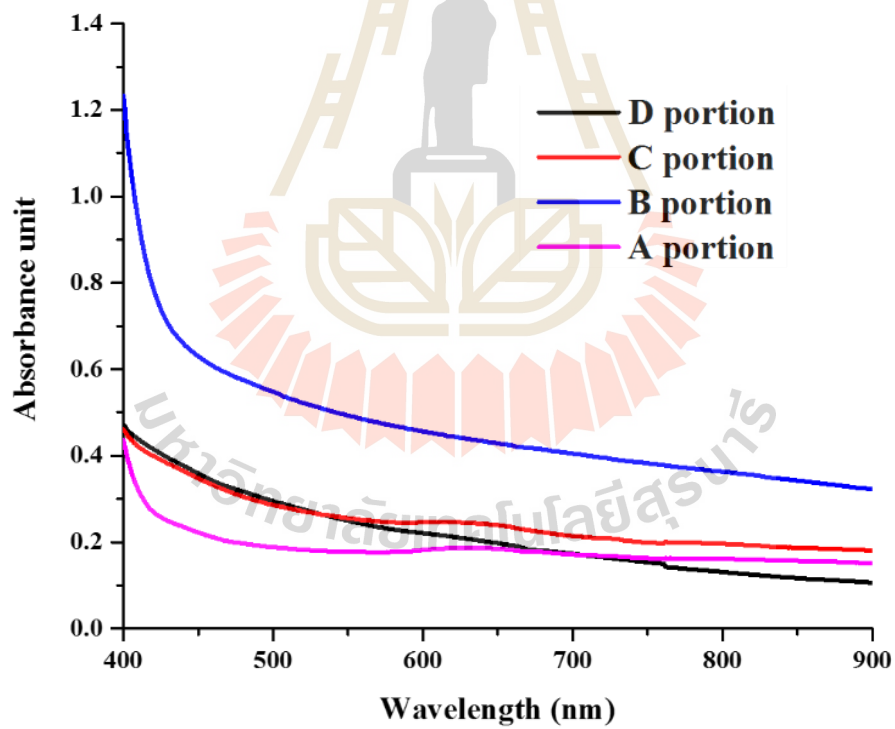
หมายเหตุ + ระดับของการเปลี่ยนแปลง

4.12 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในน้ำ

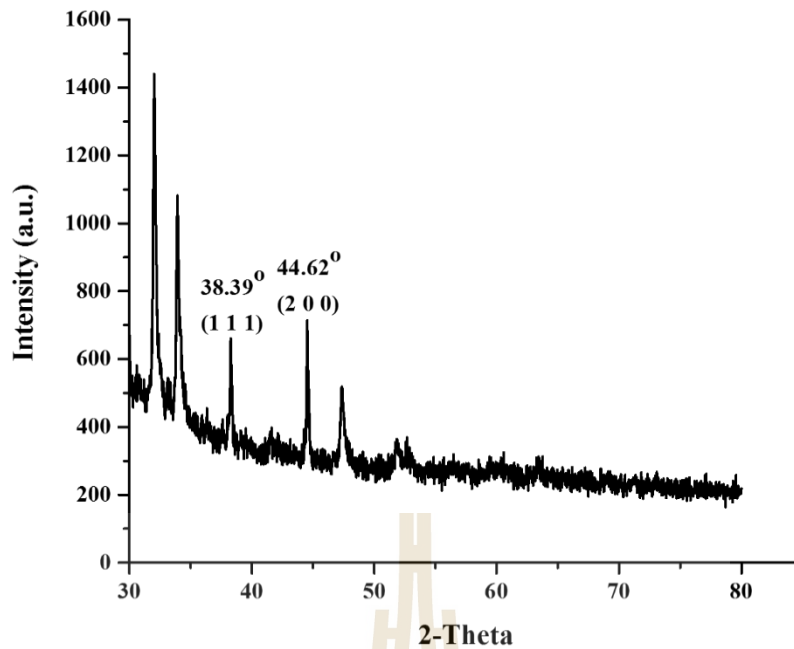
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในน้ำ ในการทดลองแรกเป็นการศึกษาการกระจายและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ โดยทำการศึกษาจากผงซัพพอร์ทเซมิคอนดักเตอร์ที่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์ผสมอยู่ (เปาซิลเวอร์นาโน) เนื่องจากการใช้ผงซัพพอร์ทที่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์น่าจะเป็นแนวทางหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในแหล่งน้ำ ในการทดลองได้แยกส่วนประกอบในผงซัพพอร์ทด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 xg พบว่าผงซัพพอร์ทมีการแยกชั้นออกเป็น 4 ชั้น ได้แก่ ชั้น A B C และ D ดังภาพที่ 4.38 เมื่อนำสารละลายทั้ง 4 ชั้น ไปศึกษาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 ถึง 900 นาโนเมตร ไม่ปรากฏค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่เป็นเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่อยู่ในช่วง 390 ถึง 500 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.39) เมื่อพิจารณาลักษณะของแต่ละชั้น พบว่าชั้น C มีลักษณะเป็นตะกอนสีดำซึ่งคาดว่าอาจเป็นโลหะซิลเวอร์ผสมกับสารประกอบในผงซัพพอร์ท จึงทดลองนำชั้น C ไปศึกษาโครงสร้างผลึกของโลหะซิลเวอร์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ (XRD) ผลการศึกษาดังภาพที่ 4.40 โดยตะกอนชั้น C ปรากฏพีคเอกลักษณ์มุม 2θ เท่ากับ 38.39° และ 44.62° ซึ่งบ่งบอกถึงระนาบ (111) และ (200) ของโครงสร้างแลตทิซแบบ faced center cubic (FCC) ของโลหะซิลเวอร์ (อ้างอิงจาก JCPDS File No. 03-065-2871) สำหรับพีคอื่น ๆ ที่ปรากฏคาดว่าเป็นพีคของสารประกอบชนิดอื่นที่อยู่ในผงซัพพอร์ท



ภาพที่ 4.38 ลักษณะของผงซักฟอกที่นำมาศึกษา และการแยกชั้นของผงซักฟอกเมื่อนำมาปั่นตกตะกอน



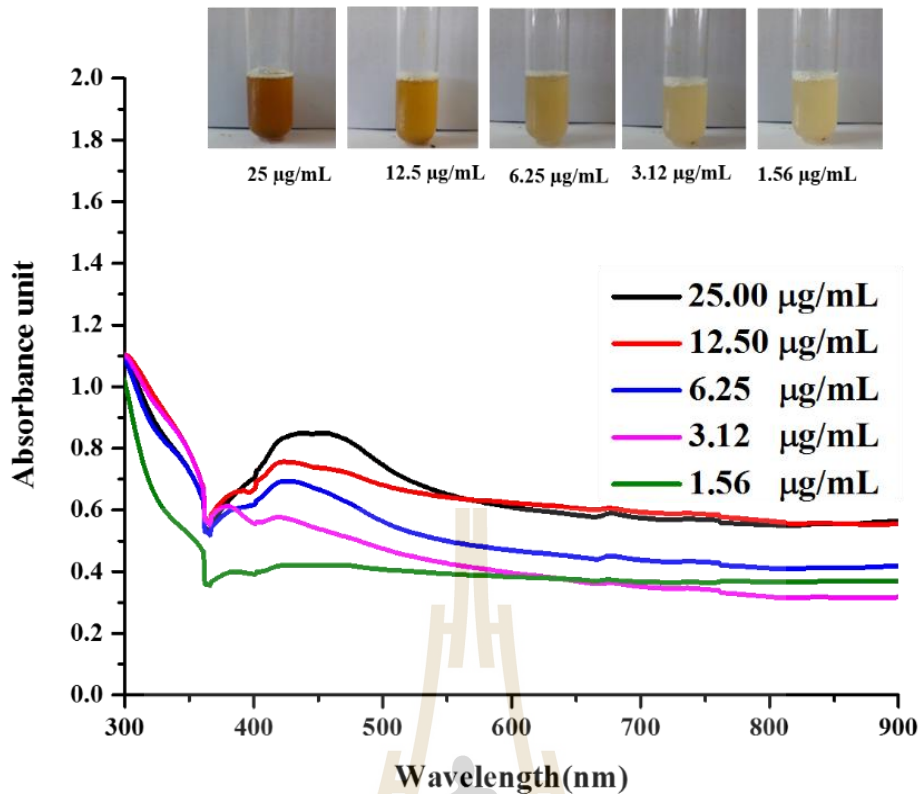
ภาพที่ 4.39 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 ถึง 900 นาโนเมตร ของแต่ละชั้นที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง
แยกชั้นของผงซักฟอก



ภาพที่ 4.40 การระบุเอกลักษณ์และการศึกษาโครงสร้างผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แยกได้จากผงซักฟอก

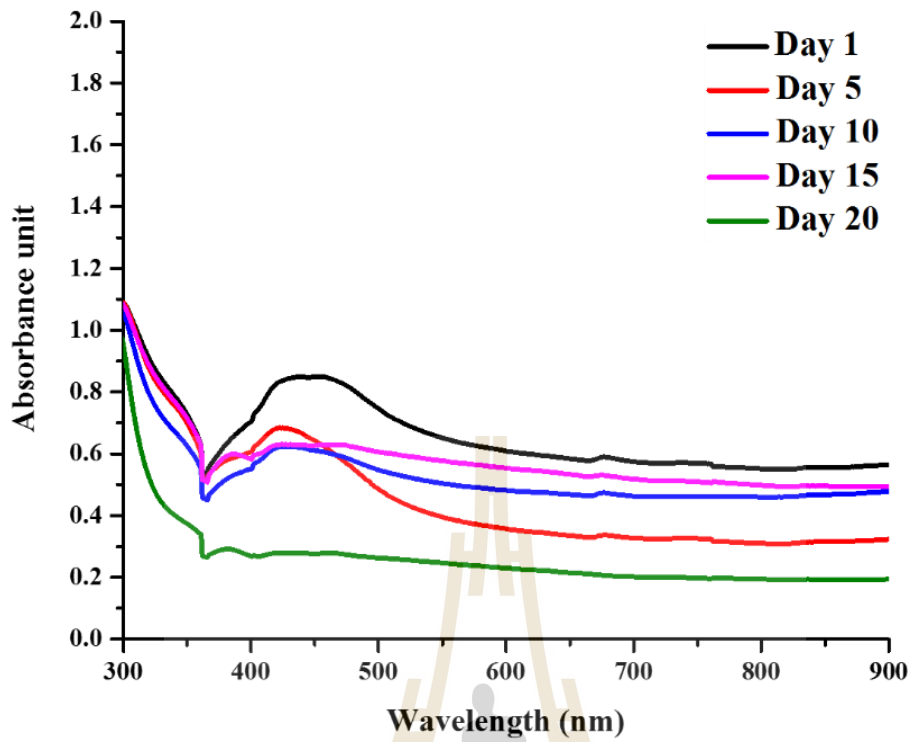
แม้ว่าตะกอนในชั้น C จะมีโครงสร้างผลึกของโลหะซิลเวอร์ แต่ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เป็นเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ ดังนั้นจึงเปลี่ยนวิธีการศึกษาการกระจายตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในผงซักฟอกโดยสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ด้วยวิธีเคมี และตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ก่อนนำไปผสมผงซักฟอกที่ไม่มีอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นส่วนประกอบ

การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์กับผงซักฟอกโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการติดตามการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ โดยใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ 1.56 ถึง 25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อ 0.1 กรัม ของผงซักฟอก ผลการศึกษาดังภาพที่ 4.41 โดยพบว่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ตั้งแต่ 6.25 ถึง 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เป็นเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ และที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ 25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวในการศึกษาการติดตามการกระจายและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อไป



ภาพที่ 4.41 การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 1.56 ถึง 25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อผงซักฟอก 0.1 กรัม

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 วัน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 5 วัน ดังภาพที่ 4.42 โดยพบว่าสามารถติดตามการกระจายและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ในวันที่ 1 และ 5 ที่ยังคงสามารถสังเกตเห็นพีคเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ (426 นาโนเมตร) แต่ในวันที่ 5 จะสังเกตเห็นว่าค่าดูดกลืนแสงมีรูปแบบที่แตกต่างไปจากวันที่ 1 คือมีรูปแบบค่าการดูดกลืนแสงมีความกว้างของพีคที่ลดลงและความเข้มลดลง นอกจากนี้พบว่าในวันที่ 10 และ 15 พีคเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีความเข้มที่ลดลง จนไม่สามารถสังเกตเห็นในวันที่ 20 จากข้อมูลข้างต้นทำให้สันนิษฐานว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ผสมอยู่ในผงซักฟอกน่าจะเกิดการสลายตัวเป็นไอออนบางส่วนทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่เป็นเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ลดลง นอกจากนี้ในผงซักฟอกมีสารซีโอไลต์ ซึ่งสามารถจับไอออนของซิลเวอร์และตกตะกอนได้ (Nawaz and Sengupta, 2017)



ภาพที่ 4.42 การดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อผงซักฟอก 0.1 กรัม เป็นเวลา 20 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ต้องการศึกษาผลกระทบทางชีวภาพของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อกบนา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่ออนุภาคนาโนซิลเวอร์มีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน โดยได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ 3 รูปแบบ คือ อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปทรงกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) รูปทรงกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ซึ่งเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ได้ ได้ทำการวิเคราะห์และยืนยันด้วยเทคนิค SAED-TEM และ XRD โดยจากการวิเคราะห์ด้วย SAED-TEM ได้ค่า d -spacing ในช่วง 2.37 2.02 1.48 และ 1.21 อังสตรอม จากการวิเคราะห์ด้วย XRD ได้ค่า 2θ 38.11° 44.30° 64.44° และ 77.39° ซึ่งสอดคล้องกับระนาบซึ่งบ่งบอกถึงระนาบ (111) (200) (220) และ (311) ของโครงสร้างผลึกแบบ FCC ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ตามลำดับ

ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการตาย การเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอกบนาในช่วง 24 ชั่วโมง โดยแช่เอ็มบริโอกบนาที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่แต่ละความเข้มข้น พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีผลต่อการตาย การเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอกบนาแบบแปรผันตามความเข้มข้น (Dose dependent response) เมื่อเปรียบเทียบอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) มีผลต่อการตาย การเจริญ และพัฒนาการมากที่สุด รองลงมาคืออนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (100 นาโนเมตร) และรูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ (170 นาโนเมตร) ซึ่งน่าจะมีผลจากการที่อนุภาคขนาด 5 นาโนเมตร มีขนาดเล็กมาซึ่งทำให้สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จึงมีผลกระทบที่รุนแรงมากกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีผลเพิ่มอัตราการตาย ลดการเจริญเติบโต (วิเคราะห์จากความยาวลำตัว) และทำให้เกิดพัฒนาการที่ผิดปกติ โดยเกิดการคุดและโค้งงอของหาง

ในการศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของกบนา โดยแช่เอ็มบริโอกบนาที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีอนุภาคสีดำสะสมอยู่บริเวณเนื้อเยื่อเหงือก เมื่อศึกษาการ

สะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในอวัยวะของกบโตเต็มวัย ซึ่งได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทางปาก พบว่าอวัยวะที่พบการสะสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์สูงที่สุด คือ กระเพาะอาหาร รองลงมา คือ ตับ ไต และลำไส้ ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากระบบย่อยอาหารสามารถถูกส่งไปยังตับและไตได้ทางกระแสโลหิต นอกจากนี้พบว่าไขในท่อนำไข่ของกบเพศเมียมีปริมาณการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้สูงกว่าปริมาณที่พบในกระเพาะอาหารถึง 2.1 เท่า ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากการที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์ถูกส่งจากระบบย่อยอาหารไปยังอวัยวะสืบพันธุ์ผ่านทางกระแสโลหิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่มีสร้างไข่ ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่กบได้รับสามารถสะสมในไข่ และอาจส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของเอ็มบริโอ (ขึ้นอยู่กับปริมาณ) ทำให้อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณของกบนาในธรรมชาติ เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศและสายใยอาหารได้

ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเกิดออกซิเดชันของลิพิดในเอ็มบริโอด้วยวิธี TBARS assay พบว่าผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเกิดออกซิเดชันของลิพิดของเอ็มบริโอแบบแปรผันตามความเข้มข้น นอกจากนี้พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปทรงกลมเล็กมีผลทำให้เกิดการออกซิเดชันของลิพิดสูงที่สุด รองลงมาคืออนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ และรูปร่างกลมขนาดใหญ่ ตามลำดับ

ผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุล เดิมได้ทำการศึกษาผลการแสดงออกของยีนแต่เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายได้ (เพราะไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะของยีนดังกล่าวในกบนา) จึงได้เปลี่ยนมาใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Synchrotron-based FTIR micro-spectrometry ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ทุกรูปแบบมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของสารชีวโมเลกุล คือ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิก โดยอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปร่างกลมขนาดเล็กมีความแตกต่างที่ชัดเจนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงไว้ข้างต้น

สำหรับผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในน้ำ เดิมเป็นการนำเปาซิลเวอร์นาโนมาติดตามการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ แต่ไม่พบพิกัดเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ทำให้

คาดว่าอาจมีปริมาณน้อย ดังนั้นจึงเปลี่ยนเป็นการใช้ผงซักฟอกผสมกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นพบว่าสามารถติดตามการกระจายและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ได้ โดยพบการลดลงของฟิสิกส์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ตามระยะเวลาในการติดตาม และไม่พบฟิสิกส์ดังกล่าวในการทดลองวันที่ 20 ซึ่งคาดว่าเกิดการแตกตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในน้ำ ซึ่งอินอนของซิลเวอร์สามารถรวมตัวกับสารประกอบในผงซักฟอกและตกตะกอน



เอกสารอ้างอิง

- Agnihotri, S., Mukherji, S., and Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **The Royal Society of Chemistry Advances**. 4(8): 3974-3983.
- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., and Hong, Y. (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 233(3): 404-410.
- Alsammarraie, F. K., Wang, W., Zhou, P., Mustapha, A., and Lin, M. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 171: 398-405.
- Anandalakshmi, K., Venugobal, J., and Ramasamy, V. (2016). Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliium murex* leaf extract and their antibacterial activity. **Applied Nanoscience**. 6(3): 399-408.
- Ankley, G. T., Tietge, J. E., DeFoe, D. L., Jensen, K. M., Holcombe, G. W., Durhan, E. J., and Diamond, S. A. (1998). Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 17(12): 2530-2542.
- Asharani, P., Gong, Z., Hande, M. P., and Valiyaveetil, S. (2007). Potential health impacts of silver nanoparticles. **Chemical Research in Toxicology**. 20(12): 2009-2009.
- Asharani, P., Wu, Y. L., Gong, Z., and Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**. 19(25): 255102-255109.

- Bao, H., Yu, X., Xu, C., Li, X., Li, Z., Wei, D., and Liu, Y. (2015). New toxicity mechanism of silver nanoparticles: Promoting apoptosis and inhibiting proliferation. **PLOS ONE**. 10(3): e0122535-e0122545.
- Bradford, A., Handy, R. D., Readman, J. W., Atfield, A., and Mühlhling, M. (2009). Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. **Environmental Science & Technology**. 43(12): 4530-4536.
- Carew, A. C., Hoque, M. E., Metcalfe, C. D., Peyrot, C., Wilkinson, K. J., and Helbing, C. C. J. A. T. (2015). Chronic sublethal exposure to silver nanoparticles disrupts thyroid hormone signaling during *Xenopus laevis* metamorphosis. **Aquatic Toxicology**. 159: 99-108.
- Chae, Y. J., Pham, C. H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., and Gu, M. B. J. A. T. (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**. 94(4): 320-327.
- Chen, S.-F., and Zhang, H. (2014). Stability and sedimentation of silver nanoparticles in the presence of monovalent, divalent and trivalent electrolyte solutions. **Water Science and Technology**. 70(2): 361-366.
- Cobley, C. M., Skrabalak, S. E., Campbell, D. J., and Xia, Y. (2009). Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles for plasmonic and sensing applications. **Plasmonics**. 4(2): 171-179.
- Darroudi, M., Ahmad, M. B., Abdullah, A. H., and Ibrahim, N. A. (2011). Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**. 6: 569-574.

- Decharat, A., Wagle, S., Jacobsen, S., and Melandsø, F. (2015). Using silver nano-particle ink in electrode fabrication of high frequency copolymer ultrasonic transducers: Modeling and experimental investigation. **Sensors**. 15(4): 9210-9227.
- Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., and Delekar, S. D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. **Materials Science and Engineering: C**. 97: 954-965.
- Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., and Yacaman, M. J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**. 3(1): 1-21.
- Foldbjerg, R., Dang, D. A., and Autrup, H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**. 85(7): 743-750.
- Goto-Inoue, N., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., and Mori, T. J. B. o. (2016). Metabolomic approach for identifying and visualizing molecular tissue markers in tadpoles of *Xenopus tropicalis* by mass spectrometry imaging. **Biology Open**. 5(9): 1252-1259.
- Johari, S., Sourinejad, I., Asghari, S., and Barsch, N. (2015). Toxicity comparison of silver nanoparticles synthesized by physical and chemical methods to tadpole (*Rana ridibunda*). **Caspian Journal of Environmental Sciences**. 13(4): 383-390.
- Kawata, K., Osawa, M., and Okabe, S. (2009). In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. **Environmental Science and Technology**. 43(15): 6046-6051.

- Kim, J., Yoon, T.-J., Yu, K., Kim, B., Park, S., Kim, H., Lee, K., Park, S., Lee, J.-K., and Cho, M. (2006). Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. **Toxicological Sciences**. 89: 338-347.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., and Hwang, C.-Y. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. 3(1): 95-101.
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., and Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 27(9): 1825-1851.
- Koroglu, A., Şahin, O., Kurkcuoglu, I., Dede, D. Ö., Özdemir, T., and Hazer, B. (2016). Silver nanoparticle incorporation effect on mechanical and thermal properties of denture base acrylic resins. **Journal of Applied Oral Science**. 24(6): 590-596.
- Laban, G., Nies, L. F., Turco, R. F., Bickham, J. W., and Sepúlveda, M. S. J. E. (2010). The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. **Ecotoxicology**. 19(1): 185-195.
- Lankveld, D. P., Oomen, A. G., Krystek, P., Neigh, A., Troost-de Jong, A., Noorlander, C., Van Eijkeren, J., Geertsma, R., and De Jong, W. (2010). The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. **Biomaterials**. 31(32): 8350-8361.
- Liang, H., Yang, H., Wang, W., Li, J., and Xu, H. (2009). High-yield uniform synthesis and microstructure-determination of rice-shaped silver nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**. 131(17): 6068-6069.

- Luoma, S. N. (2008). Silver nanotechnologies and the environment. **The Project on Emerging Nanotechnologies Report**. 15: 1-72.
- Malanowski, N. (2006). Growth market nanotechnology - an analysis of technology and innovation. **Monitoring Innovations-und Technologiepolitik**. 1: 1-294.
- Mansouri, S. S., and Ghader, S. (2009). Experimental study on effect of different parameters on size and shape of triangular silver nanoparticles prepared by a simple and rapid method in aqueous solution. **Arabian Journal of Chemistry**. 2(1): 47-53.
- Mohanbaba, S., and Gurunathan, S. (2016). Differential biological activities of silver nanoparticles against gram-negative and gram-positive bacteria: A novel approach for antimicrobial therapy. **Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy**. 6: 193-227.
- Moore, M. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**. 32(8): 967-976.
- Moores, A., and Goettmann, F. (2006). The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. **New Journal of Chemistry**. 30(8): 1121-1132.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., and Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**. 16(10): 2346-2353.
- Nam, S.-H., Il Kwak, J., and An, Y.-J. (2018). Quantification of silver nanoparticle toxicity to algae in soil via photosynthetic and flow-cytometric analyses. **Scientific Reports**. 8(1): 292-292.

- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., and Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science and Technology**. 42(23): 8959-8964.
- Nawaz, T., and Sengupta, S. (2017). Silver recovery from laundry wastewater: the role of detergent chemistry. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**. 6(1): 600-608.
- Pal, S., Tak, Y. K., and Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle: A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. 73(6): 1712-1720.
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hopley, J., and Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. **Analyst**. 139(19): 4855-4861.
- Patil, M. P., and Kim, G.-D. (2017). Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 101(1): 79-92.
- Qin, Y., Ji, X., Jing, J., Liu, H., Wu, H., and Yang, W. (2010). Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 372(1): 172-176.
- Qing, Y. a., Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., Wang, J., Liu, H., and Qin, Y. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. **International Journal of Nanomedicine**. 13: 3311-3327.

- Roldan, M., Frattini, A., De Sanctis, O., Troiani, H., and Pellegri, N. (2007). Characterization and applications of Ag nanoparticles in waveguides. **Applied Surface Science**. 254(1): 281-285.
- Rosa, L. R., Rosa, R. D., and da Veiga, M. A. M. S. (2016). Colloidal silver and silver nanoparticles bioaccessibility in drinking water filters. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. 4(3): 3451-3458.
- Saibene, M., Colombo, A., Bonfanti, P., Moschini, E., Collini, M., Kasemets, K., and Mantecca, P. J. R. T. (2016). Developmental toxicity of differently coated silver nanoparticles on *Xenopus laevis*. **Reproductive Toxicology**. 100(64): 48.
- San-Segundo, L., Guimarães, L., Torija, C. F., Beltrán, E. M., Guilhermino, L., and Pablos, M. V. (2016). Alterations in gene expression levels provide early indicators of chemical stress during *Xenopus laevis* embryo development: A case study with perfluorooctane sulfonate (PFOS). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 127: 51-60.
- Scown, T. M., Santos, E. M., Johnston, B. D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J. R., Stone, V., Fernandes, T. F., Jepson, M., van Aerle, R., and Tyler, C. R. (2010). Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. **Toxicological Sciences**. 115(2): 521-534.
- Sellami, B., Mezni, A., Khazri, A., Bouzidi, I., Saidani, W., Sheehan, D., and Beyrem, H. J. A. T. (2017). Toxicity assessment of ZnO-decorated Au nanoparticles in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. **Aquatic Toxicology**. 188: 10-19.
- Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., and Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against

Staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. 3(2): 168-171.

Simms, D., Cizdziel, P. E., and Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. **Focus**. 15(4): 532-535.

Skirtach, A. G., Antipov, A. A., Shchukin, D. G., and Sukhorukov, G. B. (2004). Remote activation of capsules containing Ag nanoparticles and IR dye by laser light. **Langmuir**. 20(17): 6988-6992.

Sowmya, T., and Lakshmi, G. V. (2018). *Soymida febrifuga* aqueous root extract maneuvered silver nanoparticles as mercury nanosensor and potential microbicide. **World Scientific News**. 114: 84-105.

Sun, C., Yin, N., Wen, R., Liu, W., Jia, Y., Hu, L., Zhou, Q., and Jiang, G. (2016). Silver nanoparticles induced neurotoxicity through oxidative stress in rat cerebral astrocytes is distinct from the effects of silver ions. **Neurotoxicology**. 52: 210-221.

Sung, J. H., Ji, J. H., Park, J. D., Yoon, J. U., Kim, D. S., Jeon, K. S., Song, M. Y., Jeong, J., Han, B. S., and Han, J. H. (2008a). Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. **Toxicological Sciences**. 108(2): 452-461.

Sung, J. H., Ji, J. H., Yoon, J. U., Kim, D. S., Song, M. Y., Jeong, J., Han, B. S., Han, J. H., Chung, Y. H., and Kim, J. (2008b). Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. **Inhalation Toxicology**. 20(6): 567-574.

suriya, N., Promya, J., and Chitmanat, C. (2014). Effects of the *Spirulina platensis* and *Phyllanthusemblica* Linn. extract additional diets on the reproductive maturation of

- Lowland Frog (*Rana rugulosa* Wiegmann) and its tadpole development. **Khon Kaen University Research Journal**. 19(6): 753-762.
- Thomas, S., Nair, S. K., Jamal, E. M. A., Al-Harhi, S., Varma, M. R., and Anantharaman, M. (2008). Size-dependent surface plasmon resonance in silver silica nanocomposites. **Nanotechnology**. 19(7): 075710-07571017.
- Tolaymat, T. M., El Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., and Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. **Science of the Total Environment**. 408(5): 999-1006.
- Varner, K., Sanford, J., Venkatapathy, R., El-Badawy, A., and Feldhake, D. (2010). State of the science literature review: Everything nanosilver and more. **United States Environmental Protection Agency**. 363: 2363-2365.
- Wijaya, Y. N., Kim, J., Choi, W. M., Park, S. H., and Kim, M. H. (2017). A systematic study of triangular silver nanoplates: One-pot green synthesis, chemical stability, and sensing application. **Nanoscale**. 9(32): 11705-11712.
- Wijnhoven, S. W., Peijnenburg, W. J., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., and Van De Meent, D. (2009). Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**. 3(2): 109-138.
- Wongravee, K., Parnklang, T., Pienpinijtham, P., Lertvachirapaiboon, C., Ozaki, Y., Thammacharoen, C., and Ekgasit, S. (2013). Chemometric analysis of spectroscopic data

on shape evolution of silver nanoparticles induced by hydrogen peroxide. **Physical Chemistry Chemical Physics**. 15(12): 4183-4189.

Xiu, Z.-m., Zhang, Q.-b., Puppala, H. L., Colvin, V. L., and Alvarez, P. J. J. (2012). Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**. 12(8): 4271-4275.

Yan, A., and Chen, Z. (2019). Impacts of silver nanoparticles on plants: A focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**. 20(5): 1003-1024.

Zeb, A., and Ullah, F. (2016). A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. 2016.

Zhao, C. M., and Wang, W. X. (2011). Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 30(4): 885-892.





ภาควิชาเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. General chemicals and materials

Dipotassium hydrogen phosphate	VWR Chemicals BDH, Leuven, Belgium
Formaline	Vidhyasom Co., Ltd., Bangkok, Thailand
Nitric acid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Parafin	VWR Chemicals BDH, Leuven, Belgium
Polyethylene glycol (PEG-6000)	Bio Basic Inc.,
Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Potassium dihydrogen phosphate	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Silver nitrate	QRec, Auckland, New Zealand
Sodium hydroxide	MERCK, Darmstadt, Germany
Xylene	Amresco, Ohio, USA

2. Bacterial Culture Media

Mueller Hinton	Titan biotech Ltd, Rajasthan, India
Agar	Titan biotech Ltd, Rajasthan, India

3. Lipid peroxidation assay

Butylhydroxytoluene	Sigma-Aldrich, MO, USA
Trichloroacetic acid	VWR Chemicals BDH, Leuven, Belgium
Thiobarbituric acid	Sigma-Aldrich, MO, USA
Hydrochloric acid	RCI Labscan, Bangkok, Thailand

ภาคผนวก ข

Output of the research



Research Outcomes

Objectives	Outcomes
<p>1) เพื่อศึกษาผลของขนาด รูปร่าง และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อความเป็นพิษการเจริญและพัฒนาการของเอ็มบริโอของกบนา (<i>R. rugulosa</i>)</p>	<p>1) พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปทรงกลมขนาดเล็ก 5 นาโนเมตร มีผลให้เกิดการตายมากที่สุด และยับยั้งการเจริญและพัฒนาการของเอ็มบริโอของกบนา (<i>R. rugulosa</i>) มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคอื่นๆ</p>
<p>2) เพื่อศึกษาการสะสมของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเนื้อเยื่อของกบนา</p>	<p>2) พบว่าอนุภาคนาโนเงินรูปทรงกลมขนาดเล็กจะไปสะสมที่บริเวณเหงือกของเอ็มบริโอของกบนา และสะสมมากที่สุดที่ไขในท้องของกบนา ถัดมาเป็นกระเพาะอาหาร</p>
<p>3) เพื่อศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาระดับโมเลกุลภายในเซลล์ของกบนา</p>	<p>3) อนุภาคนาโนซิลเวอร์รูปทรงกลมขนาดเล็ก (5 นาโนเมตร) ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเอ็มบริโอมากที่สุดเมื่อเทียบกับอนุภาคขนาดอื่นๆ การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนไม่สามารถตรวจได้ จึงได้ทำการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลจาก synchrotron FT-IR พบว่ามีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตมากขึ้นในเอ็มบริโอที่ได้รับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ในขณะที่ปริมาณลิพิดลดลง</p>

<p>4) เพื่อศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ต่อการไปสะสมในไข่ของกบนา</p> <p>5) เพื่อศึกษาการกระจายตัวและการคงตัวของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากผลิตภัณฑ์การค้ำในน้ำ (โดยใช้ผงซักฟอกเป็นโมเดลในการศึกษา)</p>	<p>4) พบอนุภาคนาโนซิลเวอร์สะสมมากในไข่ในกบเทศเมีย ด้วยเหตุนี้ก็มีโอกาสที่จะส่งต่ออนุภาคนาโนซิลเวอร์นี้ไปให้รุ่นลูกได้</p> <p>5) อนุภาคนาโนเงินที่ได้จากผงซักฟอกการค้าไม่สามารถศึกษาการคงตัวได้ จึงได้ใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นผสมกับผงซักฟอก พบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์มีปริมาณลดลงตามระยะเวลา คาดว่าเกิดการแตกตัวเป็นไอออนและตกตะกอน</p>
<p>Presentation outcomes</p>	
<p>2016. Bamroongnok, K and Siri S. Effect of Different sizes of silver nanoparticles on mortality of common lowland frog embryos (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>). 2nd Internantional Conference on Advances in Chemical, Biological & Environmental Engineering (ACBEE-16). May 11-12, 2016. Singapore. (Oral presentation)</p> <p>2014. Bamroongnok, K and Siri S. Synthesis of silver nanoparticles from crude extraction of <i>Dendrolobium lanceolatum</i>. The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TBS2014). November 26-29, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. (Oral presentation)</p>	
<p>Publication outcomes</p>	
<p>2019. Bamroongnok K, Khamhaengpol A and Siri S*. Comparison of ethanolic extracts of phytoestrogenic <i>Dendrolobium lanceolatum</i> and non-phytoestrogenic <i>Raphanus sativus</i> to mediate green syntheses of silver nanoparticles. Chemical Report. 1: 43-50.</p> <p>20xx. Bamroongnok K and Siri S*. Effects of different shapes and sizes of silver nanoparticles on embryonic growth and development of common lowland frog. Under preparation.</p>	

ประวัตินักวิจัย

ผู้เสนอโครงการ

ชื่อ-สกุล นางสาว สีนีนานา สิริ (Miss Sineenat Siri)

สถานที่ทำงาน สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง

จ. นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-223305, 089-7119112 โทรสาร 044-224633

อีเมล: ssinee@sut.ac.th

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีววิทยา เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2536
M.Sc. (Biological Science, Emphasis Mol. Biol.)	U. of Southern Mississippi, USA	2540
Ph.D. (Cell Biology, Emphasis Mol. Biol.)	U. of Connecticut, USA	2546

ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ (2019-2015)

2019. Chumpol J and Siri S*. *In vivo* formation of spherical and rod lead nanoparticles in root cells of water velvet (*Azolla pinnata*). **Biotechnology and Applied Biochemistry**. <https://doi.org/10.1002/bab.1871>.
2019. Bamroongnok K, Khamhaengpol A and Siri S*. Comparison of ethanolic extracts of phytoestrogenic *Dendrolobium lanceolatum* and non-phytoestrogenic *Raphanus sativus* to mediate green syntheses of silver nanoparticles. **Chemical Report**. 1: 43-50.
2019. Phuruangrat, A., Siri, S., Wadbua, P., Thongtem, S., Thongtem, T. Microwave-assisted synthesis, photocatalysis and antibacterial activity of Ag nanoparticles supported on ZnO flowers. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. 126: 170-177.
2018. Sritong N, Chumsook S and Siri S*. Light emitting diode irradiation induced shape conversion of DNA-capped silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activities. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. 46: 955-963.
2018. Chumpol J and Siri S*. Simple green production of silver nanoparticles facilitated by bacterial genomic DNA and their antibacterial activity. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. 46(3): 619-625.
2018. Jaisabai W, Khamhaengpol A and Siri S*. Sericins of mulberry and non-mulberry silkworms for eco-friendly synthesis of silver nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. 46(3): 536-543.

2018. Janthima R, Khamhaengpol A and **Siri S***. Egg extract of apple snail for eco-friendly synthesis of small silver nanoparticles and their antibacterial activity. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. 46(2): 361-367.
2017. Khamhaengpol A and **Siri S***. Composite electrospun scaffold derived from recombinant fibroin of weaver ant (*Oecophylla smaragdina*) as cell-substratum. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 183(1): 110-125.
2017. Khamhaengpol A and **Siri S***. Green synthesis of silver nanoparticles using tissue extract of weaver ant larvae. **Materials Letters**. 192: 72-75.
2017. Busayapongchai P and **Siri S***. Sensitive detection of estradiol based on ligand binding domain of estrogen receptor and gold nanoparticles. **Analytical Biochemistry**. 518: 60-68.
2017. Busayapongchai P and **Siri S***. Estrogenic Receptor-Functionalized magnetite nanoparticles for rapid separation of phytoestrogens in plant extracts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 181:925-938.
2017. Busayapongchai P and **Siri S***. Simple assay for screening phytoestrogenic compounds using oestrogen receptor immobilized magnetite nanoparticles. **IET Nanobiotechnology**. 11(4): 395-402.
2016. Khamhaengpol A and **Siri S***. Fluorescent light mediated a green synthesis of silver nanoparticles using the protein extract of weaver ant larvae. **Journal of Phytochemistry and Phytobiology B: Biology**. 163: 337-344.
2016. Chumwangwapee S, Chingsongnoen A and **Siri S***. A Plasma modified cellulose-chitosan porous membrane allows efficient DNA binding and provides antibacterial properties: A step towards developing a new DNA collecting card. **Forensic Science International: Genetics**. 25: 19-25.
2016. Chumpol J and **Siri S***. Electrospun cellulose acetate membrane for size separating and antibacterial screening of crude polysaccharides. **IET Nanobiotechnology**. 10(6): 405-410.
2015. Chaisri P, Chingsungnoen A, **Siri S***. Repetitive Gly-Leu-Lys-Gly-Glu-Asn-Arg-Gly-Asp Peptide Derived from Collagen and Fibronectin for Improving Cell-Scaffold Interaction. **Apply Biochemistry and Biotechnology**. 175: 2489-2500.

ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล นางสาวคำจันทร์ บำรุงนอก (Miss Kamchan Bamroongnok)
 สถานที่ทำงาน สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง
 จ. นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 081-5444956 อีเมลล์: joykamacha@gmail.com

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม เกียรตินิยมอันดับสอง)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2553
---	--------------------	------

ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

2019. Bamroongnok K, Khamhaengpol A and **Siri S***. Comparison of ethanolic extracts of phytoestrogenic *Dendrolobium lanceolatum* and non-phytoestrogenic *Raphanus sativus* to mediate green syntheses of silver nanoparticles. **Chemical Report**. 1: 43-50.

การนำเสนอผลงานระดับนานาชาติ

2016. **Bamroongnok, K** and Siri S. Effect of Different sizes of silver nanoparticles on mortality of common lowland frog embryos (*Hoplobatrachus rugulosus*). 2nd International Conference on Advances in Chemical, Biological & Environmental Engineering (ACBEE-16). May 11-12, 2016. Singapore. (Oral presentation)
2014. **Bamroongnok, K** and Siri S. Synthesis of silver nanoparticles from crude extraction of *Dendrolobium lanceolatum*. The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TBS2014). November 26-29, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. (Oral presentation)