

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดที่เข้าไปในเซลล์มะเร็ง
ด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES)

ปริญญานิพนธ์
ของ
กมลวรรณ แสนบุญรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ตุลาคม 2546
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

547.05671

ก137 ก

จ.3

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดที่เข้าไปในเซลล์มะเร็ง
ด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES)

บทคัดย่อ

ของ

กมลวรรณ แสนบุญรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2546

2546

กมลวรรณ แสนบุญรัตน์. (2546). การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดที่เข้าไปในเซลล์มะเร็งด้วยเทคนิค *Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES)*. ปริญญาโท กศ.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.คณะกรรมการควบคุม : ดร. จินดา แต่มบรรจง, ดร. พรทิพา พิชชา, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศศิริ โรจนวิภาต

การวิเคราะห์ปริมาณโบรอนที่เข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) และอยู่นอกเซลล์วิเคราะห์โดยเทคนิคทาง ICP-AES สารประกอบโบรอนที่ใช้ศึกษาเป็นอนุพันธ์ของกรดไขมัน 6 ชนิด ได้แก่ ปาล์มิติล คาร์โบราเนต (palmityl carboranate) ปาล์มิโตเลิล คาร์โบราเนต (palmitoleyl carboranate) สเตียริล คาร์โบราเนต (stearyl carboranate) โอลิอิล คาร์โบราเนต (oleyl carboranate) อีไลดิล คาร์โบราเนต (elaidyl carboranate) และ อราซิล คาร์โบราเนต (arachyl carboranate) ในสารประกอบโบรอน 6 ชนิดข้างต้น สองชนิดคือ ปาล์มิติล คาร์โบราเนต และ อราซิล คาร์โบราเนต เป็นสารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่โดยดัดแปลงจากวิธีการสังเคราะห์ที่ใช้สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอีก 4 ชนิดที่เคยมีการสังเคราะห์มาแล้ว ร้อยละผลผลิตที่ได้เป็น 51.5 และ 60.5 ตามลำดับ ค่าความเป็นพิษ (IC_{50}) ต่อเซลล์มะเร็งชนิด HeLa cells ของ ปาล์มิติล คาร์โบราเนต และ อราซิล คาร์โบราเนต มีค่าเท่ากับ 43.0 และ 287.0 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย่อยสลายเซลล์ HeLa cell เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-AES โดยใช้ $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ และ $\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ พบว่าคู่กรดทั้งสองให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลล์ใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจาก HNO_3 มีราคาถูกกว่า ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ HNO_3 ในกระบวนการย่อยสลายเซลล์

จากการศึกษาการรับสารประกอบโบรอนของเซลล์มะเร็ง พบว่าสารประกอบโบรอนส่วนใหญ่ไม่เข้าไปในเซลล์มะเร็ง การไม่รับสารประกอบโบรอนของเซลล์มะเร็งนี้อาจเนื่องมาจากสมบัติการละลายน้ำของสารประกอบโบรอนซึ่งละลายได้น้อย นอกจากนี้ผลการศึกษาความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งทั้งในงานวิจัยนี้และจากที่เคยศึกษามาแล้วที่พบว่ามีความน้อยอาจมีสาเหตุมาจากสารที่ใส่เข้าไปไม่เข้าไปในเซลล์มะเร็งตามปริมาณที่กำหนด

THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF BORONATED FATTY ACID DERIVATIVES
CELLULAR UPTAKE INTO CANCEROUS CELLS BY INDUCTIVELY COUPLED
PLASMA-ATOMIC EMISSION SPECTROSCOPY TECHNIQUE (ICP-AES)

AN ABSTRACT

BY

KAMOLWAN SANBOONRAT

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

October 2003

Kamolwan Sanboonrat. (2003). *The Quantitative Analysis of Boronated Fatty Acid Derivatives Cellular Uptake into Cancerous Cells by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy Technique (ICP-AES)*. Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee :Dr. Chinda Tambunchong, Dr. Porntipa Picha, Assist. Prof. Kesseree Rochanavibhata.

The boron quantitative analysis of intra cellular and extra cellular uptake on HeLa cell was carried out using ICP-AES technique. Six boronated fatty acid derivatives, palmityl carboranate, palmitoleyl carboranate, stearyl carboranate, oleyl carboranate, elaidyl carboranate and arachyl carboranate were used for this study. Two of them, palmityl carboranate and arachyl carboranate were newly synthetic compounds. By modifying the synthetic process of the other four, the two new compounds were produced in 51.5 and 60.5 percent yields. The IC_{50} of the two new boronated compounds toward HeLa cells were 43.0 and 287.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

The efficiencies of $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ and $\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ in digesting the HeLa cell for ICP-AES determination were compared. There was no significant difference, but the cost of HNO_3 is cheaper, therefore $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ solution was used in the digestion process for ICP-AES.

From the boron uptake study, it was found that there was no significant cancerous cellular uptake of the boronated compounds, which may be due to the low water solubility of the boronated compounds. Furthermore, the low toxicity of the boronated compounds in this study and from the former study may be the result of the lower uptake of the compounds than the assigned amount, which was supposed to be completely absorbed by the cells.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดที่เข้าไปในเซลล์มะเร็ง
ด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES)

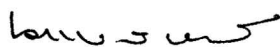
ของ

นางสาวกมลวรรณ แสนบุญรัตน์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. นภาพรณี หะวานนท์)

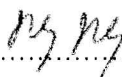
วันที่ 7 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2546

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์



.....ประธาน

(อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง)



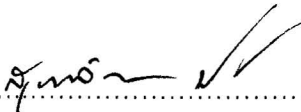
.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชชา)



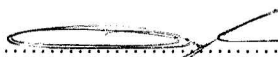
.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศสิริ ไรจนวิภาต)



.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสัททกุล)



.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. จินดา แต่มบวรจ ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา และ ผศ. เกศศิริ โรจนวิภาต กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา คำแนะนำ แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัย ตลอดจนการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล และ ผศ.ดร. อนันต์ พุทธิยา-สถาพร ที่ได้สละเวลาร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์และให้คำแนะนำต่าง ๆ ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ หน่วยงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง คุณสุซานุช อ่อนดี คุณจรัญญา งามขำ และเจ้าหน้าที่งานวิจัยสารบำบัดมะเร็งกลุ่มงานวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติทุกท่าน ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย ให้คำแนะนำ และถ่ายทอดเทคนิคการวิจัยด้านเซลล์มะเร็งและเตรียมเซลล์มะเร็งให้ใช้ตลอดการวิจัย

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่อง ICP-AES และอำนวยความสะดวกให้ตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี เพื่อน พี่ และ น้อง นิสิตปริญญาโททุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาดำรงดีตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กมลวรรณ แสสนบุญรัตน์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
3 วิธีดำเนินการวิจัย	32
การสังเคราะห์สารและการทดสอบความเป็นพิษของประกอบโบรอน	
อนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด	32
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง	
ด้วยเทคนิค ICP-AES เมื่อใช้กรดต่างชนิดกันในกระบวนการย่อยสลาย	
เซลล์มะเร็ง	36
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันที่เข้าไปใน	
เซลล์มะเร็งในเวลาต่าง ๆ กัน	38
4 ผลการวิจัย.....	42
การสังเคราะห์สารและการทดสอบความเป็นพิษของประกอบโบรอน	
อนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด	42
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง	
ด้วยเทคนิค ICP-AES เมื่อใช้กรดต่างชนิดกันในกระบวนการย่อยสลาย	
เซลล์มะเร็ง	45
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันที่เข้าไปใน	
เซลล์มะเร็งในเวลาต่าง ๆ กัน	46
5 สรุปผล อภิปราย.....	49

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	64
อภิธานศัพท์	135
ประวัติย่อผู้วิจัย	137

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนของเทคนิค ICP-AES, DCP-AES และ ICP-MS	7
2	ผลการทดสอบความเป็นพิษ (IC_{50}) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด	12
3	การสะสมโบรอนใน F98 glioma cell ของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine และน้ำตาลกลูโคส เปรียบเทียบกับ BSH	15
4	ผลการทดสอบความเป็นพิษ (IC_{50}) ของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine	17
5	ผลการทดสอบความเป็นพิษ (IC_{50}) ของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ spermine และ spermidine	25
6	ผลการทดสอบความเป็นพิษ (IC_{50}) ของ MACB	26
7	ปริมาณโบรอน ($\mu g/mL$) ใน B-16 cell และ TIG-1-20 cell ของ MACB เปรียบเทียบกับ BPA	26
8	ค่า IC_{50} ของ carboranic esters ต่อ HeLa cell	45
9	ผลการเปรียบเทียบปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของการย่อยสลายเซลล์มะเร็งระหว่าง HNO_3/H_2O_2 และ $HClO_4/H_2O_2$ ของ standard H_3BO_3 (for atomic absorption)	45
10	ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ palmityl carboranate (PT)	46
11	ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ palmitoleyl carboranate (PE)	46
12	ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ stearyl carboranate (SR)	47
13	ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ oleyl carboranate (OE)	47
14	ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ elaidyl carboranate (ED)	48
15	ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ arachyl carboranate (AR)	48
16	%growth ของ palmityl carboranate ต่อ HeLa cells	94
17	%growth ของ arachyl carboranate ต่อ HeLa cells	95

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างและสัญลักษณ์ของ carborane	3
2 โครงสร้างของ boronophenylalanine-fructose	8
3 สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ Gd-DTPA	8
4 โครงสร้างของ cerulenin	9
5 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมัน	10
6 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ cyanoborane	12
7 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine และน้ำตาลกลูโคส	13
8 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine	16
9 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ thymidine	18
10 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ deoxyuridine	18
11 โครงสร้างของ D-isomer และ L-isomer ของ <i>p</i> -BPA	19
12 โครงสร้างของสารประกอบ hydroxy BPA	20
13 โครงสร้างของ L- ¹⁰ B- <i>p</i> -boronophenylalanine-fructose	21
14 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ spermine และ spermidine	22
15 โครงสร้างของ MACB	25
16 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ nitroimidazole	27
17 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ azulene	28
18 การเปรียบเทียบค่า IC ₅₀ ของสารประกอบ PT, PE, SR, OE, ED และ AR ต่อ HeLa cell	56
19 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ <i>o</i> -carboranic acid (KBr)	65
20 ¹ H NMR สเปกตรัมของ <i>o</i> -carboranic acid (300 MHz ; CDCl ₃)	66
21 ¹³ C NMR สเปกตรัมของ <i>o</i> -carboranic acid (75 MHz ; CDCl ₃)	67
22 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ dried toluene (film)	68
23 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ <i>o</i> -carboranyl chloride (film)	69
24 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ palmityl alcohol (KBr)	70
25 ¹ H NMR สเปกตรัมของ palmityl alcohol (300 MHz ; CDCl ₃)	71

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
26 ^{13}C NMR , DEPT90 และ DEPT135 สเปกตรัมของ palmityl alcohol (75 MHz ; CDCl_3)	72
27 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ palmityl carboranate (film)	73
28 ^1H NMR สเปกตรัมของ palmityl carboranate (300 MHz ; CDCl_3)	74
29 ขยายสัญญาณ ^1H NMR สเปกตรัมของ palmityl carboranate.....	75
30 ^{13}C NMR , DEPT90 และ DEPT135 สเปกตรัมของ palmityl carboranate (75 MHz ; CDCl_3)	76
31 ขยายสัญญาณ ^{13}C NMR สเปกตรัมของ palmityl carboranate	77
32 COSY สเปกตรัมของ palmityl carboranate (300 MHz ; CDCl_3).....	78
33 HMBC สเปกตรัมของ palmityl carboranate (300 MHz ; CDCl_3)	79
34 HMQC สเปกตรัมของ palmityl carboranate (300 MHz ; CDCl_3)	80
35 GC - MS สเปกตรัมของ palmityl carboranate.....	81
36 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ arachyl alcohol (KBr)	82
37 ^1H NMR สเปกตรัมของ arachyl alcohol (300 MHz ; CDCl_3)	83
38 ^{13}C NMR , DEPT90 และ DEPT135 สเปกตรัมของ arachyl alcohol (75 MHz ; CDCl_3)	84
39 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ arachyl carboranate (KBr)	85
40 ^1H NMR สเปกตรัมของ arachyl carboranate (300 MHz ; CDCl_3)	86
41 ขยายสัญญาณ ^1H NMR สเปกตรัมของ arachyl carboranate	87
42 ^{13}C NMR , DEPT90 และ DEPT135 สเปกตรัมของ arachyl carboranate (75 MHz ; CDCl_3).....	88
43 ขยายสัญญาณ ^{13}C NMR สเปกตรัมของ arachyl carboranate	89
44 COSY สเปกตรัมของ arachyl carboranate (300 MHz ; CDCl_3)	90
45 HMBC สเปกตรัมของ arachyl carboranate (300 MHz ; CDCl_3)	91
46 HMQC สเปกตรัมของ arachyl carboranate (300 MHz ; CDCl_3)	92
47 GC - MS สเปกตรัมของ arachyl carboranate	93

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
48 IC ₅₀ ของ palmityl carboranate ต่อ HeLa cells	94
49 IC ₅₀ ของ arachyl carboranatachyl carboranat	95
50 ลักษณะ HeLa cells (ที่เป็น negative control)	96
51 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ palmityl carboranate ต่อ HeLa cells ที่ ความเข้มข้น 43.0 µg/mL	96
52 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ arachyl carboranate ต่อ HeLa cells ที่ ความเข้มข้น 287.0 µg/mL	97
53 กราฟมาตรฐานของ standard H ₃ BO ₃ เมื่อย่อยสลายด้วยกรด HNO ₃ /H ₂ O ₂	98
54 กราฟมาตรฐานของ standard H ₃ BO ₃ เมื่อย่อยสลายด้วยกรด HClO ₄ /H ₂ O ₂	98
55 กราฟมาตรฐานของ standard H ₃ BO ₃	99

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การรักษาโดยการจับนิวตรอน (Neutron Capture Therapy ; NCT) เป็นการรักษามะเร็ง โดยอาศัยปฏิกิริยานิวเคลียร์ระหว่างนิวตรอนพลังงานต่ำกับนิวไคลด์ (nuclide) ที่สามารถจับนิวตรอน แล้วให้อนุภาคแอลฟาและพลังงานมากพอที่จะทำลายเซลล์มะเร็งได้ นิวไคลด์ที่เหมาะสม คือ โบรอน-10 การรักษาโดยการจับนิวตรอนที่ใช้โบรอน-10 เรียกว่า Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) โดยเมื่อโบรอน-10 ถูกฉายด้วยนิวตรอนพลังงานต่ำจะทำปฏิกิริยาเกิดการแตกตัวให้อนุภาคแอลฟา (α) และ ลิเทียม (${}^7\text{Li}$) (Barth, Soloway and Fairchild. 1990 : 1061-1071) ดังสมการเคมี



อนุภาคแอลฟาที่เกิดขึ้นสามารถทำลายเซลล์ที่อยู่บริเวณนั้นได้ เหตุผลที่ใช้โบรอน-10 เป็นสารดูดกลืนนิวตรอนพลังงานต่ำในกระบวนการนี้ คือ

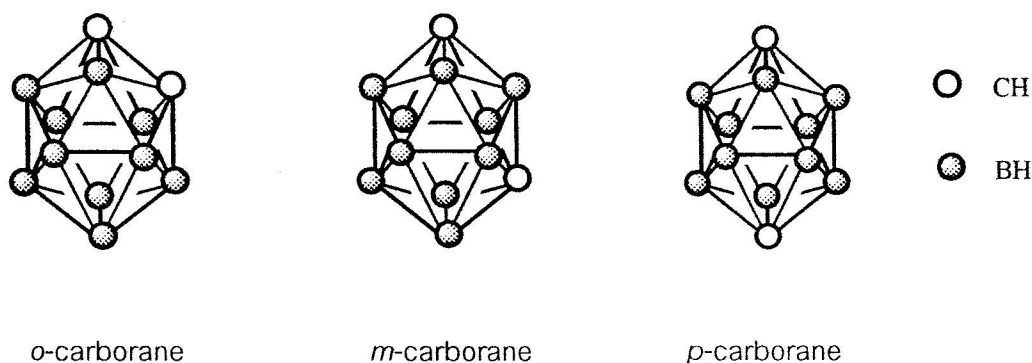
1. โบรอน-10 ไม่ใช่สารกัมมันตรังสี
2. อนุภาคที่ปล่อยออกมาจากปฏิกิริยานี้ [${}^{10}\text{B}(\text{n}, \alpha) {}^7\text{Li}$] มี Linear Energy Transfer (LET) สูง
3. อนุภาคแอลฟาที่เกิดขึ้นมีรัศมีประมาณ 10-14 ไมโครเมตร ดังนั้นอำนาจในการทำลายเซลล์จะอยู่ในบริเวณจำกัด ถ้าโบรอน-10 ไปสะสมอยู่ในเซลล์มะเร็งมากพอก็สามารถทำลายเซลล์มะเร็งนั้นได้และยังสามารถลดผลกระทบที่เกิดจากการทำลายเซลล์ปกติได้อีกด้วย
4. โบรอนสามารถรวมตัวกับสารอื่น ๆ ที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน ได้เป็นสารประกอบโบรอนหลายชนิดที่สามารถเลือกใช้ในการสะสมโบรอนไปสู่เซลล์มะเร็งที่ต้องการในบริเวณต่าง ๆ กันได้

ในระยะแรกของการใช้วิธี BNCT รักษา มะเร็งในคน จะเป็นการรักษา มะเร็งที่สมองมากกว่าบริเวณอื่นเนื่องจากมะเร็งบริเวณนี้มีการแพร่กระจายน้อย สารประกอบโบรอนที่ใช้ คือ sodium borate (borax; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ และ pentaborate; $\text{NaB}_5\text{O}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) boric acid และอนุพันธ์ของ boric acid แต่ผลการทดลองล้มเหลวเพราะผู้ป่วยได้เสียชีวิตลงเนื่องจากสารประกอบดังกล่าวขาดความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง (Sweet, et al. 1952 : 200-209) ต่อมาจึงได้มีการปรับปรุงใช้ sodium mercaptoundecahydrododecaborate ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$; BSH) ในการรักษา มะเร็งสมอง พบว่า BSH มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูง ทำให้การรักษาด้วยวิธี

BNCT มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากรักษามะเร็งที่สมองแล้ว วิธี BNCT ได้มีการนำมาใช้ในการรักษามะเร็งผิวหนัง และให้ผลเป็นที่น่าพอใจทั้งการศึกษาในระดับ *in vitro* และ ระดับ *in vivo* ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการสังเคราะห์สารประกอบโบรอน เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT อย่างกว้างขวาง โดยเป็นการพัฒนาสารประกอบเพื่อใช้รักษามะเร็งที่บริเวณต่าง ๆ ไม่เฉพาะมะเร็งที่สมองและผิวหนังเท่านั้น ซึ่งการรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT จะมีประสิทธิภาพสูงสุดขึ้นอยู่กับปริมาณโบรอน-10 ที่เข้าไปสะสมอยู่ในเซลล์มะเร็งนั้นมีปริมาณเพียงพอ เพื่อให้การทำลายเซลล์มะเร็งนั้นมีผลกระทบต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด ควรมีโบรอน-10 อยู่ในเซลล์มะเร็ง 15-30 ไมโครกรัม โบรอน-10 ต่อกรัมของเซลล์มะเร็ง และอยู่ในเซลล์ปกติต่ำกว่า 5 ไมโครกรัมโบรอน-10 ต่อกรัมของเซลล์ปกติ (Soloway, et al. 1998 : 1515-1562)

การนำโบรอน-10 เข้าสู่ร่างกายเพื่อเข้าไปสู่เซลล์มะเร็งที่ต้องการที่บริเวณต่าง ๆ นั้นวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้คือ สังเคราะห์สารประกอบโบรอนให้เป็นอนุพันธ์ของสารชีวโมเลกุล ที่ร่างกายยอมรับได้ และเป็นสารที่เซลล์มะเร็งต้องการใช้ในการเจริญเติบโต เช่น สังเคราะห์สารประกอบโบรอนให้เป็นอนุพันธ์ของ amino acid (Coderre, et al. 1990 : 138-141 และ Nemoto, et al. 1995 : 1673-1678) อนุพันธ์ของ nucleic acid (Sood, et al. 1989 : 9234-9235) เป็นต้น

Carborane (dicarba-closo-dodecaborane; $C_2B_{10}H_{12}$) โครงสร้างดังภาพประกอบ 1 เป็นสารประกอบโบรอนที่มีรูปร่างทรงกลม มีสมบัติทนต่อความร้อน มีความไม่ชอบน้ำสูง และโดยทั่วไปไม่ว่องไวต่อสภาวะภายในร่างกาย (Bregardze, et al. 1992 : 209-223) carborane 1 โมเลกุลมีโบรอนถึง 10 อะตอม ดังนั้น carborane จึงเป็นแหล่งของโบรอนที่ดี จึงมีผู้นิยมนำ carborane มาสังเคราะห์ให้เป็นอนุพันธ์ของสารต่าง ๆ เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งโดยวิธี BNCT อย่างกว้างขวาง เช่น สังเคราะห์สารประกอบ carborane ให้เป็นอนุพันธ์ของ amino acid (Zhuo, et al. 1999 : 1282-1292) อนุพันธ์ของ nucleic acid (Tjarks, et al. 1992 : 1628-1633, Yamamoto, et al. 1992 : 157-158 และ Lunato, et al. 1999 : 3378-3389) อนุพันธ์ของ aziridine (Yamamoto and Nakamura. 1993 : 2232-2234) อนุพันธ์ของ nitroimidazole (Scobie and Threadgill. 1994 : 2059-2063) อนุพันธ์ของ azulene (Nakamura, Sekido and Yamamoto. 1997 : 2825-2830) อนุพันธ์ของ aldehydes และ ketones (Nakamura, Aoyagi and Yamamoto. 1998 : 1167-1171) เป็นต้น



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างและสัญลักษณ์ของ carborane

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในคนพบว่าเซลล์มะเร็งเกือบทุกชนิดจะมีการใช้ และสังเคราะห์กรดไขมันในปริมาณที่สูง เพื่อใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต (Pizer, et al. 1996 : 745-751) ดังนั้นจึงได้มีการสังเคราะห์สารประกอบโบรอนให้เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดและพัฒนาสารประกอบชนิดนี้เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งเฉพาะที่ เช่น ในการรักษามะเร็งที่ปากมดลูก จากการศึกษาพบว่าที่บริเวณปากมดลูกมี low density lipoprotein (LDL) ในปริมาณมาก จึงได้มีการสังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดให้ไปรวมตัวกับ LDL พบว่าสารประกอบสามารถรวมตัวกับ LDL ได้ โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของ LDL และ โครงสร้างของสารประกอบโบรอนนั้น (หทัยชนก ศรีใส. 2539 : 29-38) ต่อมาได้มีการพัฒนาการสังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด และนำไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (ฉลอง หุ่มหุ่ม. 2543 : 43-52) พบว่า สารประกอบโบรอนที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีความเป็นพิษต่ำกว่าสารประกอบโบรอนที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเมื่อจำนวนคาร์บอนในกรดไขมันเท่ากัน และ สารประกอบที่กรดไขมันมีจำนวนคาร์บอนเท่ากันและมีโครงสร้างเป็น cis-isomer มีแนวโน้มที่จะเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็น trans-isomer ความเป็นพิษต่ำของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันอาจเป็นเหตุจากโครงสร้างของสารเองหรืออาจเนื่องมาจากเซลล์มะเร็งไม่ได้รับสารตามปริมาณที่กำหนด

ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาสาเหตุดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนที่เข้าไปในเซลล์มะเร็งของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด ซึ่งการตรวจวัดปริมาณโบรอนจะใช้เทคนิค Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำสารประกอบนี้ไปใช้รักษามะเร็งโดยวิธี BNCT ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเตรียมสารและศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็งโดยเทคนิค ICP-AES เมื่อใช้กรดต่างชนิดกันในการย่อยสลายเซลล์มะเร็ง
3. เพื่อหาปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดที่เข้าไปในเซลล์มะเร็งในเวลาต่าง ๆ กัน โดยเทคนิค ICP-AES

ขอบเขตของการวิจัย

1. เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell)
2. วิธีการหาปริมาณโปรตีนใช้วิธีของโอยามาและอีเกิล (Oyama and Eagle. 1956 : 305-307) ร่วมกับวิธีคัลเลอรีเมตรีของเลารี (Lowry, et al. 1951 : 265-275)
3. กรดที่ใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง คือ perchloric acid (HClO_4) และ nitric acid (HNO_3)
4. สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันที่ใช้ทดสอบ ได้แก่
 - 3.1 palmitoleyl carboranate
 - 3.2 stearyl carboranate
 - 3.3 elaidyl carboranate
 - 3.4 oleyl carboranate
 - 3.5 palmityl carboranate
 - 3.6 arachyl carboranate

โดยสาร 3.1-3.4 ได้จากการสังเคราะห์ของ ฉลอง พุ่มพุ่ม ส่วนสาร 3.5 และ 3.6 สังเคราะห์ขึ้นใหม่โดยดัดแปลงจากวิธีของ ฉลอง พุ่มพุ่ม

5. ตรวจวัดปริมาณโบรอนด้วยเทคนิค ICP-AES โดยใช้ความยาวคลื่น 249.778 นาโนเมตร โดยใช้สภาวะ ดังนี้

RF Power	1.2	kW
Plasma Ar Flow	15.0	L/min
Auxiliary Ar Flow	0.5	L/min
Nebulizer Ar Flow	1.0	L/min
Viewing Height	15.0	mm above load coil

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โบรอนเป็นธาตุที่ไม่พบอยู่ในรูปอิสระในธรรมชาติ มักพบอยู่ในรูปของสารประกอบและสามารถนำมาสังเคราะห์เป็นสารประกอบได้มากมาย โบรอนพบได้ทั้งในพืช สัตว์ โลหะ และสินแร่ต่าง ๆ วิธีการหาปริมาณโบรอนมีหลายวิธี เช่น วิธีทาง emission spectrometry, colorimetry, titrimetric method, neutron absorption, polarography เป็นต้น ซึ่งจะเลือกใช้วิธีใดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของตัวอย่างที่มีโบรอนอยู่ โดยทั่วไปการหาปริมาณโบรอนในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตนิยมใช้วิธีทาง colorimetry และ emission spectrometry (Foster and Clifford. 1968 : 384-418) วิธีทาง colorimetry เป็นการหาปริมาณโบรอน โดยอาศัยการสร้างพันธะของโบรอนกับสารอินทรีย์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีสีต่าง ๆ ส่วนวิธีทาง emission spectrometry เป็นการหาปริมาณโบรอนโดยอาศัยการไอออไนส์ของโบรอนซึ่งจะเปล่งแสงที่มีลักษณะเฉพาะออกมา เทคนิคที่ใช้กันมากคือ Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) และ Direct Current Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (DCP-AES) นอกจากนี้ยังนิยมใช้เทคนิค Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry เพื่อหาปริมาณโบรอนในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตอีกด้วย

การหาปริมาณโบรอนในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตสามารถใช้ได้ทั้งสองวิธีแต่โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทาง emission spectrometry มากกว่า เนื่องจากเป็นวิธีที่เร็ว และมีสิ่งรบกวนน้อยกว่าวิธีทาง colorimetry ดังงานวิจัยของ ทามัทและมัวร์ (Tamat and Moore. 1987 : 2161-2164) ที่ได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหาปริมาณโบรอนในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตด้วยเทคนิค ICP-AES และ วิธีทางcolorimetry ในส่วนการทดลองด้านเทคนิค ICP-AES ทำโดยนำเนื้อเยื่อในหลาย ๆ อวัยวะของหนูทดลองมาเติมโบรอนลงไป แล้วทำการย่อยสลายเนื้อเยื่อด้วย HClO_4 และ H_2O_2 ทำการตรวจวัดปริมาณโบรอนโดยใช้ ICP-AES ที่ความยาวคลื่น 249.678 นาโนเมตร พบว่าค่า percent recovery ของโบรอนที่เติมลงไปสูงมาก โดยเฉลี่ยคือ 99.4% ส่วนวิธีทาง colorimetry ใช้วิธี methylene blue complexation ซึ่งเป็นการทำให้เกิดสารเชิงซ้อนระหว่างโบรอนกับ methylene blue การทดลองทำโดยเตรียมเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของหนูมาย่อยสลายด้วย H_2SO_4 , H_2O_2 และ HF แล้วนำสารละลายทั้งหมด มาสกัดในกรวยแยกด้วยสารละลาย Na_2CO_3 และ methylene blue ใน 1,2-dichloroethane ได้สารเชิงซ้อนของโบรอนกับ methylene blue จากนั้นนำชั้นของ 1,2-dichloroethane มาเติมสารละลาย AgNO_3 แล้วนำ

สารละลายไปวัดปริมาณโบรอน พบว่าวิธี ICP-AES มี percent recovery ของโบรอนที่เติมลงไปสูงกว่าวิธี methylene blue complexation และในการย่อยสลายด้วย hydrofluoric acid ต้องใช้เวลานาน นอกจากนี้ ช่วงของการวัดปริมาณโบรอนด้วยเทคนิค ICP-AES วัดได้ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05-100 µg/mL ซึ่งกว้างกว่าวิธี methylene blue complexation ที่วัดได้ถึงความเข้มข้นเพียง 4 µg/mL ดังนั้น การย่อยสลายเนื้อเยื่อด้วย HClO₄/H₂O₂ และวัดปริมาณโบรอนด้วยเทคนิค ICP-AES น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมในการหาปริมาณโบรอนในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต

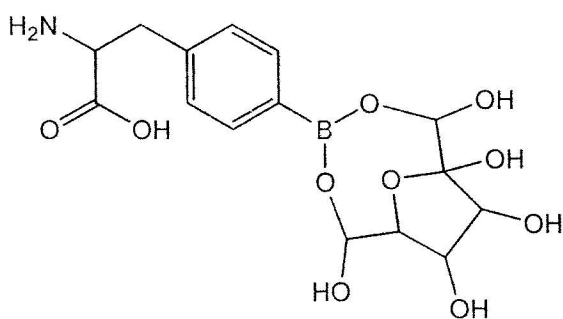
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหาปริมาณโบรอนของเทคนิคที่ใช้กันมาก คือ ICP-AES, DCP-AES และ ICP-MS (Zeev, B. A. 1994 : 217-254) ได้ผลดังตาราง 1

ตาราง 1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนของเทคนิค ICP-AES, DCP-AES และ ICP-MS

เทคนิค	ประสิทธิภาพ	ผลจาก matrix	ราคา
ICP-AES	++	+	++
DCP-AES	++	++	++
ICP-MS	+++	++	+++

+ ต่ำ, ++ ปานกลาง, +++ สูงมาก

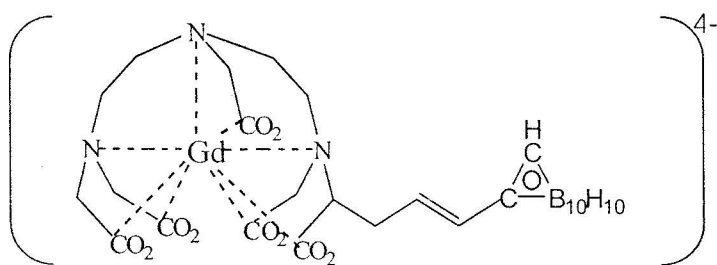
จะเห็นได้ว่าเทคนิค ICP-AES และ ICP-MS มีความเหมาะสมในการหาปริมาณโบรอนมากกว่าเทคนิค DCP-AES ลาอักไซ และคณะ (Laakso, et al. 2000 : 63-64) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการหาปริมาณโบรอนระหว่างเทคนิค ICP-AES และ ICP-MS ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งชนิด glioblastoma จำนวน 10 ราย ซึ่งรักษาด้วยวิธี BNCT โดยใช้สารประกอบ BPA-fructose (โครงสร้างดังภาพประกอบ 2) เป็นแหล่งของโบรอน พบว่า ทั้งสองวิธีสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโบรอนได้ดีไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 0.99 แต่เทคนิค ICP-MS เป็นเทคนิคที่มีราคาแพงมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็งจะใช้เทคนิค ICP-AES เนื่องจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของ boronophenylalanine-fructose

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณโบรอนโดยใช้เทคนิค ICP-AES อีก ได้แก่ โจนส์ (Jones. 1982 : 781-785) วิเคราะห์การหาปริมาณธาตุ 9 ชนิด ได้แก่ B Ca Cu Fe K Mg Mn P และ Zn จากปุ๋ยมาตรฐานยี่ห้อ 34 Magruder 17 ตัวอย่าง โดยใช้ ICP-AES ซึ่งทำการทดลองเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของธาตุแต่ละธาตุในปุ๋ยมาตรฐานที่ทราบค่าอยู่แล้ว โดยนำปุ๋ยตัวอย่างมาย่อยสลายด้วย HNO_3 และ HCl แล้วนำไปวัดปริมาณธาตุแต่ละชนิดพบว่า การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุโดยใช้ ICP-AES สามารถวิเคราะห์หาความเข้มข้นได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของปุ๋ยมาตรฐานที่ทราบค่าอยู่แล้วโดยมีค่า percent recovery สูง ดังนั้นการหาปริมาณธาตุด้วย ICP-AES เป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง

นากามูระ และคณะ (Nakamura, et al. 2000 : 125-126) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ gadolinium-diethylenetriaminepentaacetate (Gd-DTPA) (ดังภาพประกอบ 3) เมื่อนำมาทดสอบการสะสมของโบรอนในเซลล์มะเร็งบอง โดยการฉีดสารประกอบนี้เข้าไปในตัวแทนทดลองทิ้งไว้เป็นเวลา 5 20 และ 60 นาที จากนั้น ส่าหนูและนำ เลือด ไต สมอง ตับ และเซลล์มะเร็งบอง มาย่อยสลายด้วย $\text{HClO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$ (อัตราส่วน 1 : 2) ที่อุณหภูมิประมาณ 70°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองและนำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณโบรอนโดยใช้ ICP-AES พบว่า โบรอนจะไปสะสมอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อปกติคือ เลือด ไต และ ตับได้มากแต่ไปสะสมในเซลล์มะเร็งบองและเนื้อเยื่อสมองได้น้อยมาก

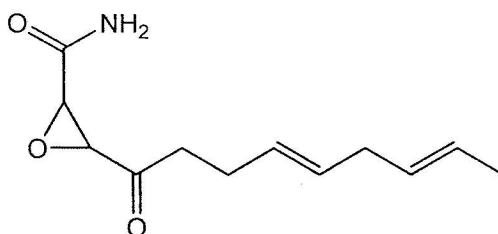


ภาพประกอบ 3 สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ Gd-DTPA

โยชิเดะ และคณะ (Yoshida, et al. 2000 : 57-58) ศึกษาเปรียบเทียบการสะสมโบรอนของ BSH และ BPA ในเซลล์มะเร็ง 4 ตัวอย่าง คือ V79 SCCVII C6 และ U-87 cell line โดยใช้ความเข้มข้นของแต่ละสาร $60 \mu\text{g}^{10}\text{B/mL}$ บ่มกับเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาย่อยสลาย ด้วย HNO_3 และวัดปริมาณโบรอนด้วย ICP-AES พบว่า BPA มีการสะสมของโบรอนในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมากกว่า BSH 2-3 เท่า

สารประกอบที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน

ฟูนาบาชิ และคณะ (Funabashi, et al. 1989 : 751-755) ศึกษา binding site ของ cerulenin [(2R,3S)-2,3-epoxy-4-oxo-7,10-trans,trans-dodecadienamide] (โครงสร้างดังภาพประกอบ 4) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน พบว่า cerulenin ใช้คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในวง epoxide เข้าไปจับกับหมู่ SH ของกรดอะมิโน cysteine ของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้างกรดไขมัน (fatty acid synthetase; FAS) โดย cerulenin 3 โมล จับกับเอนไซม์ 1 โมล ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสีย activity ไป



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของ cerulenin

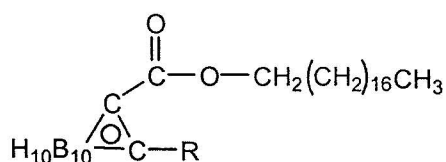
ไพเซอร์ และคณะ (Pizer, et al. 1996 : 745-751) ศึกษาการสังเคราะห์ กรดไขมันของเซลล์มะเร็งในคนพบว่า เซลล์มะเร็งมีการสังเคราะห์และใช้กรดไขมันในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์ปกติ เพื่อนำไปใช้ในการสร้าง phospholipid membrane สำหรับการเจริญเติบโตและได้ทำการทดสอบการใช้ cerulenin ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL60 cell) พบว่า เซลล์มะเร็งมีการสังเคราะห์กรดไขมันน้อยลงส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตลดลงไปด้วย

สารประกอบโบรอนที่ใช้ในกระบวนการ BNCT

สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมัน

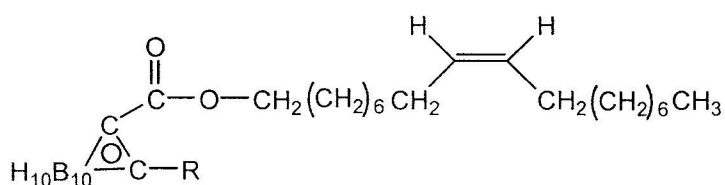
หทัยชนก ศรีใส (2539) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมัน 3 ชนิด คือ stearyl methylcarboranate (SCC) oleyl methylcarboranate (OCC) และ elaidyl methylcarboranate (ECC) โดยใช้ methyl-o-carboranic acid ทำปฏิกิริยากับ PCl_5 และ fatty alcohol (โครงสร้างดังภาพประกอบ 5) เมื่อนำไปทดสอบการรวมตัวกับ low-density lipoprotein (LDL) พบว่า SCC สามารถรวมตัวกับ LDL ได้ดีที่สุด โดยมีอัตราส่วนของ LDL : โบรอน เป็น 1.0 : 2.0 รองลงมาคือ ECC มีอัตราส่วนของ LDL : โบรอน เป็น 1.0 : 1.6 และ OCC มีอัตราส่วนของ LDL : โบรอน เป็น 1.0 : 1.4

ฉลอง ทุ่มพุ่ม (2543) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมัน 6 ชนิด ได้แก่ stearyl carboranate (SR) oleyl carboranate (OE) elaidyl carboranate (ED) palmitoleyl carboranate (PE) linoleyl carboranate (LE) และ linoelaidyl carboranate (LNE) โดยใช้ o-carboranic acid ทำปฏิกิริยากับ PCl_5 และ fatty alcohol (โครงสร้างดังภาพประกอบ 5) เมื่อนำสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) ในหลอดทดลองผลดังตาราง 2 พบว่า PE ยับยั้งการเจริญเติบโตของ HeLa cell ได้มากที่สุด ส่วน SR ยับยั้งการเจริญเติบโตได้น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้พบว่า สารประกอบ *cis*-isomer มีแนวโน้มในการยับยั้ง HeLa cell ได้มากกว่าสารประกอบ *trans*-isomer



R = CH_3 stearyl methylcarboranate (SCC)

R = H stearyl carboranate (SR)

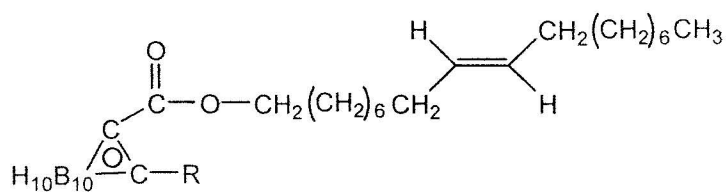


R = CH_3 oleyl methylcarboranate (OCC)

R = H oleyl carboranate (OE)

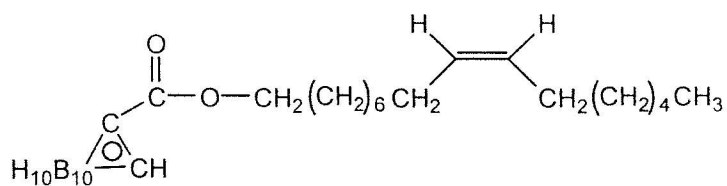
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมัน

ภาพประกอบ 5 (ต่อ)

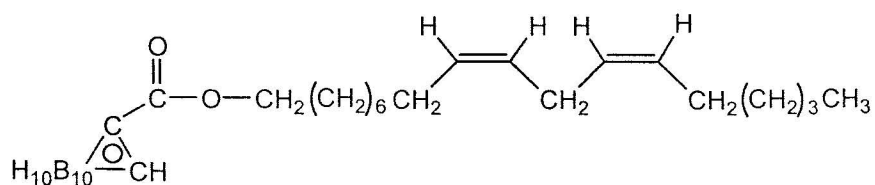


R = CH₃ elaidyl methylcarboranate (ECC)

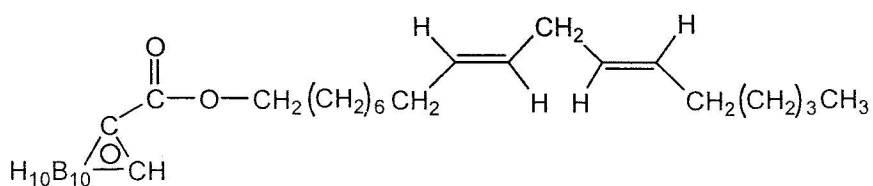
R = H elaidyl carboranate (ED)



palmitoleyl carboranate (PE)



linoleyl carboranate (LE)



linoelaidyl carboranate (LNE)

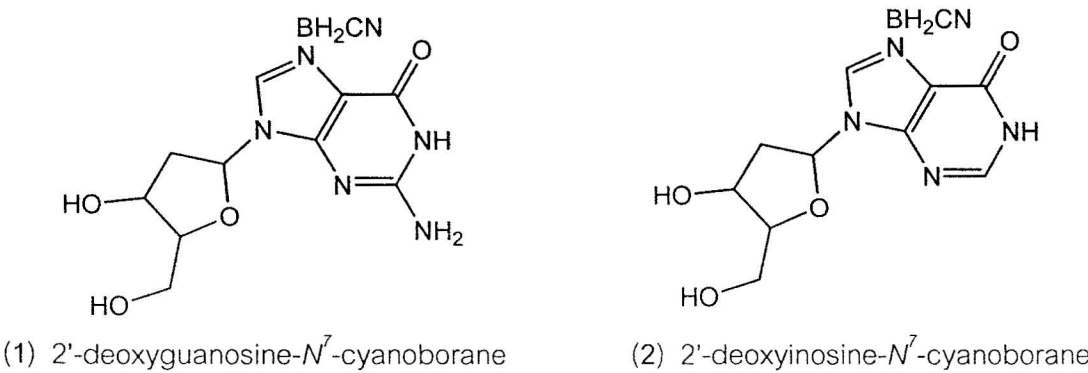
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมัน

ตาราง 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (IC₅₀) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด

สารประกอบ	IC ₅₀ (µg/mL)
SR	83.1
OE	64.5
ED	63.5
PE	36.7
LE	45.3
LNE	56.5

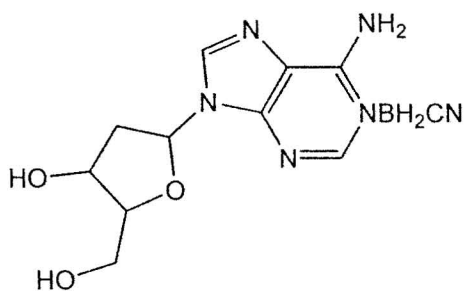
สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดนิวคลีอิก

ชุด สเพียลไวเกล และ ชอว์ (Sood, Spielvogel and Shaw. 1989 : 9234-9235) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ cyanoborane 4 ชนิด (โครงสร้างดังภาพประกอบ 6) รวมถึงศึกษาสมบัติของสารประกอบชนิดนี้พบว่า สารประกอบดังกล่าวมีความเสถียรในน้ำและเป็นสารต้านมะเร็งที่ดี จึงน่าจะเป็นสารประกอบที่ใช้สำหรับวิธี BNCT ได้

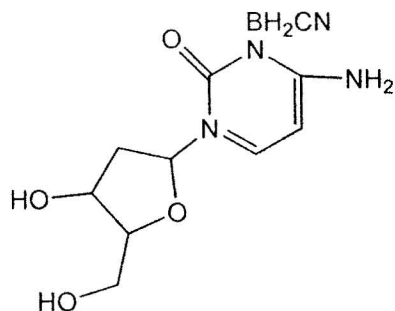


ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ cyanoborane

ภาพประกอบ 6 (ต่อ)



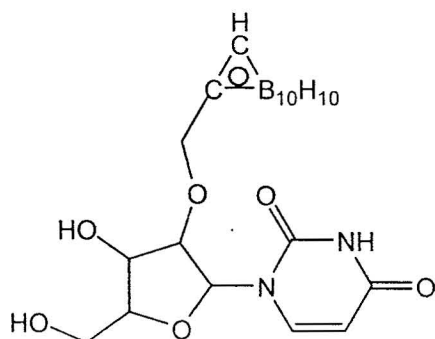
(3) 2'-deoxyadenosine- N^1 -cyanoborane



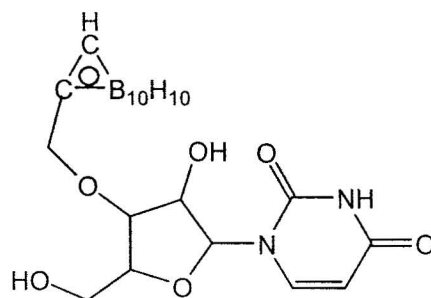
(4) 2'-deoxycytidine- N^3 -cyanoborane

ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ cyanoborane

จาร์ค และคณะ (Tjarks, et al. 1992 : 1628-1633) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine 4 ชนิด โครงสร้างดังภาพประกอบ 7 โดยสารประกอบ (5) (6) และ (7) มีโครงสร้างของ carboranyl cage เป็นแบบ *closo*-structure ส่วนสารประกอบ (9) เป็นแบบ *nido*-structure และได้สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสอีก 1 ชนิด (8)



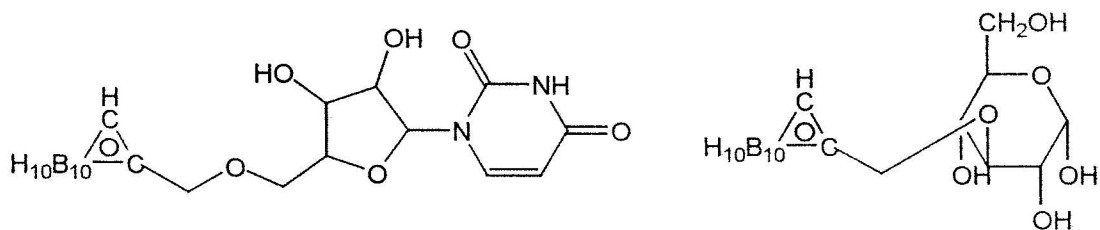
(5) 2'-O-(*o*-carboran-1-ylmethyl)uridine



(6) 3'-O-(*o*-carboran-1-ylmethyl)uridine

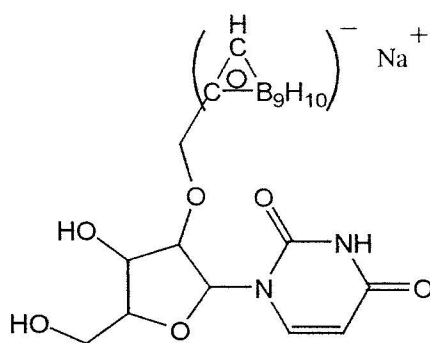
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine และ น้ำตาลกลูโคส

ภาพประกอบ 7 (ต่อ)



(7) 5'-O-(o-carboran-1-ylmethyl) uridine

(8) 3'-O-(o-carboran-1-ylmethyl)-D-glucose



(9) sodium 7-(uridine-2'-ylmethyl)dodecahydro-7,8-dicarba-*nido*-undecaborate

ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine และ น้ำตาลกลูโคส

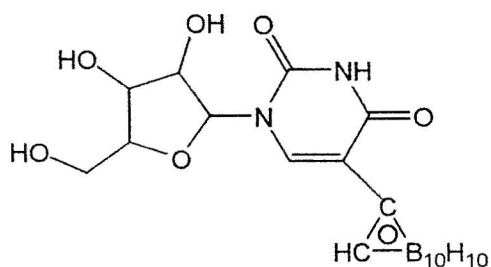
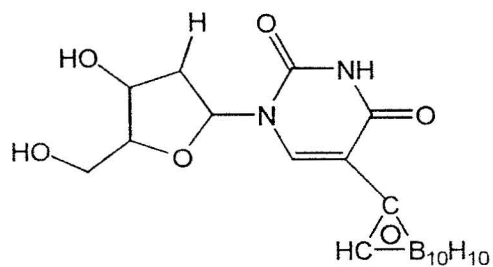
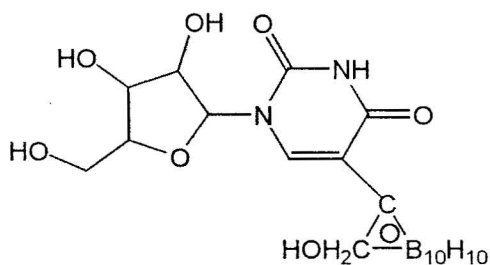
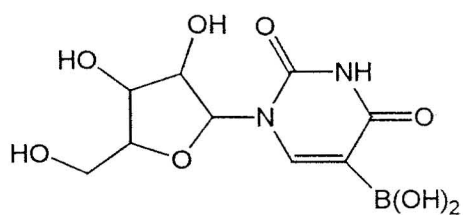
เมื่อนำสารประกอบทั้ง 5 ตัวอย่าง ไปศึกษาการสะสมของโบรอนที่เซลล์มะเร็งเส้นประสาท (F98 glioma cell) ของหนูทดลอง โดยนำสารประกอบที่ต้องการทดสอบใส่ไว้ในเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO₂ แล้วทำการตรวจวัดหาปริมาณโบรอน ทำการทดลองเปรียบเทียบกับ sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH) ที่ใช้ในการรักษามะเร็งสมองในญี่ปุ่นได้ผลดังตาราง 3

ตาราง 3 การสะสมโบรอนใน F98 glioma cell ของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine และ น้ำตาลกลูโคส เปรียบเทียบกับ BSH

สารประกอบ โบรอน	ปริมาณโบรอนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ เวลา 0 ชั่วโมง (μg)	การสะสมของโบรอนที่เวลา 16 ชั่วโมง (μg ของ B/g ของ cells)
(5)	202.5	103.5 ± 2.9
(6)	202.5	96.2 ± 5.4
(7)	202.5	83.8 ± 5.1
(8)	202.5	65.2 ± 2.1
(9)	202.5	1.5 ± 0.2
BSH	202.5	2.0 ± 0.3
BSH	2025.0	9.8 ± 0.3

พบว่าสารประกอบ (5) (6) และ (7) ซึ่งมีโครงสร้างของ carboranyl cage เป็น *closo-structure* มีโบรอนสะสมอยู่ในเซลล์มะเร็งในปริมาณที่สูงกว่าสารประกอบ (9) ซึ่งมีโครงสร้างแบบ *nido-structure* ส่วนสารประกอบ (8) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสก็สะสมในเซลล์มะเร็งได้มากแต่ก็น้อยกว่า สารประกอบ (5) (6) และ (7) เมื่อเปรียบเทียบกับ BSH พบว่า สารประกอบที่สังเคราะห์ได้มีการสะสมโบรอนที่เซลล์มะเร็งได้ดีกว่า ซึ่งผลที่ได้ก็น่าจะนำไปศึกษาต่อในระดับ *in vivo* เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการรักษาด้วยวิธี BNCT ต่อไป

ยามาโมโต และคณะ (Yamamoto, et al. 1992 : 157-158) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine 3 ชนิด ได้แก่ 5-carboranyluridine (5-B₁₀U; 10) 5-carboranyldeoxyuridine (5-B₁₀UD; 11) และ 5-hydroxymethylcarboranyluridine (5-H-B₁₀U; 12) (โครงสร้างดังภาพประกอบ 8) โดยทำปฏิกิริยาผ่าน acetyluridine และใช้ palladium ใน phosphine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สารประกอบ (10) 67%, สารประกอบ (11) 55% และ สารประกอบ (12) 40% และได้สังเคราะห์ 5-boronyluridine (5-B₁U; 13) เพื่อเปรียบเทียบการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 L1210 B-16 MBL-2 และ MethA ดังตาราง 4

(10) 5-carboranyluridine (5-B₁₀U)(11) 5-carboranyldeoxyuridine (5-B₁₀UD)(12) 5-hydroxymethylcarboranyluridine (5-H-B₁₀U)(13) 5-boronyluridine (5-B₁U)

ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine

ตาราง 4 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (IC₅₀) ของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine

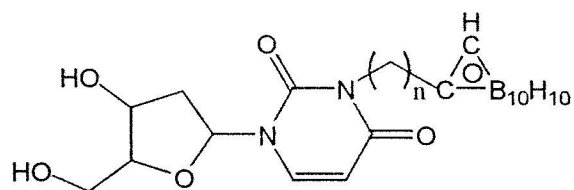
Cell line	IC ₅₀ (× 10 ⁻⁵ mol/L)			
	5-B ₁₀ U (10)	5-B ₁₀ UD (11)	5-H-B ₁₀ U (12)	5-B ₁ U (13)
P-388	2.20	1.99	5.60	>30
L1210	3.98	2.98	>30	>30
B-16	3.16	2.82	10	>30
MBL-2	3.09	2.23	11.9	>30
MethA	3.98	3.16	>30	>30

พบว่าสารประกอบ (10) และ (11) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบได้ทุกชนิด และยังพบว่าสารประกอบ (10) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ P-388 cell ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 1×10^{-5} mol/L หลัง 20 ชั่วโมงไปแล้ว

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งแต่ละชนิดยอมรับสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ uridine แต่ละตัวได้ไม่เหมือนกัน ดังนั้นการเลือกใช้สารประกอบใดเพื่อเป็นสารนำโบรอนเข้าสู่เซลล์มะเร็งที่ต้องการ ต้องพิจารณาการยอมรับสารประกอบนั้น ๆ ของเซลล์มะเร็งด้วยเพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพมากที่สุด

ลูนาโต และคณะ (Lunato, et al. 1999 : 3378-3389) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ thymidine โดยมีหมู่ *o*-carboranylalkyl เกาะที่ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 3 (โครงสร้างดังภาพประกอบ 9) และอนุพันธ์ของ 2'-deoxyuridine ที่มีหมู่ *o*-carboranylalkylmercapto เกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (โครงสร้างดังภาพประกอบ 10) เมื่อนำสารประกอบทั้งหมดมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยา phosphorylation กับเอนไซม์ cytosolic thymidine kinase (TK1) ทั้งชนิด recombinant -TK1 และ purified TK1 พบว่า สารประกอบ (14)-(17) เกิดปฏิกิริยา phosphorylation ได้ดี โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงเมื่อระยะห่างระหว่าง nucleoside กับ carborane เพิ่มขึ้น ส่วนสารประกอบ (18)-(21) ไม่เกิดปฏิกิริยา

เมื่อนำสารประกอบ (18)-(21) มาทดสอบการเกิดปฏิกิริยา phosphorylation กับเอนไซม์ recombinant mitochondrial thymidine kinase (TK2) พบว่ามีอัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงเมื่อระยะห่างระหว่าง nucleoside กับ carborane เพิ่มขึ้น ซึ่งผลที่ได้ไม่สนับสนุน concept ของงานวิจัยโดยคาดว่า ถ้า nucleoside กับ carborane ห่างกันมากขึ้นจะช่วยลดการรบกวนการเกิดปฏิกิริยาอันเนื่องมาจากผลของหมู่ที่ใหญ่ (steric effect) แต่ผลที่ได้กลับตรงกันข้าม ลูนาโตและคณะจึงคาดว่า น่าจะเกิดมาจากการตั้ง concept ผิดหรืออาจเนื่องมาจากความสามารถของการละลายน้ำของสารก็ได้ ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป



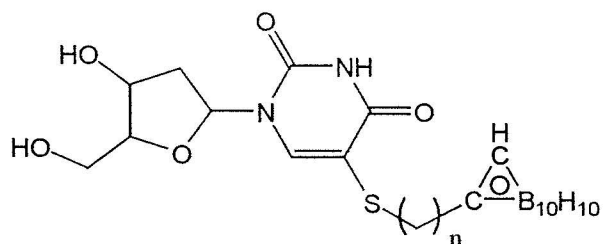
(14) $n = 4$

(15) $n = 5$

(16) $n = 6$

(17) $n = 7$

ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ thymidine



(18) $n = 4$

(19) $n = 5$

(20) $n = 6$

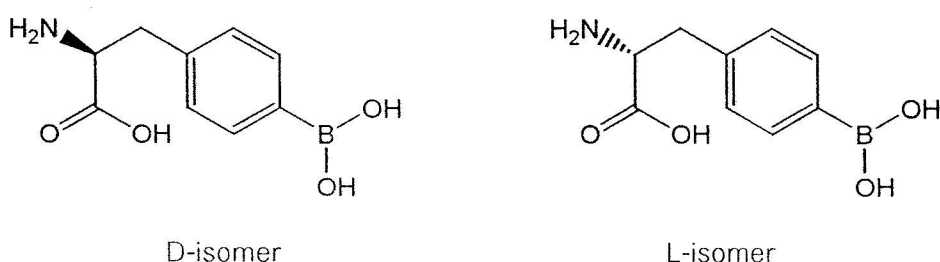
(21) $n = 8$

ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ deoxyuridine

สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดอะมิโน

คอดีร์ และคณะ (Coderre, et al. 1990 : 138-141) ศึกษาการเลือกสะสม

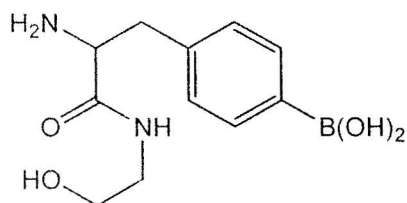
p-boronophenylalanine (BPA) ของเซลล์มะเร็งเต้านม (KHJJ cell) โดยทำการเปรียบเทียบระหว่าง L-BPA กับ D-BPA (โครงสร้างดังภาพประกอบ 11) พบว่ามีการสะสมของ L-BPA มากกว่า D-BPA



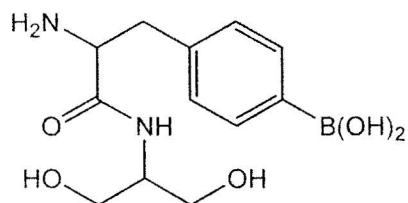
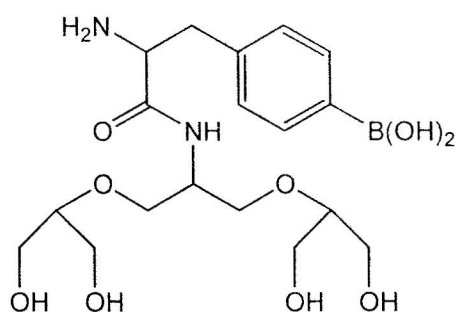
ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของ D-isomer และ L-isomer ของ *p*-BPA

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการสะสมของ L-BPA ในเซลล์มะเร็งประสาทของหนูทดลอง (GS-9L cell) กับเซลล์มะเร็งประสาทของมนุษย์ (U-87 MG cell) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ ได้แก่ เลือด กล้ามเนื้อ ตับ และ สมอง พบว่า L-BPA สะสมที่เซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์เนื้อเยื่อปกติ และการสะสมในเนื้อเยื่อปกติมีปริมาณน้อยไม่เป็นอันตราย แสดงว่า L-BPA เป็นสารนำโบรอนไปสะสมที่เซลล์มะเร็งที่ดีสำหรับการรักษาด้วยวิธี BNCT

นีโมโต ไค และ อาซาโอ (Nemoto, Cai and Asao. 1995 : 1673-1678) ได้เพิ่มสมบัติการละลายน้ำของ *p*-BPA โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลลงไป ได้สารประกอบไฮดรอกซี (22) (23) และ (24) (โครงสร้างดังภาพประกอบ 12) พบว่าการละลายน้ำจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล เมื่อนำสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ ไปทดสอบความเป็นพิษกับ B-16 melanoma cell และ TIG- hybrobrast cell โดยเปรียบเทียบกับ *p*-BPA พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลดลง เมื่อจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลมากขึ้น และเมื่อนำไปทดสอบการสะสมของโบรอนในเซลล์ก็มีผลเช่นเดียวกัน คือ จะมีการสะสมของโบรอนใน B-16 melanoma cell และ TIG hybrobrast cell ลดลง เมื่อจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลมากขึ้น

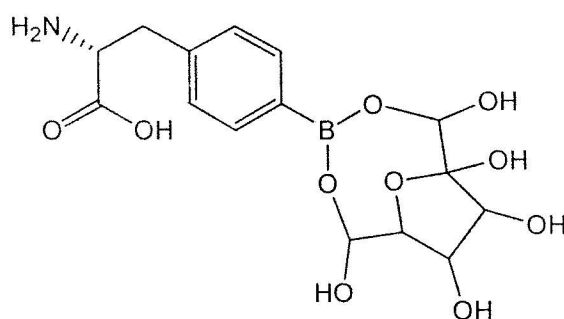


(22) BPA(OH)

(23) BPA(OH)₂(24) BPA(OH)₄

ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของสารประกอบ hydroxy BPA

เซเทียวาน และคณะ (Setiawan, et al. 1995 : 874-877) ศึกษาผลกระทบของ L-¹⁰B-p-boronophenylalanine-fructose (โครงสร้างดังภาพประกอบ 13) ที่มีต่อเส้นประสาท ในสมองของหนูทดลองที่ใช้การรักษาด้วยวิธี BNCT เนื่องจาก BPA มีโครงสร้างคล้ายกับสาร dopamine ที่มีอยู่ในเส้นประสาทในสมองของหนูทดลองจากการศึกษาพบว่า เมื่อทำการฉายนิวตรอนพลังงานต่ำเพื่อรักษาตามวิธี BNCT มีผลทำให้เอนไซม์ tyrosine hydroxylase ลดลงภายในเวลา 4 ชั่วโมง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เอนไซม์ tyrosine hydroxylase จะกลับคืนมา และไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เวลา 120 ชั่วโมง ดังนั้นการรักษามะเร็งด้วย L-¹⁰B-p-boronophenylalanine-fructose ร่วมกับวิธี BNCT จึงเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อสมองของหนูทดลอง



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของ L-¹⁰B-p-boronophenylalanine-fructose

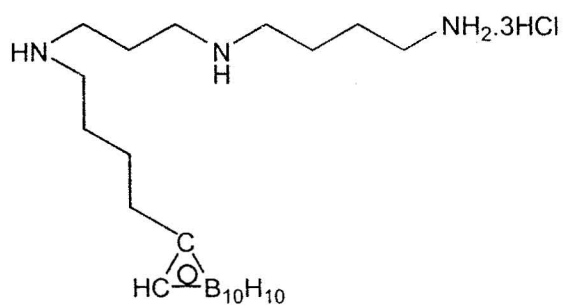
ซู และคณะ (Zhuo, et al. 1999 : 1282-1292) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ spermidine และ spermine (SPD-1 และ SPM-1) ได้แก่ SPD-5 SPM-5 และ อนุพันธ์ของทั้งสอง คือ ASPD-5 DHSPD-5 ASPM-5 DHSPM-5 และ BBSPD-5 (โครงสร้างดังภาพประกอบ14)

เมื่อนำสารประกอบทั้งหมด ไปทดสอบความเป็นพิษกับ F98 glioma cell โดยทำการเปรียบเทียบกับ SPD-1 และ SPM-1 พบว่า SPD-5 และ SPM-5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง ส่วน ASPD-5 DHSPD-5 ASPM-5 และ DHSPM-5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่า SPD-5 และ SPM-5 ประมาณ 5 เท่า เหมือนกับ SPD-1 และ SPM-1 ส่วน BBSPD-5 มีความเป็นพิษต่ำมาก ผลดังตาราง 5

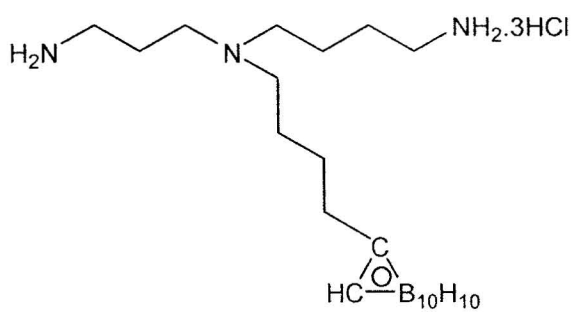
เมื่อนำมาทดสอบการสะสมของโบรอนใน F98 glioma cell โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับ BSH และ BPA ซึ่งใช้ในการรักษามะเร็งในปัจจุบัน พบว่าสารประกอบที่สังเคราะห์ได้มีการสะสมของโบรอนในเซลล์มะเร็งมากกว่า BSH และ BPA โดยเฉพาะ SPD-5 และ SPM-5 มีการสะสมของโบรอนมากที่สุด

เมื่อนำ ASPD-5 และ BBSPD-5 ไปศึกษาการสะสมของโบรอนในร่างกายของหนูที่ปลูกเซลล์มะเร็งประสาท (GL 261 cell) ไว้ในมันสมองส่วนใน และ หนูที่ปลูกเซลล์มะเร็งผิวหนัง (B-16 cell) พบว่าโบรอนจะไปสะสมอยู่ในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น ตับ ม้าม และ ไต เป็นต้น มากกว่าที่จะไปสะสมอยู่ในเซลล์มะเร็ง

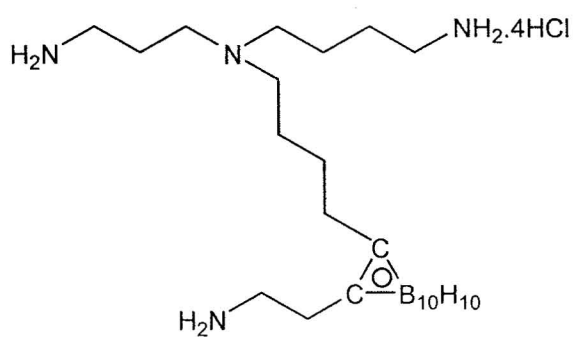
การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารประกอบที่สังเคราะห์ได้มีการสะสมของโบรอนได้ดีในการทดลองระดับ *in vitro* แต่ในการทดลองระดับ *in vivo* กลับสะสมโบรอนได้ไม่ดีซึ่งน่าจะศึกษาต่อไปว่า เกิดจากสาเหตุใดเพื่อปรับปรุงสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ให้เป็นสารนำโบรอนที่ดี ในวิธี BNCT ต่อไป



N^1 -(*o*-carboranyl)butylspermidine.3HCl (SPD-1)



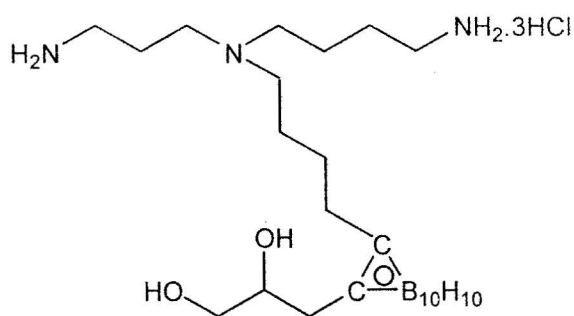
N^5 -(*o*-carboranyl)butylspermidine.3HCl (SPD-5)



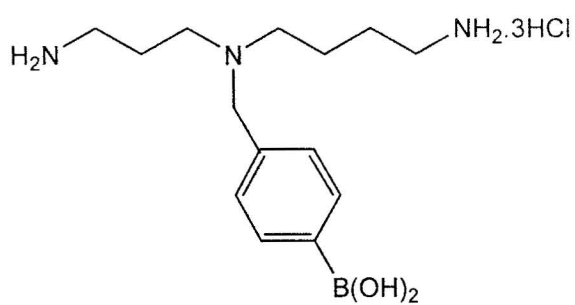
N^5 -[4-(2-aminoethyl-*o*-carboranyl)butyl]spermidine.4HCl (ASPD-5)

ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ spermine และ spermidine

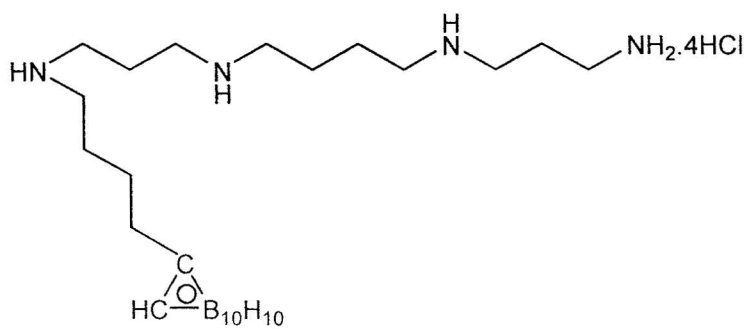
ภาพประกอบ 14 (ต่อ)



N^5 -[4-(2, 3-dihydroxypropyl-*o*-carboranyl)butyl]spermidine.3HCl (DHSPD-5)



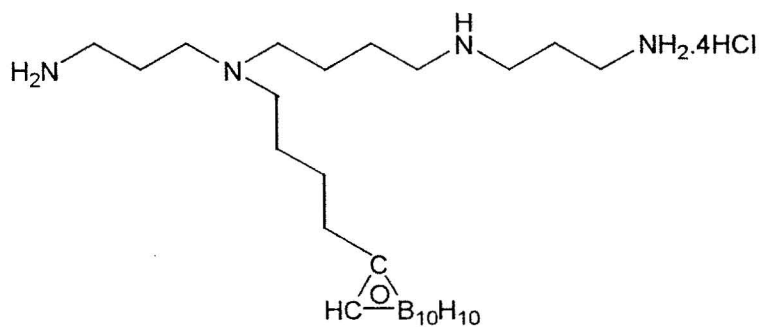
N^5 -[[4-(*B, B*-dihydroxybroyl)phenyl]methyl]spermidine.3HCl (BBSPD-5)



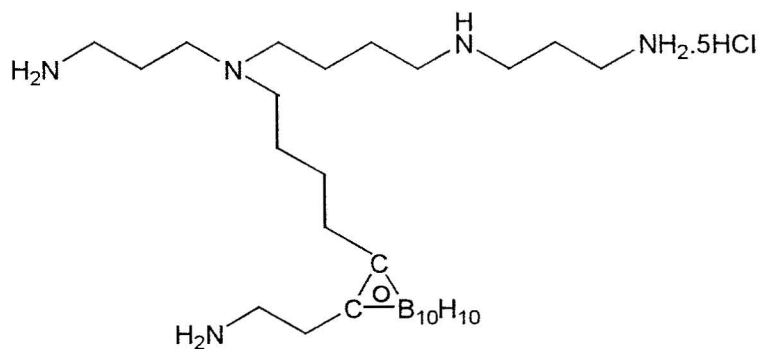
N^1 -(*o*-carboranyl)butylspermine.4HCl (SPM-1)

ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ spermine และ spermidine

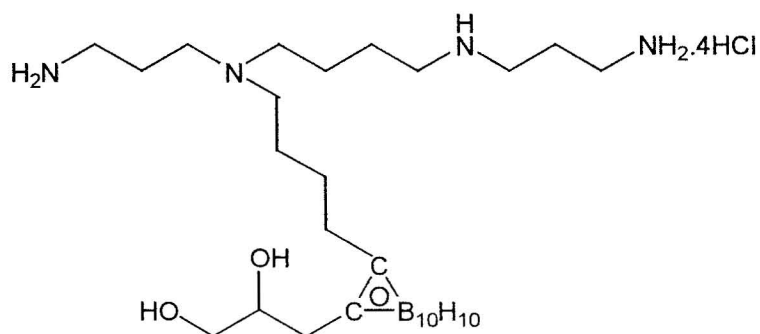
ภาพประกอบ 14 (ต่อ)



N^5 -(*o*-carboranyl)butylspermine.4HCl (SPM-5)



N^5 -[4-(2-aminoethyl-*o*-carboranyl)butyl]spermine.5HCl (ASPM-5)



N^5 -[4-(2,3-dihydroxypropyl-*o*-carboranyl)butyl]spermine.4HCl (DHSPM-5)

ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ spermine และ spermidine

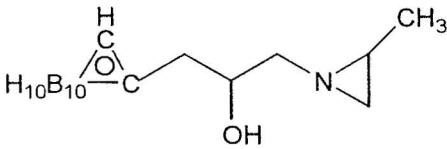
ตาราง 5 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (IC₅₀) ของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ spermine และ spermidine

สารประกอบ	IC ₅₀ (μM)
SPD	>100
SPD-5	22
ASPD-5	>100
DHSPD-5	>100
SPM	>100
SPM-5	22
ASPM-5	>100
DHSPM-5	>100
BBSPD-5	>5000

ซูซูกิ และคณะ (Suzuki, et al. 2000 : 85-86) ศึกษาเปรียบเทียบผลการรักษามะเร็งที่ ดับด้วยวิธี BNCT ของ BSH และ BPA โดยเปรียบเทียบการสะสมโบรอนของทั้งสองสารใน เซลล์มะเร็งและเนื้อเยื่อปกติบริเวณเซลล์มะเร็งนั้นในหนูทดลอง พบว่า BPA มีการสะสมของ โบรอนในเซลล์มะเร็งมากกว่า BSH และ มีการสะสมโบรอนที่เซลล์มะเร็งมากกว่าเนื้อเยื่อปกติโดย อัตราส่วนเซลล์มะเร็งต่อเนื้อเยื่อปกติ เป็น 2.8 ส่วน BSH มีการสะสมของโบรอนที่เนื้อเยื่อปกติ มากกว่าเซลล์มะเร็ง โดยอัตราส่วน เซลล์มะเร็งต่อเนื้อเยื่อปกติ เป็น 0.3 ดังนั้น BPA จึงเป็น สารประกอบที่เหมาะสมในการรักษามะเร็งที่ดับด้วยวิธี BNCT

สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของสารอื่น ๆ

ยามาโมโตะ และ นากามูระ (Yamamoto and Nakamura. 1993 : 2232-2234) สังเคราะห์สารประกอบ 1-carboranyl-3-(2-methylaziridino)-2-propanol (MACB) (โครงสร้าง ดังภาพประกอบ15)



ภาพประกอบ 15 โครงสร้างของ MACB

เมื่อนำ MACB มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิดเปรียบเทียบกับเซลล์เนื้อเยื่อปกติของทารก (TIG-1-20 cell) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อปกติพบว่า MACB สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง (B-16 cell) ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) ส่วนเซลล์มะเร็งปอด (1-87 cell) กับ เซลล์มะเร็งสมอง (IMR 32 cell) มีผลยับยั้งน้อยกว่า TIG-1-20 cell ดังตาราง 6

ตาราง 6 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (IC₅₀) ของ MACB

Cell line	IC ₅₀ (10 ⁻⁶ g/L)
B-16	1.40
HepG 2	2.13
TIG-1-20	4.70
IMR 32	8.20
1-87	15.50

เมื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของ B-16 cell และ TIG-1-20 cell ระหว่าง MACB กับ BPA พบว่า MACB ยับยั้งการเจริญเติบโตของ B-16 cell และ TIG-1-20 cell ได้มากกว่า BPA

ผลการศึกษาการสะสมของโบรอนใน B-16 cell และ TIG-1-20 cell ของ MACB เปรียบเทียบกับ BPA โดยใช้ ICP-AES ตรวจวัดปริมาณโบรอนได้ผลดังตาราง 7

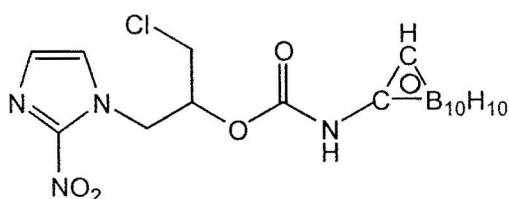
ตาราง 7 ปริมาณโบรอน (µg/mL) ใน B-16 cell และ TIG-1-20 cell ของ MACB เปรียบเทียบกับ BPA

สารประกอบ	B-16 cell		TIG-1-20 cell	
	2 h	24 h	2 h	24 h
MACB	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.11 ± 0.02
BPA	0.22 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.26 ± 0.01

พบว่า ปริมาณโบรอนใน B-16 cell ของ MACB ที่เวลา 2 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งปริมาณที่สะสมใกล้เคียงกับ BPA ส่วนปริมาณโบรอนใน TIG-1-20 cell ของ MACB

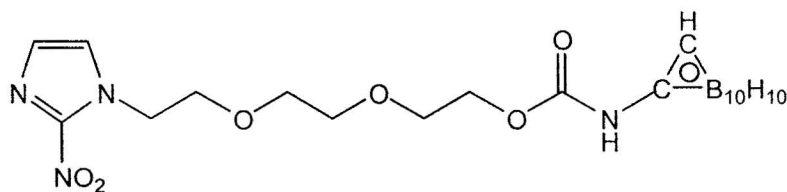
ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีปริมาณลดลงจากที่เวลา 2 ชั่วโมงเล็กน้อย แต่ในกรณีที่ใช้ BPA พบว่าปริมาณโบรอนมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น

สโคบี้ และ ทรีดกิลล์ (Scobie and Threadgill. 1994 : 2059-2063) ศึกษาพบว่า 2-nitroimidazole ถูกเก็บสะสมไว้ที่ hypoxic tumour tissue มาก จึงได้สังเคราะห์สารประกอบ nitroimidazolylcarborane 3 ชนิดคือ 1-(chloromethyl)-2-(2-nitroimidazol-1-yl)ethyl *N*-(1,2-dicarba-closo-dodecaboran-1-yl)carbamate (25), 2-{2-[2-(2-nitroimidazole-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethyl *N*-(1,2-dicarba-closo-dodecaboran-1-yl)carbamate (26) และ 1-(chloromethyl)-2-(2-nitroimidazol-1-yl)ethyl *N*-[4-(1,2-dicarba-closo-dodecaboran-1-yl)phenyl]carbamate (27) (โครงสร้างดังภาพประกอบ 16) โดย nitroimidazole alcohol เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ isocyanatecarborane ได้สารประกอบ (25), (26) และ (27) ร้อยละ 38, 47 และ 81 ตามลำดับ



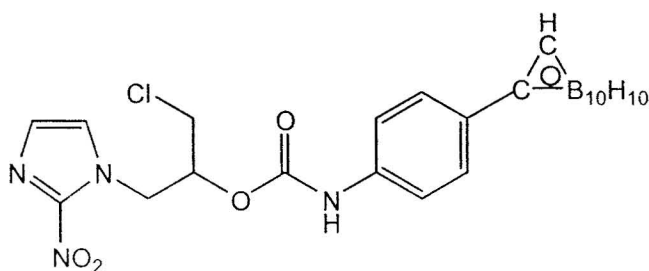
(25) 1-(chloromethyl)-2-(2-nitroimidazol-1-yl)ethyl

N-(1,2-dicarba-closo-dodecaboran-1-yl)carbamate



(26) 2-{2-[2-(2-nitroimidazole-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethyl

N-(1,2-dicarba-closo-dodecaboran-1-yl)carbamate

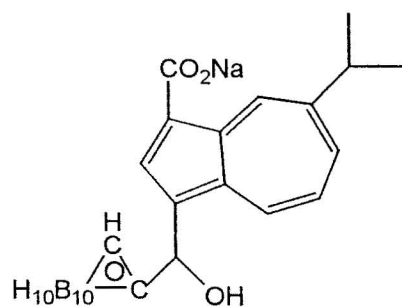


(27) 1-(chloromethyl)-2-(2-nitroimidazol-1-yl)ethyl

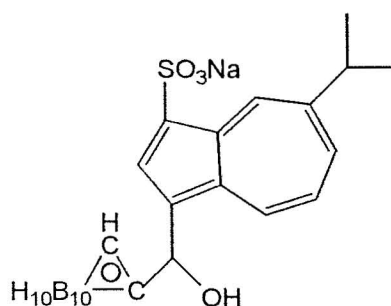
N-[4-(1,2-dicarba-closo-dodecaboran-1-yl)phenyl]carbamate

ภาพประกอบ 16 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ nitroimidazole

นากามูระ เซกิโด และ ยามาโมโต (Nakamura, Sekido and Yamamoto. 1997 : 2825-2830) สังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ azulene 2 ชนิด (โครงสร้างดังภาพประกอบ 17) สารประกอบที่สังเคราะห์ได้มีการละลายน้ำที่ดี เมื่อทดสอบความเป็นพิษกับ B-16 cell พบว่ามีความเป็นพิษใกล้เคียงกับ BPA เมื่อนำมาศึกษาการสะสมของโบรอนใน B-16 cell โดยใช้ ICP-AES ในการตรวจวัดปริมาณโบรอนพบว่าสารประกอบ (29) มีการสะสมของโบรอนในเซลล์มะเร็งได้ใกล้เคียงกับ BPA และดีกว่าสารประกอบ (28) จึงควรนำสารประกอบ (29) ไปศึกษาต่อระดับ *in vivo* เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT ต่อไป



(28) 3-(o-carboranylhydroxymethyl)-7-isopropylazulene sodium carboxylate



(29) 3-(o-carboranylmethyl)-7-isopropylazulene sodium sulfonate

ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ azulene

นากามูระ โอยาเกะ และ ยามาโมโต (Nakamura, Aoyagi and Yamamoto. 1998 : 1167-1171) ได้ปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของ aldehyde และ ketone จากการสังเคราะห์ โดยให้ปฏิกิริยาเกิดผ่าน lithiocarborane ซึ่งเกิดจาก butyllithium ทำปฏิกิริยากับ carborane เปลี่ยนมาเป็นการเติม tetrabutylammonium fluoride (TBAF) ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้ปฏิกิริยาเกิดง่ายขึ้นและใช้สภาวะไม่รุนแรง นอกจากนี้เมื่อสายโซ่ของอัลดีไฮด์ และคีโตนที่ใช้ทำปฏิกิริยายาวพอก็สามารถเกิดปฏิกิริยาการปิดวงภายในโมเลกุลได้ผลิตภัณฑ์เป็นวงแหวนในปริมาณที่สูง ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นควรนำไปศึกษาถึงความเหมาะสมที่จะนำมาใช้รักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT

สมิธ และ คณะ (Smith, et al. 2001 : 8179-8187) ศึกษาการใช้ ion microscopy ในการประเมินการแพร่กระจายของโบรอน-10 ของ *p*-boronophenylalanine (BPA) ในหนูที่ทำให้เป็นมะเร็งสมองชนิด 9L gliosarcoma และ F98 glioma โดยการฉีด BPA เข้าร่างกายของหนู 4 วิธีด้วยกันคือ ฉีดเข้าช่องท้อง (i.p. injection), ฉีดเข้าหลอดเลือดแดงหลักตรงคอ (i.c. injection) ทั้งที่มีและไม่มี blood-brain barrier disruption (BBB-D) และ ฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (i.v. infusion)

ผลการฉีด BPA เข้าช่องท้องในหนูที่เป็นมะเร็งชนิด 9L gliosarcoma พบว่า อัตราส่วนของความเข้มข้นของโบรอน-10 ระหว่าง มะเร็ง : สมอง เป็น 3.7 : 1 ส่วนผลการฉีดเข้าหลอดเลือดแดงหลักตรงคอในหนูที่เป็นมะเร็งชนิด F98 glioma พบว่า มีอัตราส่วนของความเข้มข้นของโบรอน-10 ระหว่างมะเร็ง : สมอง เป็น 2.9 : 1 และเพิ่มขึ้นเป็น 5.4 : 1 เมื่อฉีดโดยมี BBB-D ปริมาณโบรอนที่สะสมในเซลล์มะเร็งมากขึ้นจะช่วยเพิ่มผลการรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT ได้มากกว่า 25%

ปัจจุบัน ion microscopy เป็นเทคนิคที่ใช้วัดปริมาณโบรอน-10 ที่เข้าไปสะสมในเซลล์มะเร็ง (infiltrating tumor cells) โดยในหนูที่เป็นมะเร็งชนิด 9L gliosarcoma มีอัตราส่วนของความเข้มข้นของโบรอน-10 ระหว่าง infiltrating tumor cells : infiltrating normal brain เป็น 2.9 : 1 หลังการฉีด BPA แบบ i.p. injection ส่วนในหนูที่เป็นมะเร็งชนิด F98 glioma ที่ฉีด BPA เข้าหลอดเลือดแดงหลักตรงคอ (ไม่มี BBB-D) มีอัตราส่วนเป็น 2.2 : 1 และเพิ่มขึ้นเป็น 3.0 : 1 เมื่อมี BBB-D

เมื่อศึกษาความเข้มข้นของโบรอน-10 ใน main tumor mass (MTM) ซึ่งมีความเข้มข้นของโบรอน-10 ประมาณสองเท่าของใน infiltration tumor cells หลังจากฉีด BPA เข้าเส้นเลือดดำเป็นเวลา 2 และ 3 ชม. พบว่า ความเข้มข้นของโบรอน-10 ใน infiltration tumor cells ยังน้อยกว่าใน MTM อยู่ประมาณ 2.7 เท่า ($31 \pm 12 \mu\text{g/g tissue}$ vs $83 \pm 23 \mu\text{g/g tissue}$ (mean $\pm$ SD)) แต่หลังจาก 6 ชม.พบว่า ความเข้มข้นของโบรอน-10 ใน infiltration tumor cells เพิ่มขึ้นใกล้เคียง 90% เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของโบรอน-10 ใน MTM ส่วนความเข้มข้นของโบรอน-10 ใน normal brain มีประมาณ $20 \mu\text{g/g tissue}$

ผลการทดลองที่ได้มีความสำคัญมากต่อการรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT เนื่องจากการรักษาจะทิ้งระยะเวลาลงหลังจากฉีด BPA เพียง 2 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าถ้าทิ้งระยะเวลาวี้อย่างน้อย 6 ชม. น่าจะทำให้การรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT ได้ผลดีมากขึ้น เนื่องจากมีโบรอน-10 กระจายออกมาสะสมในเซลล์มะเร็งได้มากขึ้นนั่นเอง

บาร์ท และคณะ (Barth, et al. 2002 : 3159-3166) ศึกษาประสิทธิภาพของ epidermal growth factor receptor (EGFR) gene ในการนำสารประกอบโบรอนเข้าสู่เซลล์มะเร็ง โดยพบว่า มะเร็งสมองส่วนใหญ่จะมีการสร้าง EGFR gene ในปริมาณสูง แต่ในเซลล์สมองปกติมีปริมาณ น้อยมาก จึงได้สังเคราะห์ boronated starbrust dendrimer (BSD) ให้เป็นอนุพันธ์ของ EGFR gene ได้เป็น BSD-EGFR การทดลองทำโดยนำหนูพิษเซอร์มาปลูกเซลล์มะเร็งสมองที่มี F98 wild-type (F98_{wt}) receptor หรือที่มี F98 epidermal growth factor receptor (F98_{EGFR}) เป็น เวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำหนูมาศึกษา biodistribution โดยฉีด ¹²⁵I-labeled BSD-EGF เข้า ก้อนมะเร็ง (i.t. injection) เป็นเวลา 6 ชม. และ 24 ชม. พบว่า ที่เวลา 6 ชม. ปริมาณของ ¹²⁵I-labeled BSD-EGF ทั้งในมะเร็งที่มี F98_{wt} receptor และ F98_{EGFR} ใกล้เคียงกัน แต่ที่เวลา 24 ชม. ปริมาณ ¹²⁵I-labeled BSD-EGF (dose/g) ที่ฉีดเข้าไปในมะเร็งที่มี F98_{EGFR} เป็น 33.2% ส่วน F98_{wt} receptor เป็น 9.4% โดยมีความเข้มข้นของโบรอนเป็น 21.1 µg/g และ 9.2 µg/g ตาม ลำดับ ส่วนปริมาณโบรอนใน สมอง เลือด ตับ ไต และ ม้าม มีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.5 µg/g

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเวลาในการมีชีวิตอยู่ (survival time) ของหนูที่ผ่านกระบวนการ รักษาด้วยวิธี BNCT ทำการทดลองโดยปลูกเซลล์มะเร็งสมองที่มี F98_{wt} receptor หรือที่มี F98_{EGFR} แล้วฉีด BSD-EGF (~60 µg ¹⁰B/~15 µg EGF) ที่ก้อนมะเร็งร่วมกับการฉีด BPA (500 mg/kg) เข้าเส้นเลือดดำ จากนั้นนำหนูไปฉายนิวตรอนที่ Brookhaven Medical Reserch Reactor โดยใช้หนูที่ถูกปลูกมะเร็งแต่ไม่ได้รับการรักษาโดยวิธีใดเลยเป็นตัวควบคุม โดยมีเวลาใน การมีชีวิตอยู่เฉลี่ย (mean survival time ; MST ± SD) เป็น 27 ± 1 วัน ส่วนหนูที่ได้รับการรักษา โดยการฉายรังสีอย่างเดียวมี MST ± SD เป็น 31 ± 1 วัน

ผลการทดลองในหนูที่ได้รับการฉีด BSD-EGF อย่างเดียว พบว่า หนูที่ปลูกเซลล์มะเร็ง สมองที่มี F98_{EGFR} มี MST ± SD เป็น 45 ± 5 วัน ส่วนหนูที่ปลูกเซลล์มะเร็งสมองที่มี F98_{wt} receptor มี MST ± SD เป็น 33 ± 2 วัน

ผลการทดลองในหนูที่ได้รับการฉีด BSD-EGF ร่วมกับการฉีด BPA พบว่ามี MST ± SD เป็น 57 ± 8 วัน ส่วนหนูที่ได้รับการฉีด BPA อย่างเดียวยังมี MST ± SD เป็น 39 ± 2 วัน

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า EGFR gene มีความสามารถในการนำโบรอนเข้าสู่ เซลล์มะเร็งได้ดีส่งผลให้การรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT มีประสิทธิภาพมากขึ้น

บาร์ธ และคณะ (Barth, et al. 2002 : 858-868) ศึกษาประสิทธิภาพของการรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT หลังจากได้ปรับปรุงนำ Cereport ชนิด RMP-7 ของ blood-brain barrier มาใช้เป็นตัวยา BPA เข้าสู่เซลล์มะเร็งโดยใช้ nude rats ที่ปลูกมะเร็งสมองชนิด MRA27 melanoma ซึ่งได้ทำการศึกษา biodistribution ก่อน โดยนำหนูมาฉีด Cereport 1.5 $\mu\text{g/kg}$ เข้าหลอดเลือดแดงหลักตรงคอร่วมกับการฉีด BPA 500 mg/kg เข้าหลอดเลือดแดงหลักตรงคอหรือเข้าเส้นเลือดดำ หลังจากนั้น 2.5 ชม. นำหนูมาหาการสะสมของโบรอนพบว่า มีอัตราการสะสมของโบรอนในมะเร็ง : สมอง เป็น 6.1 : 1 และ ใน มะเร็ง : เลือด เป็น 6.3 : 1 หลังจากนั้นได้ศึกษาเวลาในการมีชีวิตอยู่ของหนูเมื่อนำไปรักษาด้วยวิธี BNCT ที่ Brookhaven Medical Reserch Reactor โดยใช้หนูที่ถูกปลูกมะเร็งแต่ไม่ได้รับการรักษาโดยวิธีใดเลยเป็นตัวควบคุมมีเวลาในการมีชีวิตอยู่ (median survival time ; MeST) เป็น 22 วัน ส่วนหนูที่ได้รับการรักษาโดยการฉายรังสีอย่างเดียวนั้น มี MeST เป็น 30 วัน

เมื่อนำหนูที่ได้รับการฉีด BPA อย่างเดียว (เปรียบเทียบการฉีดแบบเข้าเส้นเลือดแดงหลักตรงคอกับเข้าเส้นเลือดดำ) เป็นเวลา 2.5 ชม.แล้วนำไปรักษาด้วยวิธี BNCT พบว่ามี MeST เป็น 57 และ 41 วัน ตามลำดับ โดยหนูที่ฉีด BPA เข้าเส้นเลือดแดงหลักตรงคอที่มีชีวิตรอดอยู่นาน (> 180 วัน) มีถึง 20% ส่วนหนูที่ได้รับการฉีด BPA ร่วมกับการฉีด Cereport เข้าเส้นเลือดแดงหลักตรงคอเช่นเดียวกัน มี MeST เป็น 86 วัน โดยมีหนูที่มีชีวิตรอดอยู่นานมีถึง 36% ซึ่งผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับการฉีด BPA ร่วมกับการให้ hyperosmotic mannitol solution ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำ BPA เข้าสู่เซลล์มะเร็งเช่นเดียวกัน โดยมี MeST เป็น 85 วัน และมีหนูที่มีชีวิตรอดอยู่นานมีถึง 25% ดังนั้นการฉีด BPA ร่วมกับ Cereport โดยฉีดเข้าเส้นเลือดแดงหลักตรงคอทั้งสองกรณี จะเพิ่มเวลาในการมีชีวิตอยู่ของหนูได้นานขึ้น ซึ่งมีความสำคัญต่อการรักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT ในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. การสังเคราะห์และทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด
2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง ด้วยเทคนิค ICP-AES เมื่อใช้กรดต่างชนิดกันในกระบวนการย่อยสลายเซลล์มะเร็ง
3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดที่เข้าไปในเซลล์มะเร็งในเวลาต่าง ๆ กัน

1. การสังเคราะห์และทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด

การสังเคราะห์สาร

อุปกรณ์/เครื่องมือ

เครื่องแก้วและอุปกรณ์พื้นฐาน

rotary evaporator (Buchi, R-114)

Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR ; Perkin-Elmer Spectrum BX)

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS ; Finigan MAT INCOS 50)

Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR ; Bruker, Avance 300)

สารเคมี

o-carboranic acid ($C_2B_{10}H_{11}COOH$)

palmityl alcohol ($C_{16}H_{33}OH$)

arachyl alcohol ($C_{20}H_{41}OH$)

phosphorus pentachloride (PCl_5 ; AR grade)

dichloromethane (CH_2Cl_2 ; AR grade)

ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$; AR grade)

hexane (C_6H_{12} ; AR grade)

silica gel 60 (0.063-0.200 mm. ; Merck)

sodium hydrogencarbonate (NaHCO_3 ; AR grade)

magnesium sulfate anhydrous (MgSO_4 anhydrous ; AR grade)

toluene ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$; AR grade)

4-*N,N*-Dimethylaminopyrimidine (DMAP ; AR grade)

การทดลอง

1. ละลาย *o*-carboranic acid จำนวน 1 mmol (188 mg) ใน dried toluene 5 mL ทำปฏิกิริยาให้เป็น *o*-carboranyl chloride โดยค่อย ๆ เติม phosphorus pentachloride 1.2 mmol (250 mg) ลงในสารละลาย ภายใต้บรรยากาศที่ปราศจากความชื้น คนต่อที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจสอบ *o*-carboranyl chloride ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC และ FT-IR

2. ละลาย DMAP 0.03 mmol (3.7 mg) ใน dried toluene 2 mL แล้วเติมลงไปในปฏิกิริยาข้อ 1 จากนั้นเติม fatty alcohol จำนวน 1 mmol (palmityl alcohol 242 mg ; arachyl alcohol 298 mg) ที่ละลายอยู่ใน dried toluene 5 mL คนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นด้วยเทคนิค TLC และ FT-IR

3. ปรับสารละลายให้เป็นกลางด้วย 10% NaHCO_3 ที่อุณหภูมิประมาณ 5°C เติม CH_2Cl_2 ลงไปเพื่อสกัดสารที่ได้ ทำการสกัด 2 ครั้ง เก็บชั้นของ CH_2Cl_2 มารวมกันแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อล้างชั้น CH_2Cl_2 1 ครั้ง เติม MgSO_4 anhydrous ลงไปเพื่อกำจัดน้ำที่เหลือทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที กรอง และ ระเหย CH_2Cl_2 ออก

4. ทำสารที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค column chromatography โดยมี silica gel เป็นตัวดูดซับ และใช้สารละลาย hexane : ethyl acetate (อัตราส่วน 9.7 : 0.3) เป็นตัวชะ

การวิเคราะห์ข้อมูล

หาร้อยละของผลิตภัณฑ์และวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FT-IR GC-MS และ NMR

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

อุปกรณ์/สารเคมี

haemocytometer (Boeco)

incubator (Shel-Lab TC 2323)

inverted microscope (Olympus, Tokyo)

steriled pipette

tissue culture flask 25 cm²

เครื่องชั่ง (Mettler AE 240)

เครื่องแก้วและอุปกรณ์สามัญ

สารเคมี

arachyl carboranate (สังเคราะห์ขึ้นใหม่)

palmityl carboranate (สังเคราะห์ขึ้นใหม่)

dimethyl sulfoxide (DMSO ; AR grade)

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM ; Bio-Wittaker)

Folin-Ciocalteu Phenol reagent (F-C)

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS ; การเตรียมคุณภาพคนวก)

Newborn Calf Serum (NCS ; Bio-Wittaker)

Phosphate Buffer Solution (PBS ; การเตรียมคุณภาพคนวก)

0.4% trypan blue dye (การเตรียมคุณภาพคนวก)

0.25% trypsin in HEPES-Buffered Salines

solution C (การเตรียมคุณภาพคนวก)

การทดลอง

1. การเตรียม cell suspension

เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) มีการเจริญเติบโตโดยเกาะติดขวดเลี้ยงเซลล์เป็นแผ่นชั้นเดียว (monolayer) อาหารที่ใช้เลี้ยง คือ 10% NCS ใน EMEM บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator และ subculture 2 ครั้งต่อสัปดาห์

1.1 นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้อายุประมาณ 4 วัน มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด ล้างเซลล์ด้วย HBSS 5 mL

1.2 ย่อยเซลล์ให้หลุดเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ โดยใช้ 0.25% trypsin solution 5 mL ทั้งไว้ประมาณ 1-2 นาที จนสังเกตเห็นว่าเซลล์เริ่มจะหลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ ดูด 0.25% trypsin solution ทั้ง

1.3 เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ 5 mL ใช้ pipette ดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งเพื่อชะให้เซลล์หลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์และแยกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ได้เป็น cell suspension

1.4 นำ cell suspension มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เป็น 4×10^4 cell/mL ตามวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) ดังนี้

1.4.1 ดูด cell suspension 0.2 mL ผสมกับ 0.4% trypan blue 0.2 mL ดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน ทั้งไว้ประมาณ 5 นาที

1.4.2 นำ cell suspension ที่ย้อมสีแล้วไปหยดบน haemocytometer

1.4.3 นับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (เซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ 0.4% trypan blue) และคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร

1.4.4 เจือจาง cell suspension ด้วย 10% NCS ใน EMEM ให้มีปริมาณของเซลล์มะเร็งเป็น 4×10^4 cell/mL

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เตรียมสารละลายของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ 2.5 % DMSO ใน 10 % NCS ใน EMEM เป็นตัวเจือจาง

2.2 ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ จำนวน 1 mL แล้วปิเปต cell suspension ที่เตรียมไว้จำนวน 3 mL นำไปบ่มที่ 37°C ใน 5 % CO_2 incubator เป็นเวลา 4 วัน

2.3 ปิเปต cell suspension จำนวน 3 mL ผสมกับ 2.5 % DMSO ใน 10% NCS ใน EMEM จำนวน 1 mL บ่มที่ 37°C ใน 5 % CO_2 incubator เป็นเวลา 4 วัน เพื่อใช้เป็น control

3. การวัดปริมาณเซลล์มะเร็ง

วัดปริมาณเซลล์มะเร็งโดยวิธีการหาปริมาณโปรตีน มีขั้นตอนดังนี้

3.1 นำขวดเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดที่ทำการทดลองมาเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด

3.2 ล้างเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 5 mL จำนวน 2 ครั้ง เพื่อล้างโปรตีนที่อยู่บนอกเซลล์

3.3 เติม solution C ขวดละ 5 mL เพื่อให้เซลล์แตกและละลายโปรตีนออกจากเซลล์ นำไปผสมด้วย vortex mixer ได้เป็น cell solution

3.4 เติม cell solution 1 mL ลงในหลอดที่มี solution C อยู่หลอดละ 4 mL น้ำกลั่น 1 mL และ สารละลาย F-C : น้ำ (5 : 1) 0.5 mL ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

3.5 นำสารละลายทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank ซึ่งต้องวัดให้เสร็จภายใน 2 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ และสารประกอบที่สังเคราะห์ได้จาก ฌลอง ทุ่มพุ่ม (ฌลอง ทุ่มพุ่ม. 2543) วิเคราะห์โดยเทียบจากค่า IC_{50} ซึ่งหาได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (% Growth) กับ ความเข้มข้นของสาร

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็งด้วยเทคนิค ICP-AES เมื่อใช้กรดต่างชนิดกันในกระบวนการย่อยสลายเซลล์มะเร็ง

อุปกรณ์/เครื่องมือ

haemocytometer (Boeco)

incubator (Shel-Lab TC 2323)

Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer
(ICP-AES ; PERKIN -ELMER OPTIMA 3000)

inverted microscope (Olympus, Tokyo)

polyethylene bottle

polyethylene volumetric flask

steriled pipette

tissue culture flask 25 cm²

เครื่องชั่ง (Mettler AE 240)

เครื่องแก้วและอุปกรณ์สามัญ

สารเคมี

deionized water

dimethyl sulfoxide (DMSO ; AR grade)

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM ; Bio-Wittaker)

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS ; การเตรียมคุณภาพคนวก)

hydrogen peroxide (H_2O_2 ; AR grade)

Newborn Calf Serum (NCS ; Bio-Wittaker)

nitric acid (HNO_3 ; AR grade)

perchloric acid ($HClO_4$; AR grade)

standard boric acid (standard H_3BO_3 ; for AA grade)

0.4% trypan blue dye (การเตรียมคุณภาพคนวก)

0.25% trypsin in HEPES-Buffered Salines

การทดลอง

1. stock boron solution ใช้ standard H_3BO_3 ความเข้มข้นของโบรอน 1 mg/mL

2. สร้างกราฟมาตรฐาน

2.1 ปิเปต stock boron solution ปริมาตร 0.000, 0.0125, 0.025, 0.125, 0.250, 0.375 และ 0.500 mL ใส่ลงขวด polyethylene เดิม $HClO_4$ 1 mL และ H_2O_2 2 mL ย่อยสลายที่อุณหภูมิ $75^\circ C$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 25 mL ด้วย deionized water ได้สารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 $\mu g/mL$ ตามลำดับ

2.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนจาก $HClO_4$ เป็น HNO_3

2.3 ตรวจวัดค่า emission ของโบรอนในสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย ICP-AES และ สร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า emission ที่ตรวจวัดได้กับความเข้มข้นของโบรอน เมื่อใช้ $HClO_4$ และเมื่อใช้ HNO_3 ในกระบวนการย่อยสลาย

3. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลล์มะเร็ง

3.1 เตรียม cell suspension เหมือนกับขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่ให้มีจำนวนเซลล์มะเร็งเป็น 2×10^5 cell/mL

3.2 ปิเปต stock boron solution จำนวน 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32 และ 0.40 mL ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์และปิเปต cell suspension จำนวน 3 mL ลงไปในแต่ละขวดเลี้ยงเซลล์ ปรับปริมาตรให้เป็น 4 mL ด้วย 0.05% CH_2Cl_2 ใน 0.5% DMSO และ 10% NCS ใน EMEM บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเติม HClO_4 1 mL และ H_2O_2 2 mL ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 25 mL ด้วย deionized water จะได้ความเข้มข้นของโบรอนที่ใส่เข้าไปเป็น 0.80, 1.60, 3.20, 6.40, 9.60, 12.80 และ 16.00 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

3.3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2 แต่เปลี่ยนจาก HClO_4 เป็น HNO_3

3.4 วิเคราะห์ปริมาณโบรอนด้วยเทคนิค ICP-AES โดยใช้กราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นในข้อ 2 และ ใช้ cell suspension ที่ผ่านการย่อยสลายตามวิธีเดียวกันเป็น sample blank

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบปริมาณโบรอนที่ใส่เข้าไปในเซลล์มะเร็งกับปริมาณที่ได้จากการตรวจวัดได้ด้วย ICP-AES หลังจากที่ย่อยสลายเซลล์มะเร็ง ด้วย $\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ และ $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันที่เข้าไปในเซลล์มะเร็งในเวลาต่าง ๆ

อุปกรณ์/เครื่องมือ

haemocytometer (Boeco)

incubator (Shel-Lab TC 2323)

Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer

(ICP-AES ; PERKIN -ELMER OPTIMA 3000)

inverted microscope (Olympus, Tokyo)

polyethylene bottle

polyethylene volumetric flask

steriled pipette

tissue culture flask 25 cm²

เครื่องชั่ง (Mettler AE 240)

เครื่องแก้วและอุปกรณ์สามัญ

สารเคมี

deionized water

dimethyl sulfoxide (DMSO ; AR grade)

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM ; Bio-Wittaker)

fatty carboranate ester

1. palmitoleyl carboranate* (PE)
2. stearyl carboranate* (SR)
3. elaidyl carboranate* (ED)
4. oleyl carboranate* (OE)
5. palmityl carboranate (PT)
6. arachyl carboranate (AR)

*สารหมายเลข 1-4 ผลิตโดย พุ่มพุ่ม สังกะราห์ (ผลิตโดย พุ่มพุ่ม. 2543)

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS ; การเตรียมคุณภาพคนว)

hydrogen peroxide (H₂O₂; AR grade)

nitric acid (HNO₃; AR grade)

Newborn Calf Serum (NCS ; Bio-Wittaker)

Phosphate Buffer Solution (PBS ; การเตรียมคุณภาพคนว)

standard boric acid (H₃BO₃; for AA grade)

0.4% trypan blue dye (การเตรียมคุณภาพคนว)

0.25% trypsin in HEPES-Buffered Salines

การทดลอง

1. stock boron solution ใช้ standard H_3BO_3 ความเข้มข้นเป็น 1 mg/mL

2. สร้างกราฟมาตรฐาน

2.1 ปิเปต stock boron solution ปริมาตร 0.0, 2.5, 25.0, 62.5, 125.0, 187.5, 250.0 และ 312.5 μL ใส่ลงในขวด polyethylene เดิม HNO_3 1 mL และ H_2O_2 2 mL ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 25 mL ด้วย deionized water ได้สารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

2.2 ตรวจวัดค่า emission ของโบรอนในสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย ICP-AES และ สร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า emission ที่ตรวจวัดได้ กับ ความเข้มข้นของโบรอน

3. การนำสารเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

3.1 เตรียม cell suspension เหมือนกับขั้นตอนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลล์มะเร็ง

3.2 ปิเปต cell suspension จำนวน 3 mL ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์มะเร็งเกาะติดขวดเลี้ยงเซลล์

3.3 เตรียม stock solution ของ PT, PE, SR, OE, ED และ AR ให้มีความเข้มข้นเป็น 172.0, 146.8, 332.4, 258.0, 254.0 และ 1,148.0 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้ 0.05% CH_2Cl_2 กับ 0.5% DMSO เป็นตัวทำละลาย และ 10% NCS ใน EMEM เป็นตัวเจือจาง

3.4 ปิเปต stock solution ของ PT, PE, SR, OE, ED และ AR อย่างละ 1 mL ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นเป็น 43.0, 36.7, 83.1, 64.5, 63.5 และ 287.0 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นค่า IC_{50} ของสารตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.5 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1-3.4 แต่บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 3, 6 และ 24 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลาที่กำหนดดูสัดส่วนที่เป็นของเหลวออกจนหมดจนเหลือเฉพาะเซลล์ที่เกาะติดอยู่ที่ขวดเลี้ยงเซลล์

3.6 ล้างเซลล์ด้วย PBS 4 mL จำนวน 2 ครั้ง เก็บของเหลวทั้งหมดที่มีสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันที่ไม่เข้าไปในเซลล์ (extracellular boron solution) ส่วนเซลล์ที่เกาะติดอยู่ที่ผนังขวดเลี้ยงเซลล์ เป็นส่วนของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันที่

เข้าไปในเซลล์ (intracellular boron) เก็บทั้งสองส่วนไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C จนกระทั่งนำมาตรวจวัดปริมาณโบรอนด้วย ICP-AES

4. การวิเคราะห์ปริมาณโบรอนโดย ICP-AES

4.1 นำส่วนของ intracellular boron มาย่อยสลายด้วย HNO_3 1 mL และ H_2O_2 2 mL ที่อุณหภูมิประมาณ 75 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 25 mL ด้วย deionized water

4.2 นำส่วน extracellular boron solution มาย่อยสลายตามวิธีเดียวกับข้อ 4.1

4.3 ตรวจวัดปริมาณโบรอนด้วย ICP-AES โดยใช้ cell suspension ที่ผ่านการย่อยสลายตามวิธีเดียวกันเป็น blank

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ปริมาณโบรอนจากกราฟมาตรฐานและเปรียบเทียบปริมาณโบรอนที่เข้าไปในเซลล์มะเร็งของสารที่ใช้ทดสอบที่เวลาต่าง ๆ

บทที่ 4

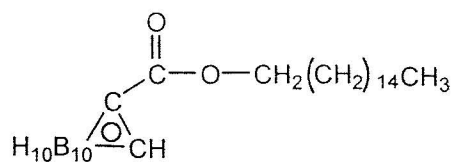
ผลการวิจัย

1. ผลการสังเคราะห์และการทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด

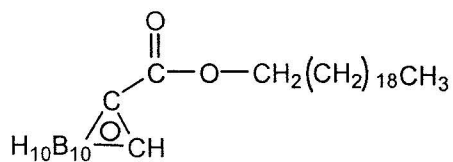
ผลการสังเคราะห์สาร

สารประกอบ carboranic esters ที่สังเคราะห์ได้ 2 ชนิด มีโครงสร้าง ดังนี้

palmityl carboranate ($C_{19}H_{44}O_2B_{10}$; PT)



arachyl carboranate ($C_{23}H_{52}O_2B_{10}$; AR)



สารประกอบ PT เป็นของเหลวใส จุดเดือด $160^{\circ}C$ ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้

51.5

สารประกอบ AR เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว $48^{\circ}C$ ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์

ได้ 60.5

ข้อมูลทาง Spectroscopy ของ PT (ภาพประกอบ 27-35)

IR (cm ⁻¹)(film)	2925, 2853		C – H
	2608		B – H
	1747		C = O
	1280		C – O
¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz)	4.22	t	2H ; CH ₂ – O, J = 6.54 Hz
	4.07	s	1H ; C – H (carborane)
	1.00 – 3.40	m	38H ; 14 CH ₂ , 10B – H
	0.87	t	3H ; CH ₃ , J = 6.55 Hz
¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz)	161.06		C = O
	68.87		CH ₂ – O
	56.86		C – H (carborane)
	31.91, 29.66, 29.47, 29.36,		
	28.98, 28.13, 25.50, 22.68		14 CH ₂
	14.03		CH ₃
GC-MS	Retention time		3.46 min
	Calculated mass		412.66
	Measured mass		ไม่เห็น M ⁺ มี m/z
			(%Relative Abundance)
			เป็นดังนี้ 113 (3), 111 (16),
			97 (22), 95 (13), 83 (29),
			81 (45), 69 (53), 67 (100)
			และ 55 (97)

ข้อมูลทาง Spectroscopy ของ AR (ภาพประกอบ 39-47)

IR (cm ⁻¹)(KBr)	2918, 2850		C – H
	2604		B – H
	1746		C = O
	1284		C – O
¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz)	4.22	t	2H ; CH ₂ – O, <i>J</i> = 6.42 Hz
	4.07	s	1H ; C – H (carborane)
	1.00 – 3.50	m	46H ; 18 CH ₂ , 10B – H
	0.87	t	3H ; CH ₃ , <i>J</i> = 6.55 Hz
¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz)	161.11		C = O
	68.91		CH ₂ – O
	56.88		C – H (carborane)
	31.92, 29.69, 29.65, 29.59,		
	29.48, 29.38, 29.36, 28.99,		
	28.16, 25.52, 22.69		18 CH ₂
	14.11		CH ₃
GC-MS	Retention time		3.89 – 4.06 min
	Calculated mass		468.77
	Measured mass		ไม่เห็น M ⁺ มี m/z
			(%Relative Abundance)
			เป็นดังนี้ 141 (5), 139 (8),
			125 (11), 111 (21), 97 (28),
			95 (14), 83 (26), 81 (44),
			69 (45), 67 (100) และ
			55 (82)

ผลการทดสอบความเป็นพิษ
ตาราง 8 ค่า IC₅₀ ของ carboranic esters ต่อ HeLa cell

สารประกอบ	IC ₅₀ (µg/mL)
SR*	83.1
OE*	64.5
ED*	63.5
PE*	36.7
PT	43.0
AR	287.0

หมายเหตุ *งานวิจัยของฉลอง ทุ่มพุ่ม

2..ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็งด้วยเทคนิค ICP-AES เมื่อใช้กรดต่างชนิดกันในกระบวนการย่อยสลายเซลล์มะเร็ง

ตาราง 9 การเปรียบเทียบปริมาณโบรอน (ppm) ที่ตรวจวัดได้จาก ICP – AES ของการย่อยสลายเซลล์มะเร็งระหว่าง HNO₃/H₂O₂ และ HClO₄/H₂O₂ ของ standard H₃BO₃ for atomic absorption

ความเข้มข้นของโบรอนที่ใส่ลงไป	HNO ₃		HClO ₄	
	ความเข้มข้นที่วัดได้	%recovery	ความเข้มข้นที่วัดได้	%recovery
0.80	0.85	106.2	0.80	100.0
1.60	1.45	90.6	1.55	96.8
3.20	3.05	95.3	3.15	98.4
6.40	6.43	100.4	6.43	100.4
9.60	9.58	99.8	9.55	99.5
12.80	13.01	101.6	13.01	101.6
16.00	16.25	101.5	16.15	100.9

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิดที่เข้าไปในเซลล์มะเร็ง

ตาราง 10 ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ palmityl carboranate (PT)
ปริมาณ PT เริ่มต้น 172.00 µg / 25 mL มีความเข้มข้นของโบรอนเป็น 1.80 µg/mL

เวลา (ชม.)	ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง			ปริมาณโบรอนที่อยู่นอกเซลล์มะเร็ง		
	(Intra cellular boron) µg/mL			(Extra cellular boron solution) µg/mL		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.73	1.70	1.71
3.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.71	1.64	1.67
6.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.63	1.62	1.62
24.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.62	1.65	1.63

หมายเหตุ N.D. = Not Detectable
 ค่า BEC (Background Equivalent Concentration) = 0.16 µg/mL

ตาราง 11 ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ palmitoleyl carboranate (PE)
ปริมาณ PE เริ่มต้น 146.80 µg / 25 mL มีความเข้มข้นของโบรอนเป็น 1.55 µg/mL

เวลา (ชม.)	ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง			ปริมาณโบรอนที่อยู่นอกเซลล์มะเร็ง		
	(Intra cellular boron) µg/mL			(Extra cellular boron solution) µg/mL		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.59	1.52	1.55
3.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.56	1.51	1.53
6.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.36	1.69	1.52
24.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.63	1.64	1.63

หมายเหตุ N.D. = Not Detectable
 ค่า BEC (Background Equivalent Concentration) = 0.16 µg/mL

ตาราง 12 ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ steryl carboranate (SR)
ปริมาณ SR เริ่มต้น 332.40 µg / 25 mL มีความเข้มข้นของโบรอนเป็น 3.26 µg/mL

เวลา (ชม.)	ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง			ปริมาณโบรอนที่อยู่นอกเซลล์มะเร็ง		
	(Intra cellular boron) µg/mL			(Extra cellular boron solution) µg/mL		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.90	2.87	2.88
3.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.94	2.92	2.93
6.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.92	2.79	2.85
24.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.94	2.88	2.91

หมายเหตุ N.D. = Not Detectable
 ค่า BEC (Background Equivalent Concentration) = 0.16 µg/mL

ตาราง 13 ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ oleyl carboranate (OE)
ปริมาณ OE เริ่มต้น 258.00 µg / 25 mL มีความเข้มข้นของโบรอนเป็น 2.54 µg/mL

เวลา (ชม.)	ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง			ปริมาณโบรอนที่อยู่นอกเซลล์มะเร็ง		
	(Intra cellular boron) µg/mL			(Extra cellular boron solution) µg/mL		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.34	2.34	2.34
3.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.32	2.33	2.32
6.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.30	2.30	2.30
24.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.31	2.30	2.30

หมายเหตุ N.D. = Not Detectable
 ค่า BEC (Background Equivalent Concentration) = 0.16 µg/mL

ตาราง 14 ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ elaidyl carboranate (ED)

ปริมาณ ED เริ่มต้น 254.00 µg / 25 mL มีความเข้มข้นของโบรอนเป็น 2.50 µg/mL

เวลา (ชม.)	ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง			ปริมาณโบรอนที่อยู่นอกเซลล์มะเร็ง		
	(Intra cellular boron) µg/mL			(Extra cellular boron solution) µg/mL		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.18	2.16	2.17
3.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.34	2.38	2.36
6.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.36	2.33	2.34
24.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.35	2.35	2.35

หมายเหตุ N.D. = Not Detectable
 ค่า BEC (Background Equivalent Concentration) = 0.16 µg/mL

ตาราง 15 ปริมาณโบรอนที่ตรวจวัดได้จาก ICP-AES ของ arachyl carboranate (AR)

ปริมาณ AR เริ่มต้น 1148.00 µg / 25 mL มีความเข้มข้นของโบรอนเป็น 10.59 µg/mL

เวลา (ชม.)	ปริมาณโบรอนในเซลล์มะเร็ง			ปริมาณโบรอนที่อยู่นอกเซลล์มะเร็ง		
	(Intra cellular boron) µg/mL			(Extra cellular boron solution) µg/mL		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1.0	N.D.	N.D.	N.D.	9.67	9.51	9.59
3.0	N.D.	N.D.	N.D.	9.51	9.52	9.51
6.0	N.D.	N.D.	N.D.	9.59	9.14	9.36
24.0	N.D.	N.D.	N.D.	9.09	9.52	9.30

หมายเหตุ N.D. = Not Detectable
 ค่า BEC (Background Equivalent Concentration) = 0.16 µg/mL

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

การสังเคราะห์สารประกอบ *o*-carboranic esters ทำได้โดยการเปลี่ยน *o*-carboranic acid ให้เป็น *o*-carboranyl chloride โดยให้ทำปฏิกิริยากับ PCl_5 ใน toluene ที่อุณหภูมิ 110°C ประมาณ 6 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และ hexane : ethyl acetate (9.7:0.3) เป็นตัวชะ โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับสารตั้งต้น คือ *o*-carboranic acid โดยค่า R_f ของ *o*-carboranic acid = 0.2 และ R_f ของ *o*-carboranyl chloride = 0.5 และติดตามการเกิดปฏิกิริยาร่วมกับเทคนิค Infrared spectroscopy พบการดูดกลืนแสงของหมู่ C=O ของ *o*-carboranyl chloride ที่ 1773.89 cm^{-1} (ภาพประกอบ-23) โดยเปรียบเทียบกับหมู่ C=O ของ *o*-carboranic acid ซึ่งปรากฏที่ 1724.67 cm^{-1} (ภาพประกอบ 19) หลังจากเกิดเป็น *o*-carboranyl chloride สมบูรณ์แล้ว ทำปฏิกิริยาต่อโดยการเติม fatty alcohol ในส่วนที่ผู้วิจัยทำคือ palmityl alcohol และ arachyl alcohol ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 20 ชั่วโมง โดยมี DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้สารประกอบ *o*-carboranate esters ติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และ hexane : ethyl acetate (5:1) โดยเปรียบเทียบกับ *o*-carboranic acid และ fatty alcohol ที่ใช้ทำปฏิกิริยา (R_f ของ *o*-carboranic acid = 0.2 , R_f ของ fatty alcohol = 0.6 และ R_f ของ *o*-carboranic ester = 0.9) และติดตามการเกิดปฏิกิริยาร่วมกับเทคนิค Infrared spectroscopy ปฏิกิริยาทั้ง 2 ขั้นตอนต้องทำต่อเนื่องกันภายใต้บรรยากาศที่ปราศจากความชื้น หลังจากนั้นแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และ hexane : ethyl acetate (9.7 : 0.3) เป็นตัวชะ

ข้อมูลทาง Infrared spectroscopy (IR)

PT พบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 2608.01 , 1747.92 และ 1280.70 cm^{-1} (ภาพประกอบ 27) ส่วน AR พบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 2604.14 , 1746.55 และ 1284.58 cm^{-1} (ภาพประกอบ 39) ซึ่งเป็นการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ B-H ของ *o*-carborane, หมู่ C=O ของ ester และ หมู่ C-O ตามลำดับ

ข้อมูลทาง Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR)

^1H NMR

สารตั้งต้น

o-carboranic acid พบสัญญาณเรโซแนนซ์ (แสดงดังภาพประกอบ 20) ปรากฏที่ 8.88 ppm ลักษณะเป็น singlet เป็นสัญญาณของ H ของหมู่ COOH พบที่ 4.03 ppm ลักษณะเป็น singlet เป็นสัญญาณของ H ของหมู่ $\text{C}-\text{H}$ (carborane) และ พบที่ 1.00 – 3.60 ppm ลักษณะเป็น multiplet เป็นสัญญาณของ 10H ของหมู่ $\text{B}-\text{H}$

fatty alcohol ทั้ง palmityl alcohol และ arachyl alcohol พบสัญญาณเรโซแนนซ์ (ดังภาพประกอบ 25 และ 37 ตามลำดับ) ปรากฏที่ 1.00 – 3.60 ppm ลักษณะเป็น multiplet เป็นสัญญาณของ H ของหมู่ CH_2 หลายหมู่ และที่ 0.87 ppm ลักษณะเป็น triplet ซึ่งเป็นสัญญาณของ 3H ของหมู่ CH_3

จากสัญญาณของสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดลองพบว่า สัญญาณของ 10H ของหมู่ $\text{B}-\text{H}$ ของ *o*-carboranic acid และ สัญญาณของ H ของหมู่ CH_2 หลายหมู่ของ fatty alcohol จะปรากฏสัญญาณในช่วงเดียวกัน

สารประกอบ *o*-carboranic esters

สารประกอบ PT พบสัญญาณเรโซแนนซ์ (ดังภาพประกอบ 28-29) ปรากฏที่ 4.22 ppm มีลักษณะเป็น triplet ซึ่งเป็นสัญญาณของ 2H ของหมู่ CH_2-O ค่า coupling constant (J) เท่ากับ 6.54 Hz ที่ 4.07 ppm ลักษณะเป็น singlet เป็นสัญญาณของ H ของหมู่ $\text{C}-\text{H}$ (carborane) ที่ 1.00 – 3.40 ppm ลักษณะเป็น multiplet เป็นสัญญาณของ 28H ของ 14 CH_2 และ 10H ของหมู่ $\text{B}-\text{H}$ และที่ 0.87 ppm ลักษณะเป็น triplet มีค่า J เท่ากับ 6.55 Hz เป็นสัญญาณของ 3H ของหมู่ CH_3

สารประกอบ AR พบสัญญาณเรโซแนนซ์ (ดังภาพประกอบ 40-41) ปรากฏที่ 4.22 ppm มีลักษณะเป็น triplet ซึ่งเป็นสัญญาณของ 2H ของหมู่ CH_2-O ค่า J เท่ากับ 6.42 Hz ที่ 4.07 ppm ลักษณะเป็น singlet เป็นสัญญาณของ H ของหมู่ $\text{C}-\text{H}$ (carborane) ที่ 1.00 – 3.50 ppm ลักษณะเป็น multiplet เป็นสัญญาณของ 36H ของ 18 CH_2 และ 10H ของหมู่ $\text{B}-\text{H}$ และที่ 0.87 ppm ลักษณะเป็น triplet มีค่า J เท่ากับ 6.55 Hz เป็นสัญญาณของ 3H ของหมู่ CH_3

¹³C NMR

สารตั้งต้น

สารประกอบ *o*-carboranic esters

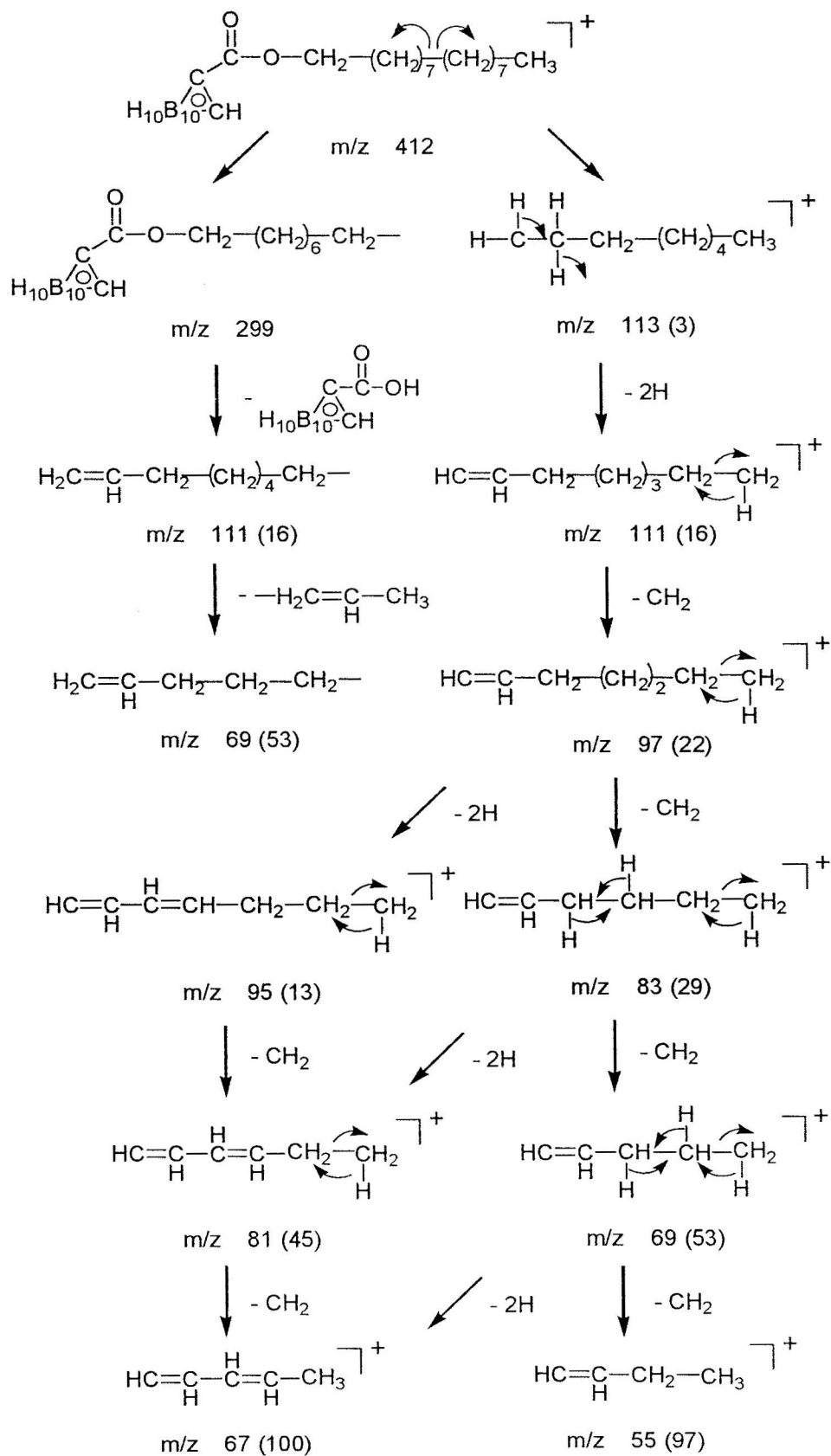
สารประกอบ PT พบสัญญาณเรโซแนนซ์ (ดังภาพประกอบ 30-31) ปรากฏที่ 161.06, 68.87, 56.86 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของ C ของหมู่ C=O, CH₂ – O, C – H (carborane) ตามลำดับ พบสัญญาณที่ 31.91, 29.66, 29.47, 29.36, 28.98, 28.13, 25.50, 22.68 ppm เป็นสัญญาณ 14C ของหมู่ CH₂ และ พบสัญญาณที่ 14.03 ppm เป็นสัญญาณ C ของหมู่ CH₃

สารประกอบ AR พบสัญญาณเรโซแนนซ์ (ดังภาพประกอบ 42-43) ปรากฏที่ 161.11, 68.91, 56.88 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของ C ของหมู่ C=O, CH₂ – O, C – H (carborane) ตามลำดับ พบสัญญาณที่ 31.92, 29.69, 29.65, 29.59, 29.48, 29.38, 29.36, 28.99, 28.16, 25.52, 22.69 ppm เป็นสัญญาณ 18C ของหมู่ CH₂ และ พบสัญญาณที่ 14.11 ppm เป็นสัญญาณ C ของหมู่ CH₃

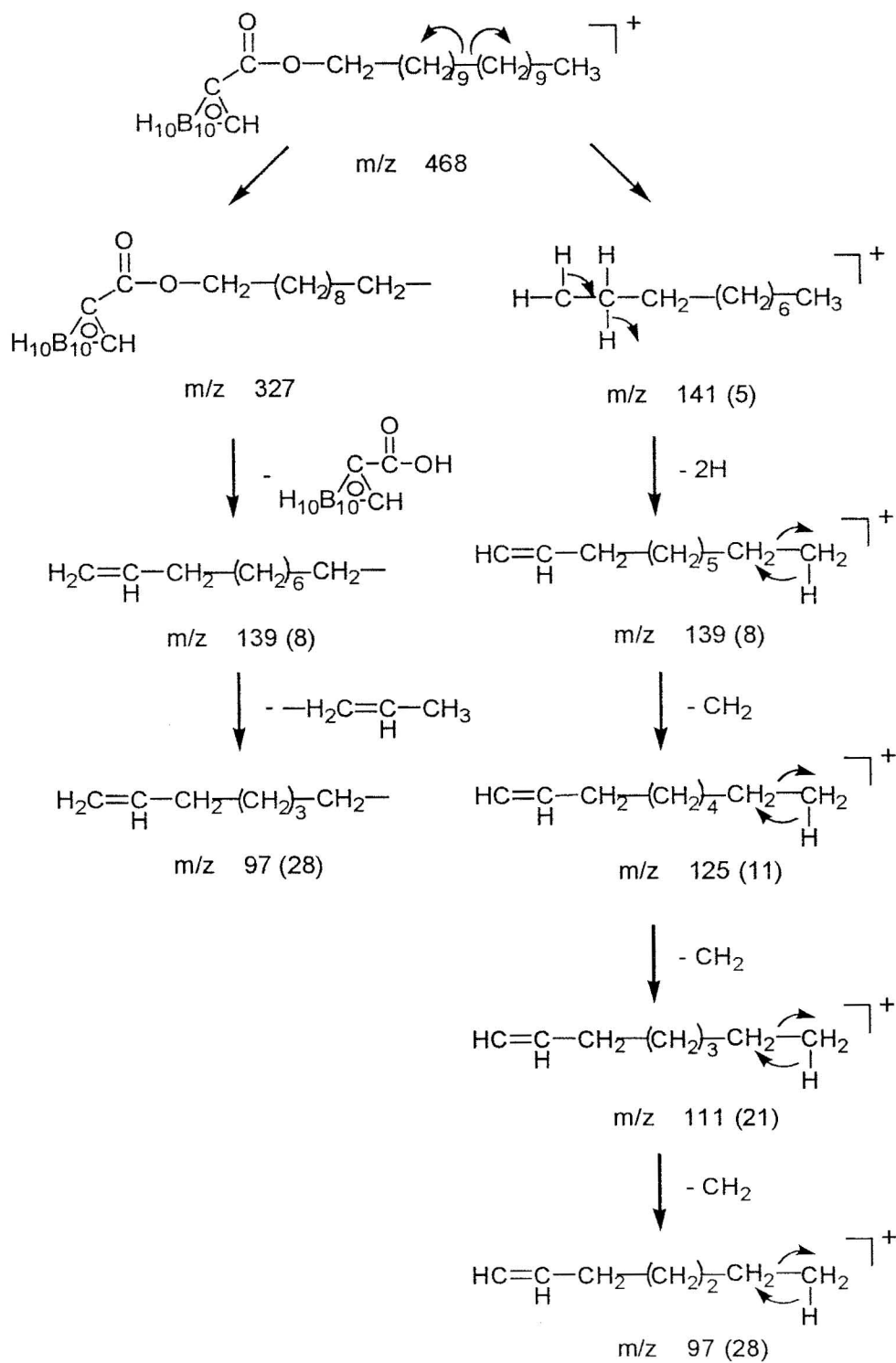
จากข้อมูลจะเห็นว่าหมู่ CH₂ ของสารประกอบ PT และ AR แสดงสัญญาณของคาร์บอนไม่ครบตามจำนวนอะตอมของคาร์บอนเนื่องจากมีบางสัญญาณซ้อนทับกัน

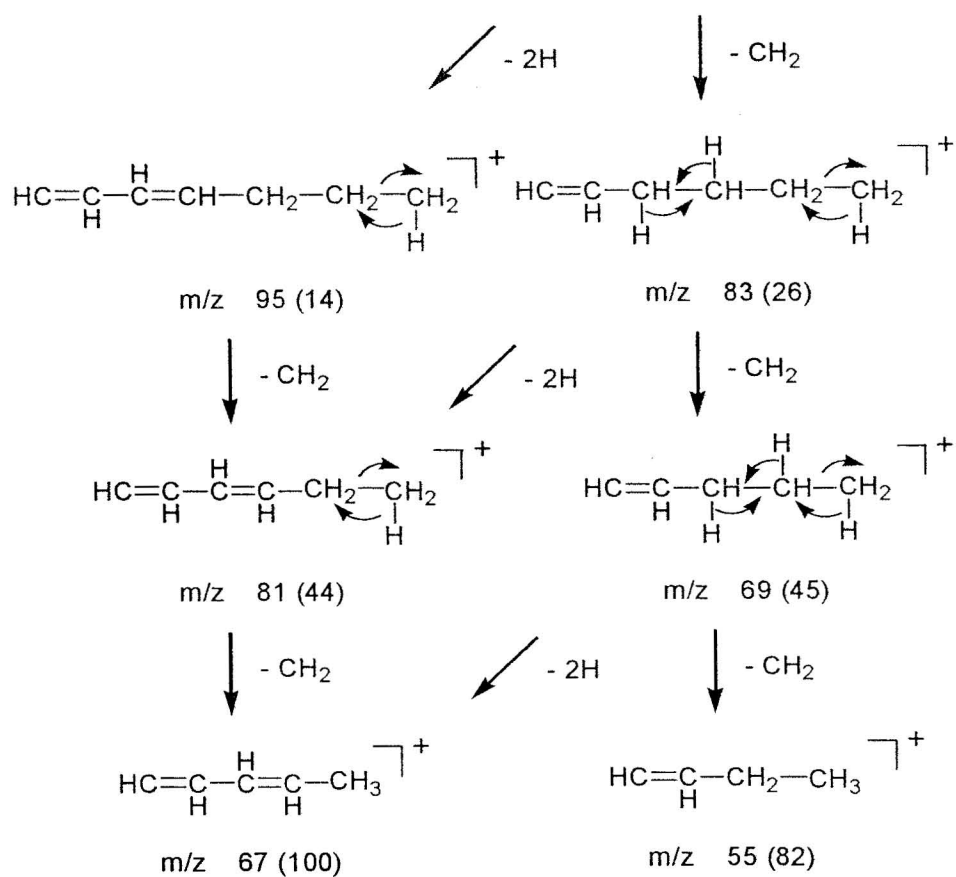
ข้อมูลทาง Gas-Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS)

สารประกอบ PT ไม่เห็น molecular ion (M^+) (ดังภาพประกอบ 35) มีการแตกพันธะ ดังนี้



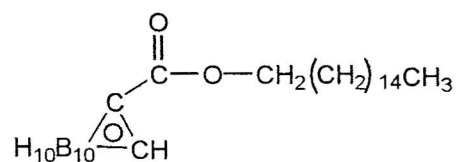
สารประกอบ AR ไม่เห็น molecular ion (M^+) (ดังภาพประกอบ 47) มีการแตกพันธะ ดังนี้



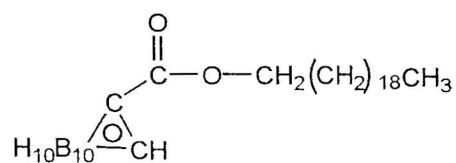


จากการพิจารณาข้อมูลทาง spectroscopy ของสารประกอบ PT และ AR สรุปได้ว่า สารที่สังเคราะห์ได้มีสูตรโครงสร้างถูกต้องและมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งมีโครงสร้าง ดังนี้

สารประกอบ PT



สารประกอบ AR

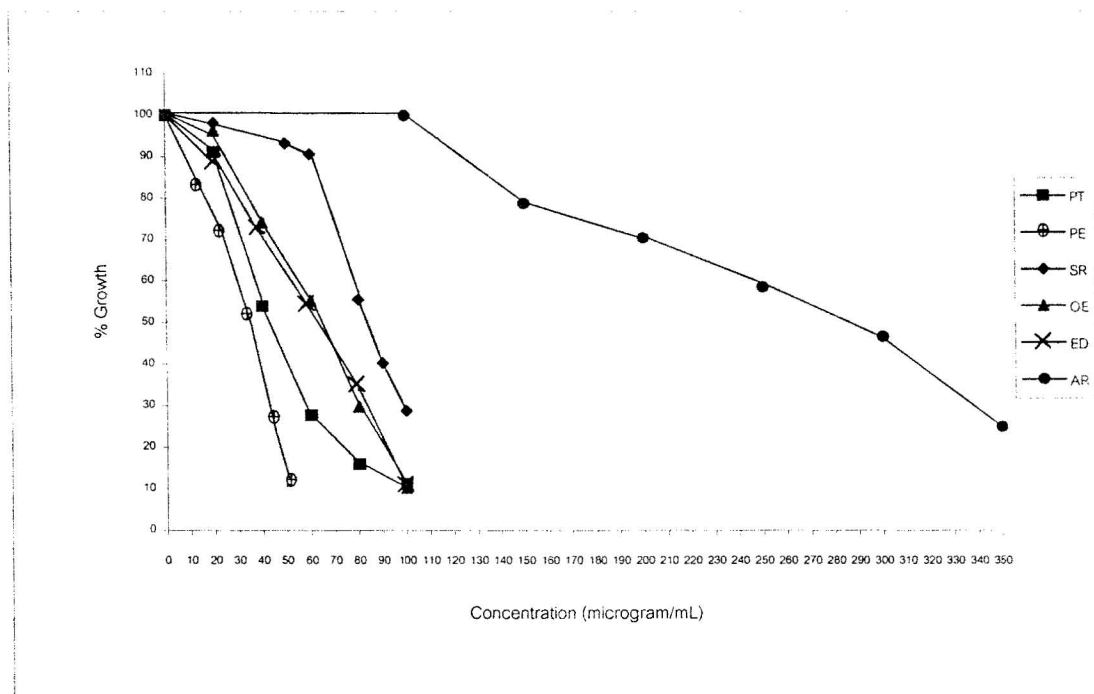


สารประกอบ PT และ AR ที่สังเคราะห์ได้มีโครงสร้างที่เสถียร โดยสารประกอบ PT มีลักษณะเป็นของเหลวใส มีจุดเดือด 160°C ปริมาณของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 51.5 % ส่วนสารประกอบ AR มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลว 48°C ปริมาณของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 60.5 %

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) ซึ่งมีการเจริญเติบโตโดยเกาะติดผิวขวดเลี้ยงเซลล์ ส่วนเซลล์ที่ตายแล้ว (cell debris) จะลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนั้น การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งจะใช้วิธีวัดปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ เพราะเซลล์ที่ตายแล้วจะถูกล้างออกไปพร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ จึงไม่ผลรบกวนต่อการวัดปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ในการวัดปริมาณโปรตีนของเซลล์จะใช้ผลในวันที่ 4 นับจากวันที่เริ่มทำการทดลอง เนื่องจากเซลล์มะเร็งอยู่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดและมีจำนวนมากพอที่จะสังเกตเห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมกับเซลล์ที่ได้รับสารที่นำมาทดสอบชัดเจน ในการวัดปริมาณโปรตีนนี้ใช้ตามวิธีของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ซึ่งเป็นวิธีของโอยามาและอีเกิล (Oyama and Eagle, 1956 : 305-307) ร่วมกับวิธีคัลเลอรีเมตริกของเลารี (Lowry, et al. 1951 : 265-275) โดยการใช้ Folin-Ciocalteu Phenol reagent ทำปฏิกิริยากับโปรตีนให้เกิดสี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงโดยใช้ Spectrophotometer ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงมากแสดงว่ามีปริมาณโปรตีนมาก ซึ่งก็คือมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มากด้วย ในการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารประกอบ PT และ AR นี้ ได้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของ PT และ AR คือ 43.0 และ $287.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (ดังภาพประกอบ 48 และ 49 ตามลำดับ) ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา ถือว่าสารประกอบ PT และ AR มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่ำ เนื่องจากเกณฑ์มาตรฐานดังกล่าว กำหนดว่า สารสังเคราะห์บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มีการเจริญเติบโตโดยเกาะติดขวดเลี้ยงเซลล์จะต้องมีค่า $\text{IC}_{50} \leq 4\text{ }\mu\text{g/mL}$

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองของสารประกอบ PT และ AR กับสารประกอบ SR, OE, ED และ PE (ฉลอง ทุ่มพุ่ม, 2543) ซึ่งมีค่า IC_{50} เป็น 83.1, 64.5, 63.5 และ $36.7\text{ }\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ พบว่าสารประกอบที่มีจำนวนคาร์บอนในกรดไขมันต่ำ คือ PT ($\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$) และ PE ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$) มีประสิทธิภาพยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า OE (*cis*- $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$), ED (*trans*- $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$), SR ($\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_2$) และ AR

($C_2B_{10}H_{11}COOC_{20}H_{41}$) ตามลำดับ และ พบว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างของกรดไขมันเป็นพันธะคู่จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นพันธะเดี่ยว เมื่อจำนวนคาร์บอนในกรดไขมันเท่ากัน (ดังภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 18 การเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารประกอบ PT, PE, SR, OE, ED และ AR ต่อ HeLa cell

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลล์มะเร็งของกรด HNO_3/H_2O_2 และกรด $HClO_4/H_2O_2$ โดยเตรียม stock boron solution ของกรด H_3BO_3 ให้มีความเข้มข้นของโบรอนเป็น $400 \mu g/mL$ จากนั้นปิเปตใส่เข้าไปในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีจำนวน HeLa cell เป็น 6×10^5 เซลล์/ขวด เลี้ยงเซลล์ จำนวน 1.00, 0.80, 0.60, 0.40, 0.20, 0.10 และ 0.05 mL จะได้ความเข้มข้นของโบรอนเป็น 100, 80, 60, 40, 20, 10 และ $5 \mu g/mL$ ตามลำดับ บ่มไว้ใน $5\%CO_2$ $37^\circ C$ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย่อยสลายด้วยกรด HNO_3/H_2O_2 และกรด $HClO_4/H_2O_2$ แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 25 mL จะได้ความเข้มข้นของโบรอนเป็น 16.00, 12.80, 9.60, 6.40, 3.20, 1.60 และ $0.80 \mu g/mL$ แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณโบรอนด้วย ICP-AES เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพประกอบ 53 และ 54 ตามลำดับ) พบว่า ชุดที่ย่อยสลายด้วยกรด HNO_3/H_2O_2 วัดปริมาณโบรอนได้ 16.25, 13.01, 9.58, 6.43, 3.05, 1.45 และ

0.85 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนชุดที่ย่อยสลายด้วยกรด $\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ วัดปริมาณโบรอนได้ 16.15, 13.01, 9.55, 6.43, 3.15, 1.55 และ 0.80 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งค่าที่วัดได้จากการย่อยสลายเซลล์มะเร็งของกรดทั้งสองชนิดไม่ได้แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงเลือกใช้กรด HNO_3 ในการย่อยสลายเซลล์มะเร็งเพื่อหาปริมาณโบรอน เนื่องจากกรด HNO_3 มีราคาถูกกว่า

การวิเคราะห์หาปริมาณโบรอนที่เข้าไปในเซลล์มะเร็งที่ทำโดยเตรียมเซลล์มะเร็งจำนวน 6×10^5 เซลล์ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 3 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 incubator เป็นเวลาประมาณ 15 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะติดขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเตรียมสารละลายของ PT PE SR OE ED และ AR ให้มีความเข้มข้น 172.0, 146.8, 332.4, 258.0, 254.0 และ 1148.0 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยใช้ 0.05% CH_2Cl_2 และ 0.5% DMSO เป็นตัวทำละลายและใช้ 10% NCS ใน EMEM เป็นตัวเจือจาง บีเปิดสารละลายดังกล่าวจำนวน 1 mL ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ ปรับให้ปริมาตรสุทธิในขวดเลี้ยงเซลล์เป็น 4 mL ซึ่งจะมีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นที่ IC_{50} คือ 43.0, 36.7 83.1, 64.5, 63.5 และ 287.0 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 1, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลาที่กำหนดนำขวดเลี้ยง-เซลล์มาดูดส่วนที่เป็นของเหลวออกจนหมด ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 4 mL นำ PBS ที่ใช้ล้างไปรวมกับส่วนที่เป็นของเหลวที่ดูดออกมาในตอนแรกเก็บไว้เป็นส่วนของโบรอนที่ไม่เข้าไปในเซลล์ (extra cellular boron solution) เหลือเฉพาะเซลล์มะเร็งในขวดเลี้ยงเซลล์เก็บไว้เป็นส่วนของโบรอนที่เข้าไปในเซลล์ (intra cellular boron) นำทั้งสองส่วนมาย่อยสลายโดยเติม HNO_3 1 mL และ H_2O_2 2 mL ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 75 $^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้มีปริมาตรเป็น 25 mL นำไปตรวจวัดปริมาณโบรอนด้วย ICP – AES เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพประกอบ 55) พบว่าไม่ตรวจพบโบรอนในส่วน of intra cellular boron แสดงว่าสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันทั้ง 6 ชนิดอาจเข้าไปในเซลล์มะเร็งน้อยกว่าค่า BEC (Background Equivalent Concentration) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของโบรอนต่ำสุดที่เครื่อง ICP-AES สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.16 $\mu\text{g/mL}$ หรือสารประกอบทั้ง 6 ชนิด อาจไม่เข้าไปในเซลล์มะเร็งเลย (ผลการทดลองดังตาราง 10-15)

จากขั้นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจะเห็นว่า สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันทั้ง 6 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ จากโครงสร้างของสารจะเห็นว่า สารประกอบทั้ง 6 ชนิด มีสมบัติการละลายน้ำน้อยมากจนเกือบไม่ละลายเลย ซึ่งองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่เป็นน้ำ ดังนั้นจึงต้องใช้ CH_2Cl_2 และ DMSO เป็นตัวช่วยให้สารประกอบทั้ง 6 ชนิดละลายเข้ากันกับน้ำได้ จึงเป็นไปได้ว่า การที่สารประกอบมีความเป็นพิษ

ต่อเซลล์มะเร็งต่ำเนื่องจากสารประกอบทั้ง 6 ชนิดไม่เข้าไปในเซลล์มะเร็ง เนื่องจากความสามารถของการละลายของสาร ซึ่งถ้านำสารประกอบนี้ไปใช้รักษามะเร็งด้วยวิธี BNCT ก็จะไม่ได้ผล ดังนั้นควรสังเคราะห์สารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันให้มีโครงสร้างที่ทำให้มีสมบัติการละลายน้ำได้ดีขึ้น เช่น การเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิล สังเคราะห์ให้อยู่ในรูปของเกลือ การลดขนาดของชีวโมเลกุล เป็นต้น เพื่อให้สามารถพาโบรอนเข้าสู่เซลล์มะเร็งและนำไปประยุกต์สำหรับ BNCT ต่อไปได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

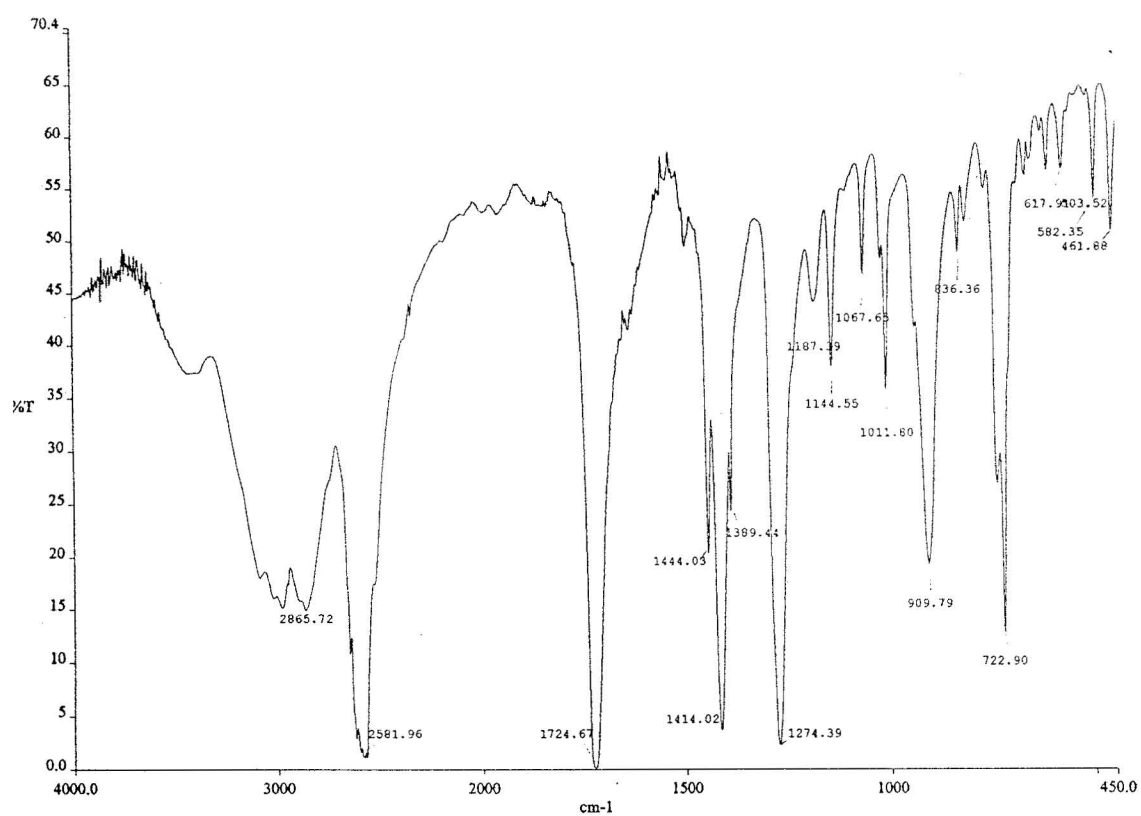
- ฉลอง ทุ่มพุ่ม. (2543). *การสังเคราะห์และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบโบรอนอนุพันธ์ของกรดไขมันบางชนิด*. ปรินญานิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- หทัยชนก ศรีใส. (2539). *ความสามารถในการรวมตัวของสารประกอบโบรอนกับไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ*. ปรินญานิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- Barth, F. R., Soloway, H. A. and Fairchild, G. R. (1990). "Boron Neutron Capture Therapy of Cancer," *Cancer Res.* 50 : 1061-1070.
- Barth, F. R., et al. (2002). "Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor for Neutron Capture Therapy of Gliomas," *Cancer Res.* 62 : 3159-3166.
- (2002). "Neutron Capture Therapy of Intracerebral Melanoma : Enhanced Survival and Cure after Blood-Brain Barrier Opening to Improve Delivery of Boronophenylalanine," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 52 : 858-868.
- Bregadze, I. (1992). "Dicarba-closo-dodecaboranes $C_2B_{10}H_{12}$ and their Derivatives," *Chem. Rev.* 2(92) : 209-223.
- Coderre, A. J., et al. (1990). "Selective Delivery of Boron by the Melanin Precursor Analogue *p*-Boronophenylalanine to Tumors other than Melanoma," *Cancer Res.* 50 : 138-141.
- Foster, Dee Snell and Clifford, Hilton L. (1968). *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*. V.7. p. 384-418. New York : VCH.
- Funabashi, H., et al. (1989). "Binding Site of Cerulenin in Fatty Acid Synthetase," *J. Biochem.* 5(105) : 751-755.
- Jones, J. B. (1982). "Simultaneous Determination of Total Boron, Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Phosphorus, Potassium and Zinc in Fertilizers by Inductively Coupled Argon Plasma Emission Spectroscopy," *J. Asso. Off. Anal. Chem.* 4(65) : 781-785.

- Laakso, J., et al. (2000). "Monitoring Total Boron in Blood for BNCT by a Novel Atomic Emission Method," *The Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer*. p. 63-64. Osaka Japan.
- Lowry, O. H., et al. (1951). "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *J. Bio. Chem.* 195 : 265-275.
- Lunato, J., et al. (1999). "Synthesis of 5-(carboranylalkylmercapto)-2'-deoxyuridines and 3-(carboranylalkylthymidines and their Evaluation as Substrates for Human Thymidine Kinase 1 and 2," *J. Med. Chem.* 17(42) : 3378-3389.
- Nakamura, H., Sekido, M. and Yamamoto, Y. (1997). "Synthesis of Carboranes Containing an Azulene Framework an *in vitro* Evaluation as Boron Carriers," *J. Med. Chem.* 18(40) : 2528-2530.
- Nakamura, H., Aoyagi, K. and Yamamoto, Y. (1998). "Tetrabutylammonium Fluoride Promoted Novel Reactions of o-Carborane : Inter- and Intramolecular Additions to Aldehydes and Ketones and Annulation via Enals and Enones," *J. Am. Chem. Soc.* 120 : 1167-1171.
- Nakamura, H., et al. (2000). "Synthesis and *in vivo* Evaluation of Carborane Gadolinium-DTPA Complex as an MR Imaging Boron Carrier," *The Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer*. p. 125-126. Osaka Japan.
- Nemoto, H., Cai, J. and Asao, N. (1995). "Synthesis and Biological Properties of Water Solubility, Cytotoxicity and Cellular Uptake," *J. Med. Chem.* 10(38) : 1673-1678.
- Oyama, V. and Eagle, H. (1956). "Measurement of Cell Growth in Tissue Culture with a Phenol Reagent (Folin-Ciocalteu)," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91 : 305-307.
- Pizer, S. E., et al. (1996). "Fatty Acid Synthase (FAS) : A Target for Cytotoxic Antimetabolites in HL60 Promyelocytic Leukemia Cells," *Cancer Res.* 56 : 745-751.

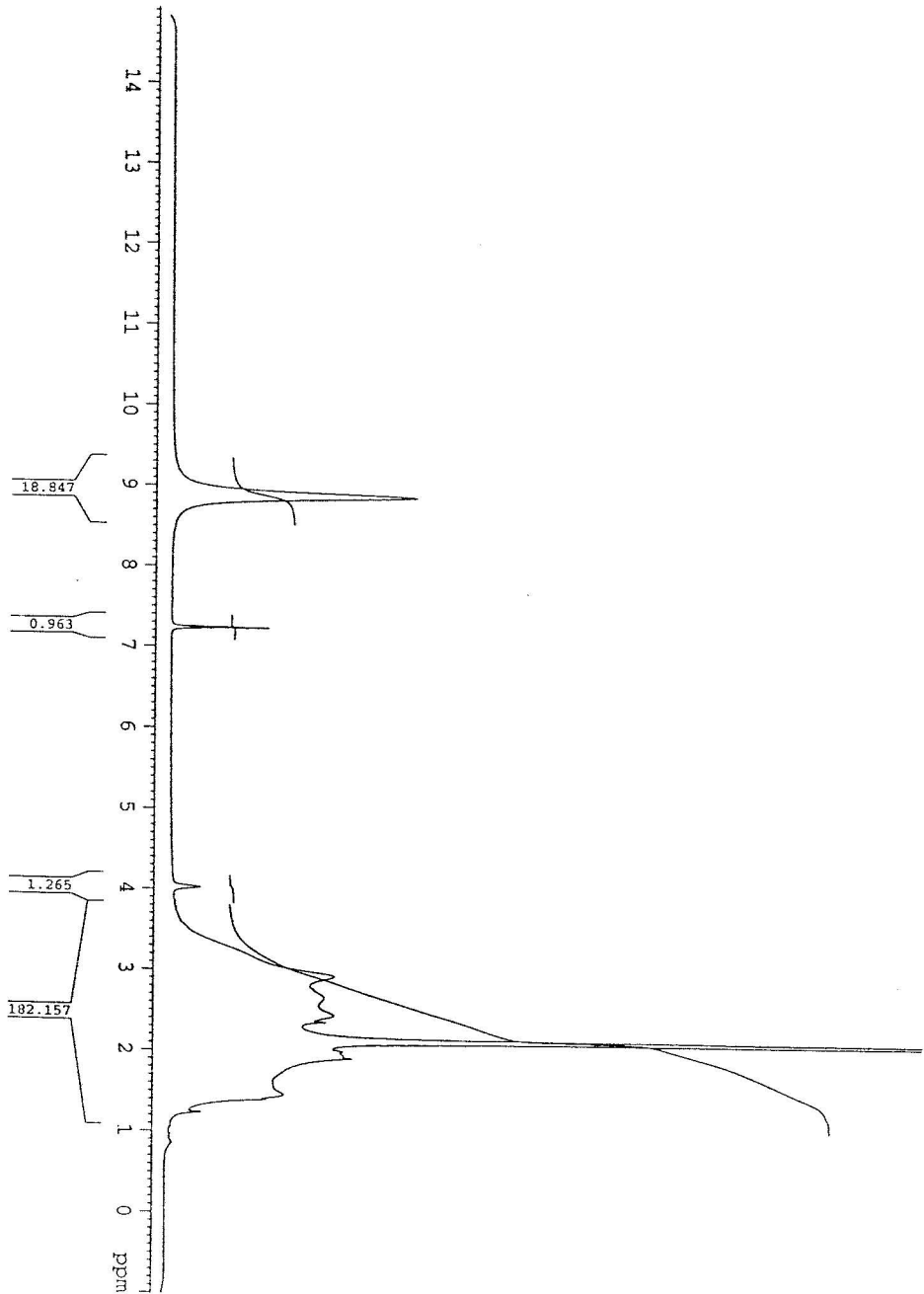
- Scobie, M. and Threadgill, D. M. (1994). "Tumour-targetted Boranes. Part 3. Synthesis Carbamate-linked Nitroimidazolyl Carboranes Designed for Boron Neutron Capture Therapy of Cancer," *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15(1) : 2059-2063.
- Setiawan, Y., et al. (1995). "Effect of L-¹⁰B-*p*-Boronophenylalanine-fructose and the Boron Neutron Capture Reaction on Mouse Brain Dopaminergic Neurons," *Cancer Res.* 55 : 874-877.
- Smith, R. D., et al. (2001). "Quatitative Imaging and Microlocalization of Boron-10 Brain Tumors and Infiltrating Tumor Cells by SIMS Ion Microscopy," *Cancer Res.* 61 : 8179-8187.
- Sood, A., Spielvogel, F. B. and Shaw, R. B. (1989). "Boron-Containing Nucleic Acids : Synthesis of Cyanoborane Adducts of 2'-Deoxynucleosides," *J. Am. Chem. Soc.* 111 : 9234-9235.
- Soloway, H. A., et al. (1998). "The Chemistry of Neutron Capture Therapy," *Chem. Rev.* 98 : 1515-1562.
- Sweet, W. H., et al. (1952). "The Possible Use of Neutron Capturing Isotopes Such a Boron-10 in the Treatment of Neoplasms I. Intracranial Tumors," *J. Neurosurg.* 9 : 200-209.
- Tamat, R. S. and Moore, E. D. (1987). "Determination of Boron in Biological Tissues by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry," *Anal. Chem.* 59 : 2161-2164.
- Tjarks, W., et al. (1992). "Synthesis and *in vitro* Evaluation of Boronated Uridine and Glucose Derimatives for Boron Neutron Capture Therapy," *J. Med. Chem.* 35 : 1628-1633.
- Yamamoto, Y. and Nakamura, H. (1993). "1-Carboranyl-3-(2-methylaziridino)-2-propanol Synthesis, Selective Uptake by B-16 Melanoma, and Selective Cytotoxicity toward Cancer Cells," *J. Med. Chem.* 15(36) : 2232-2234.

- Yamamoto, Y., et al. (1992). "Synthesis of Carboranes Containing Nucleoside Base Unexpectedly High Cytostatic and Cytocidal Toxicity towards Cancer Cells," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 157-158.
- Yoshida, F., et al. (2000). "Cell Cycle Dependence of Boron Uptake in Various Boron Compounds Used for Neutron Capture Therapy," *The Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer.* p. 57-58. Osaka Japan.
- Zeev, Alfassi B. (1994). *Determination of Trace Elements.* p. 217-254. New York : VCH.
- Zhuo, J., et al. (1999). "Synthesis and Biological Evaluation of Boron-Containing Polyamines as Potential Agents for Neutron Capture Therapy of Brain Tumors," *J. Med. Chem.* 42 : 1282-1292.

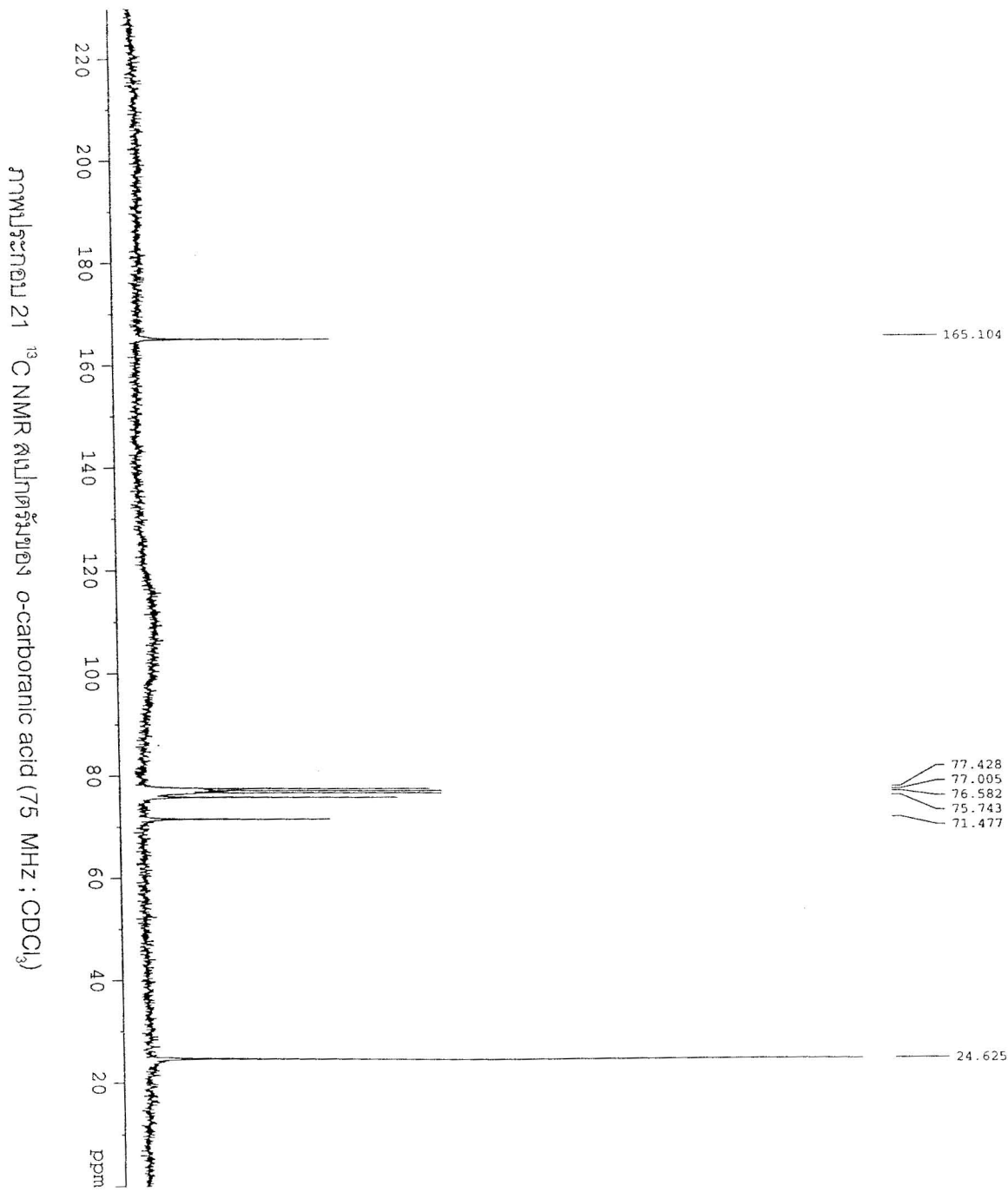
ภาคผนวก

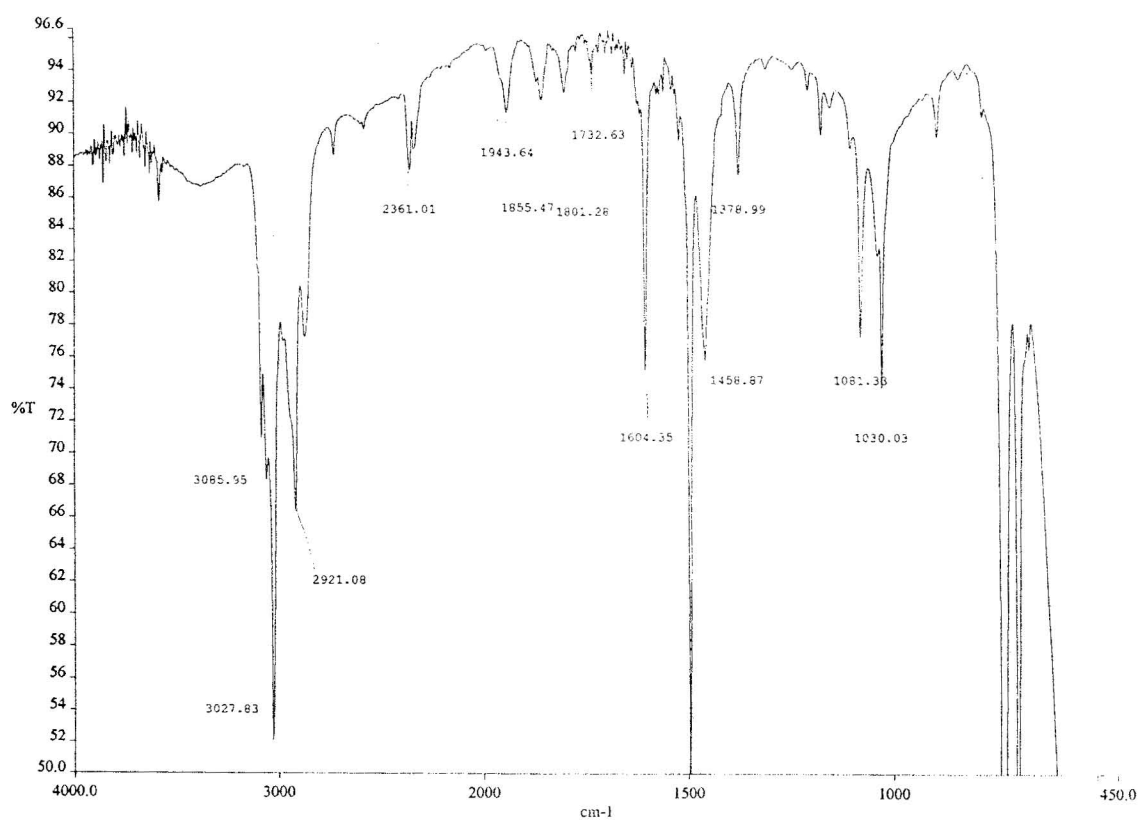


ภาพประกอบ 19 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ o-carboranic acid (KBr)

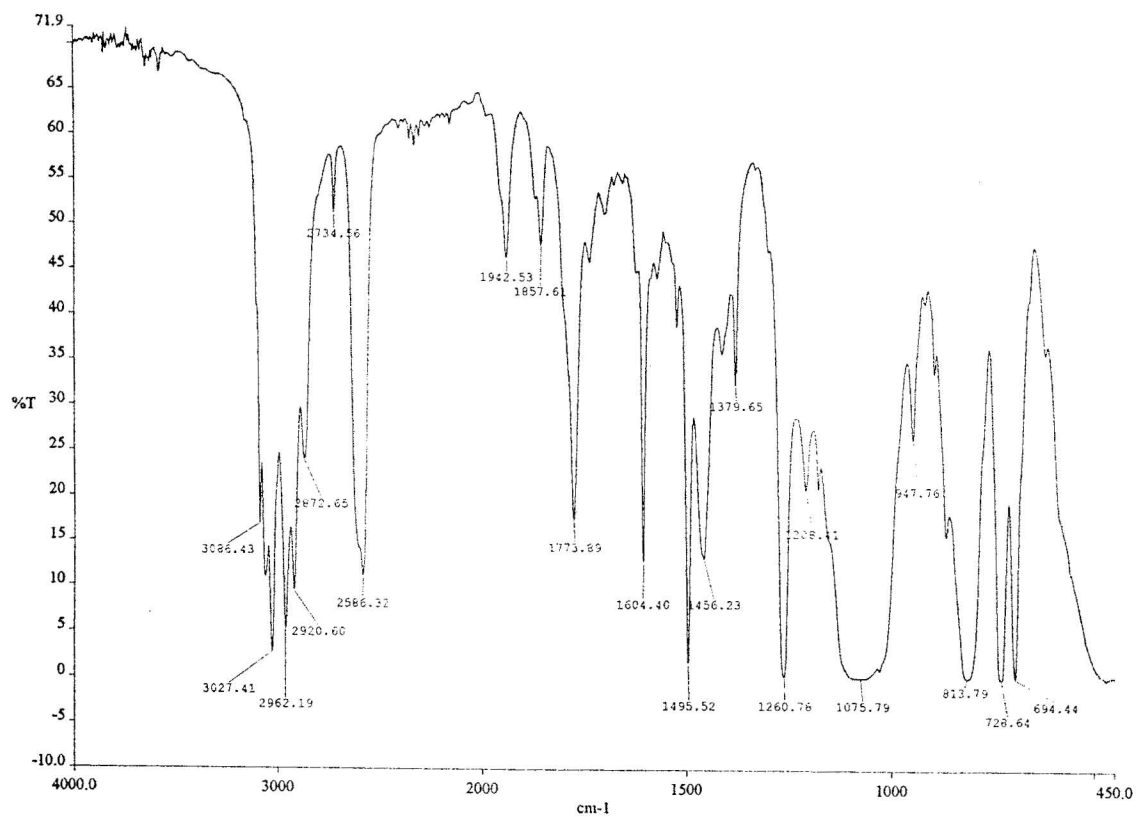


ภาพประกอบ 20 ^1H NMR สเปกตรัมของ o-carboranic acid (300 MHz ; CDCl_3)

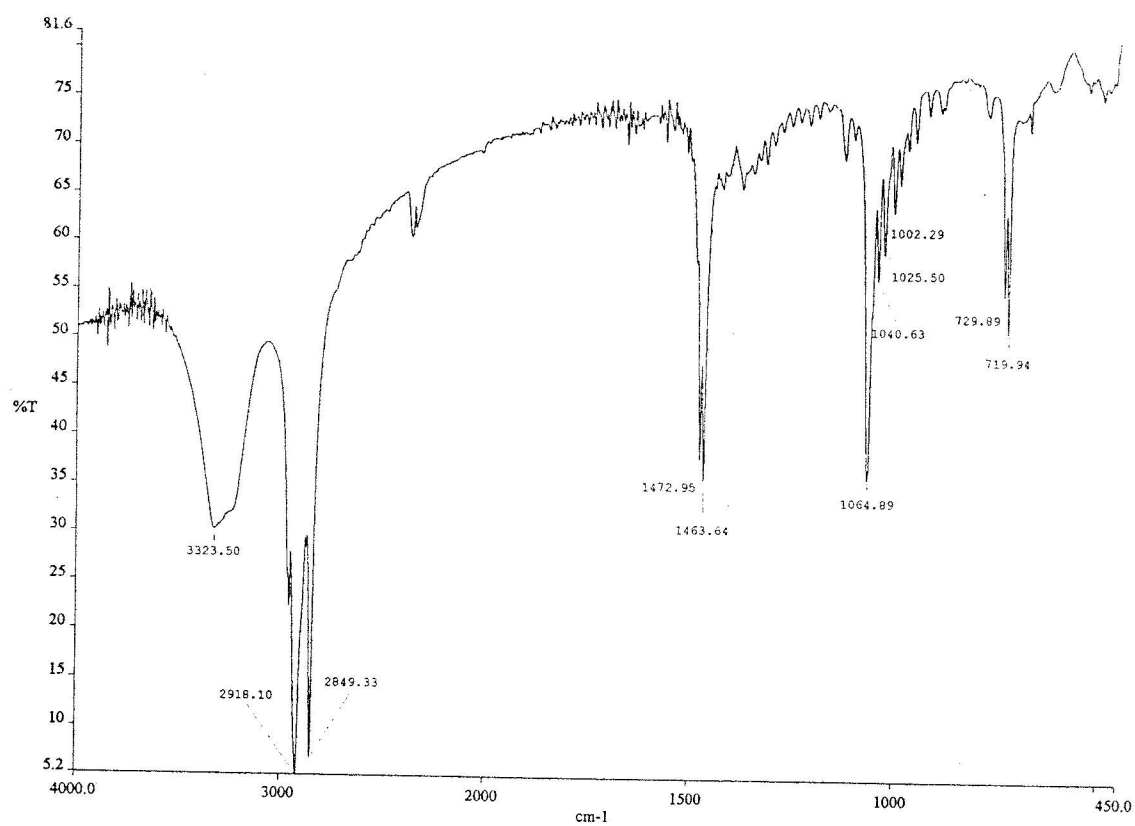




ภาพประกอบ 22 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ dried toluene (film)

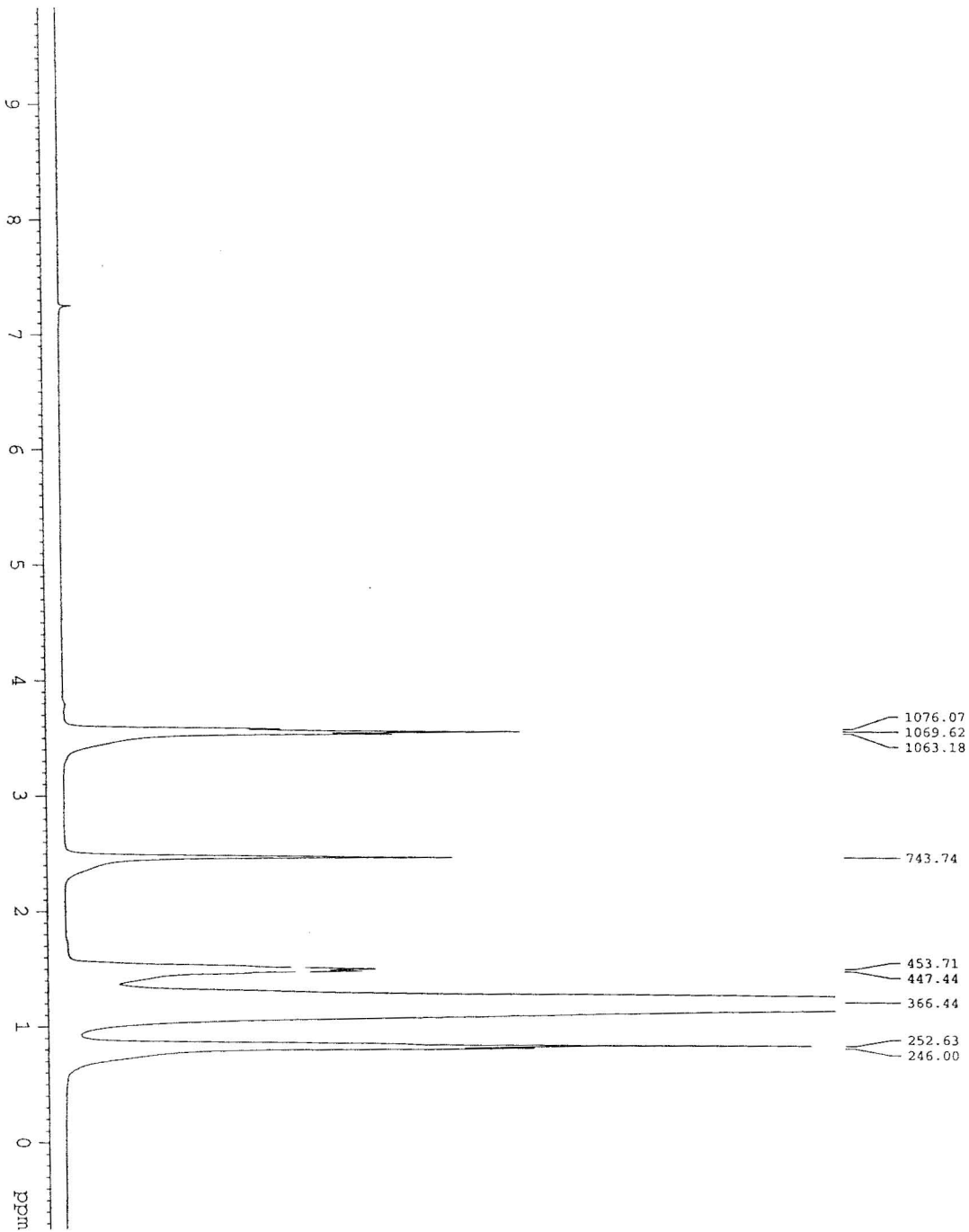


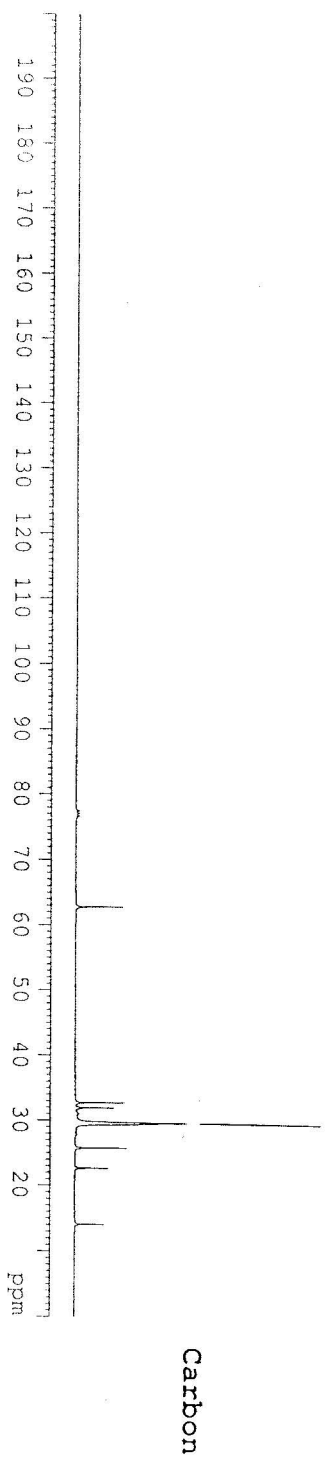
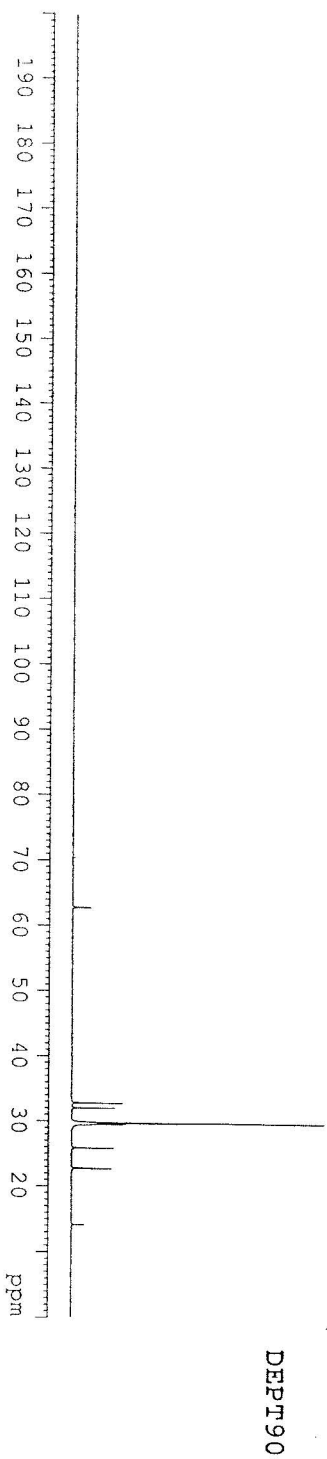
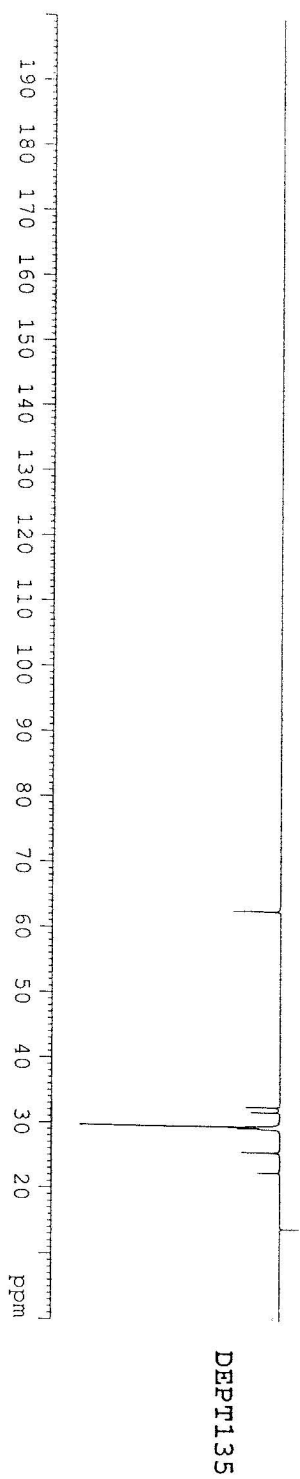
ภาพประกอบ 23 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ o-carboranyl chloride (film)



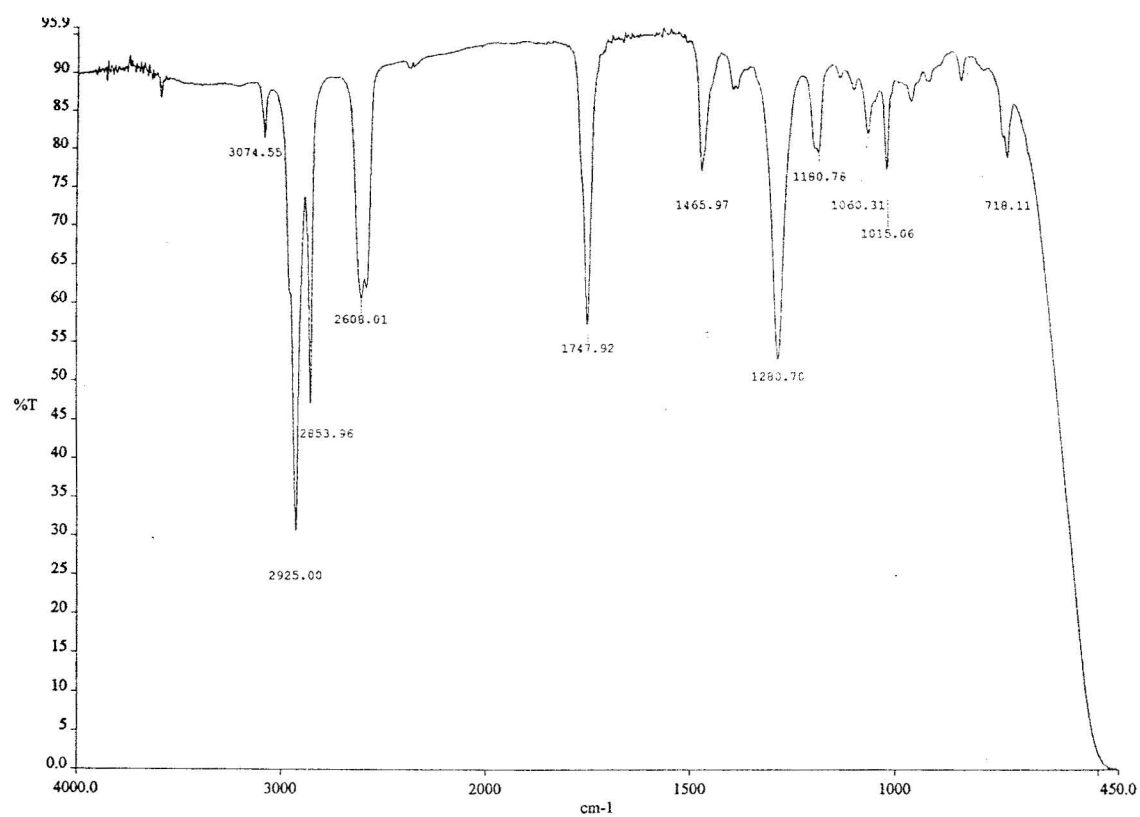
ภาพประกอบ 24 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ palmityl alcohol (KBr)

ภาพประกอบ 25 ^1H NMR สเปกตรัมของ palmityl alcohol (300 MHz ; CDCl_3)



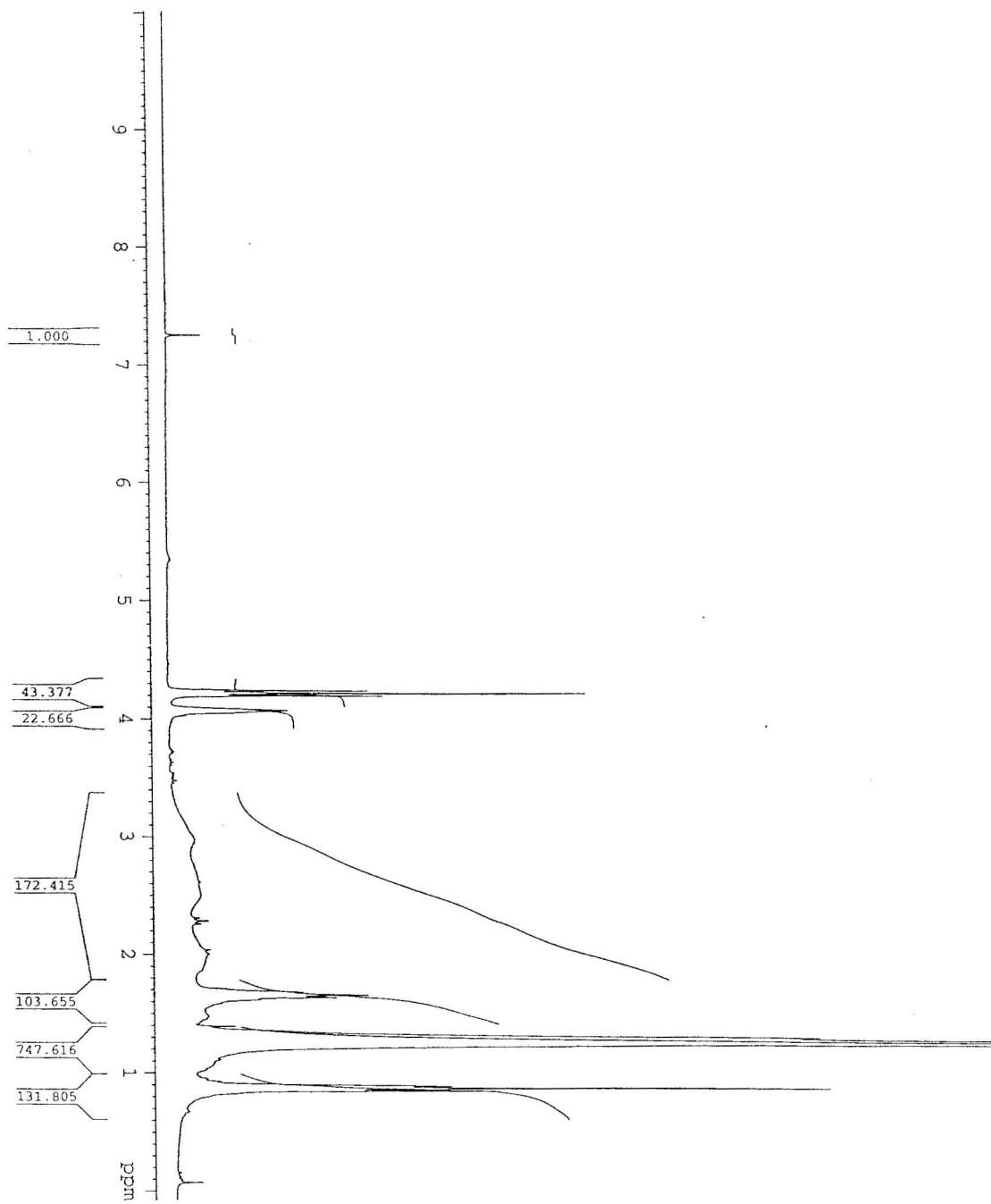


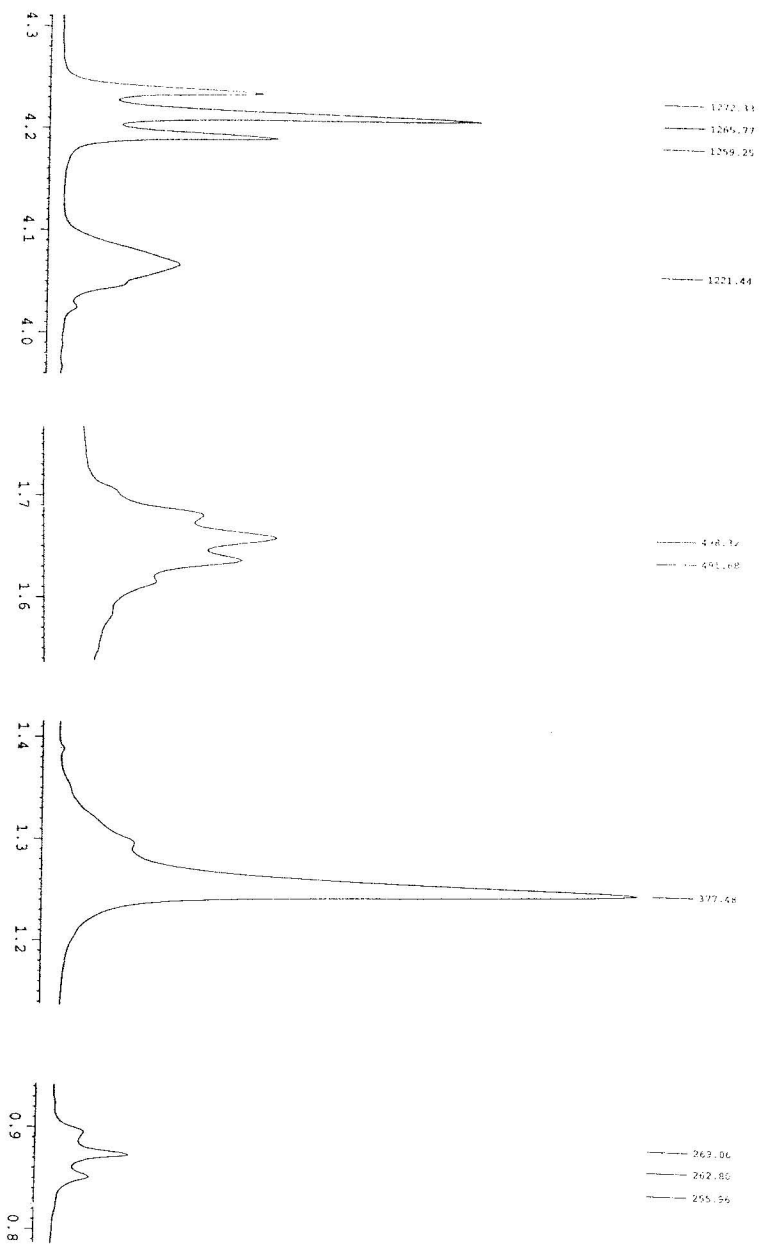
ภาพประกอบ 26 ¹³C NMR, DEPT90 และ DEPT135 ของ palmityl alcohol (75 MHz, 300 MHz ; CDCl₃)



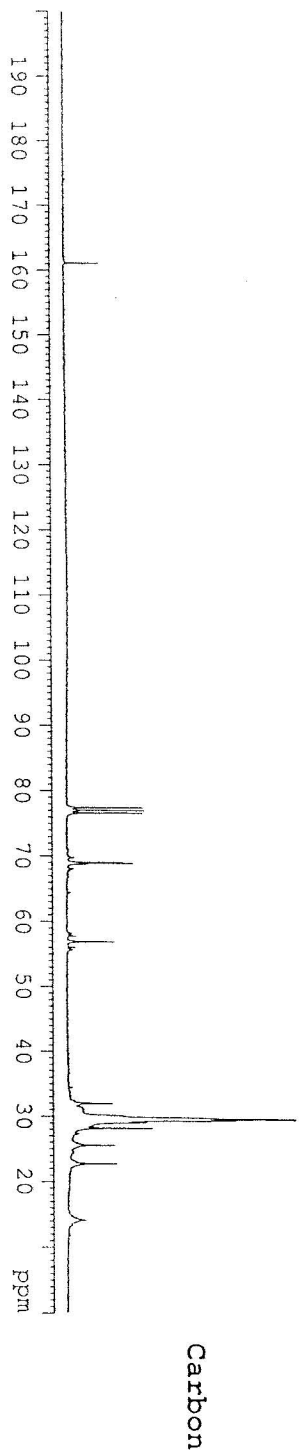
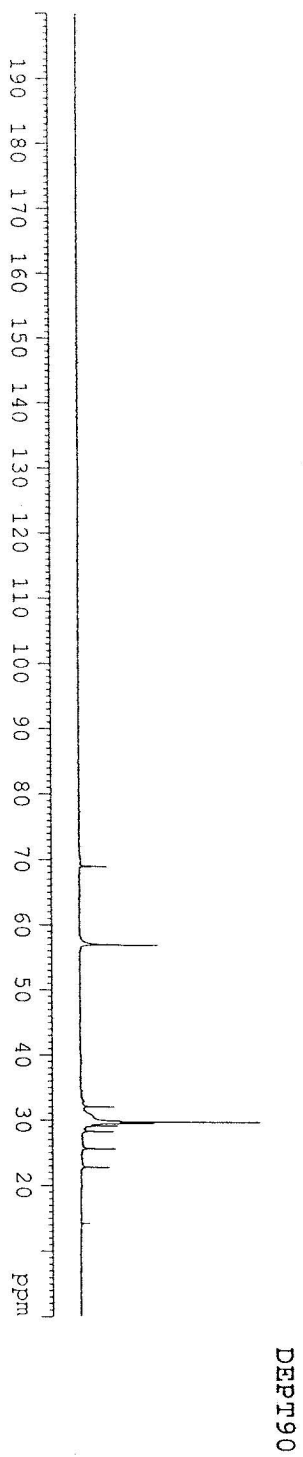
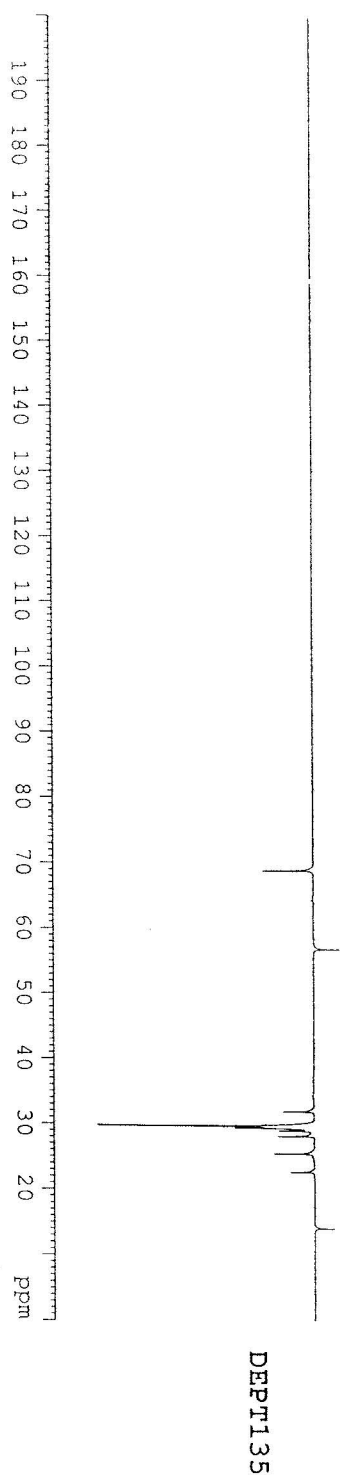
ภาพประกอบ 27 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ palmityl carborante (film)

ภาพประกอบ 28 ^1H NMR สเปกตรัมของ palmityl carboranate (300 MHz; CDCl_3)

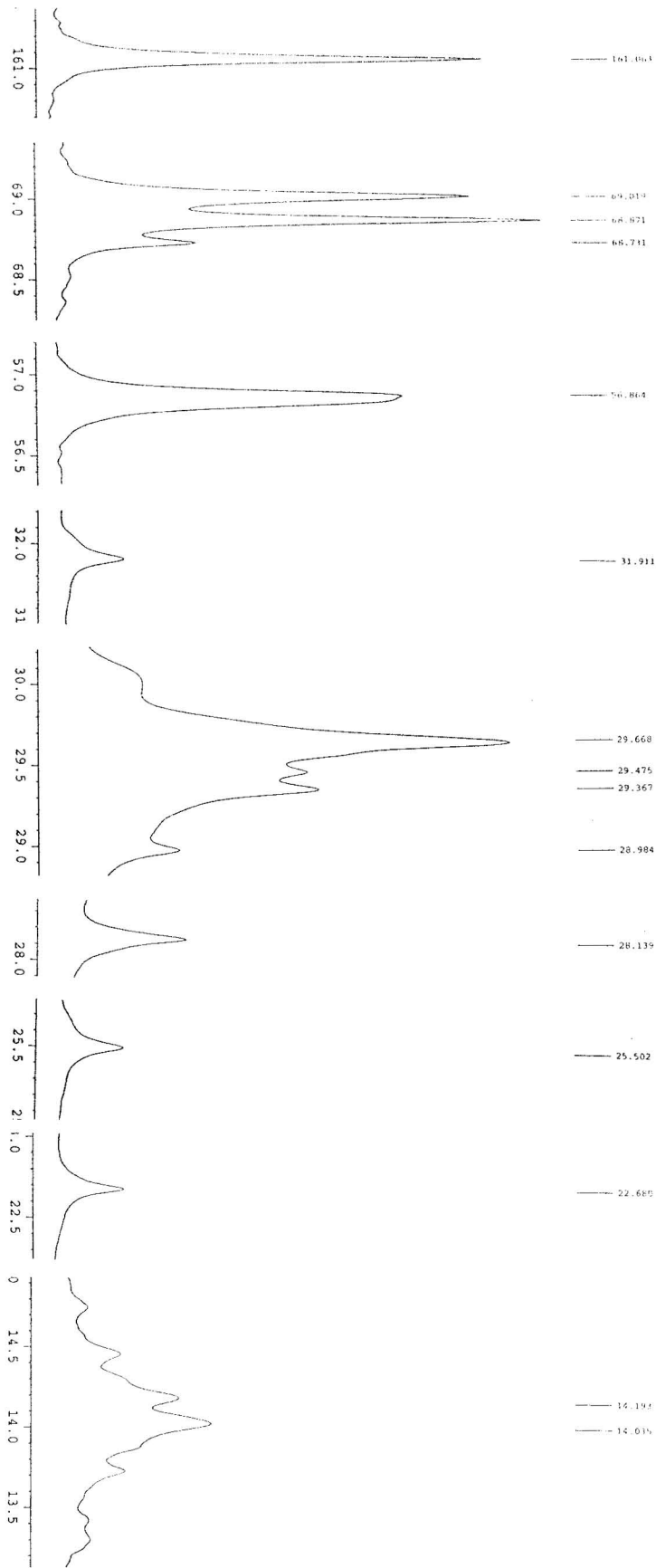




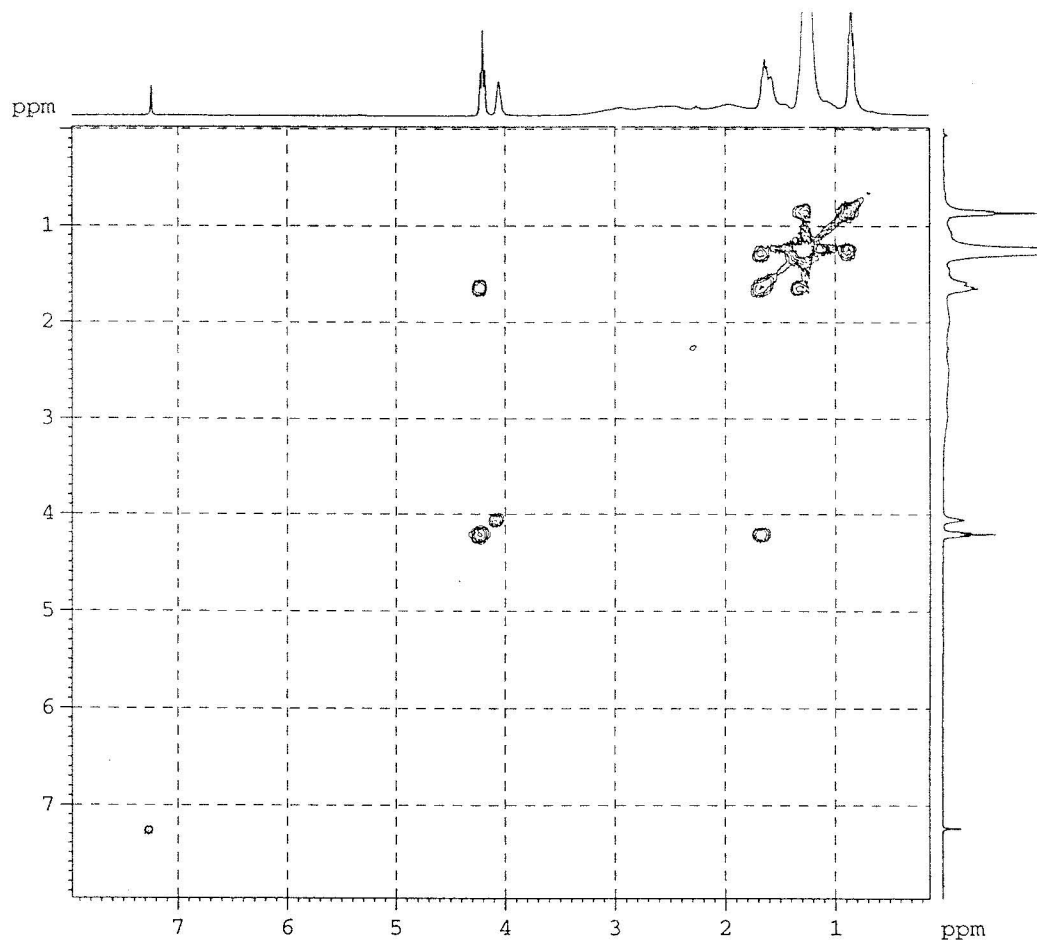
ภาพประกอบ 29 ขยายสัญญาณ ^1H NMR สเปกตรัมของ palmityl carboranate



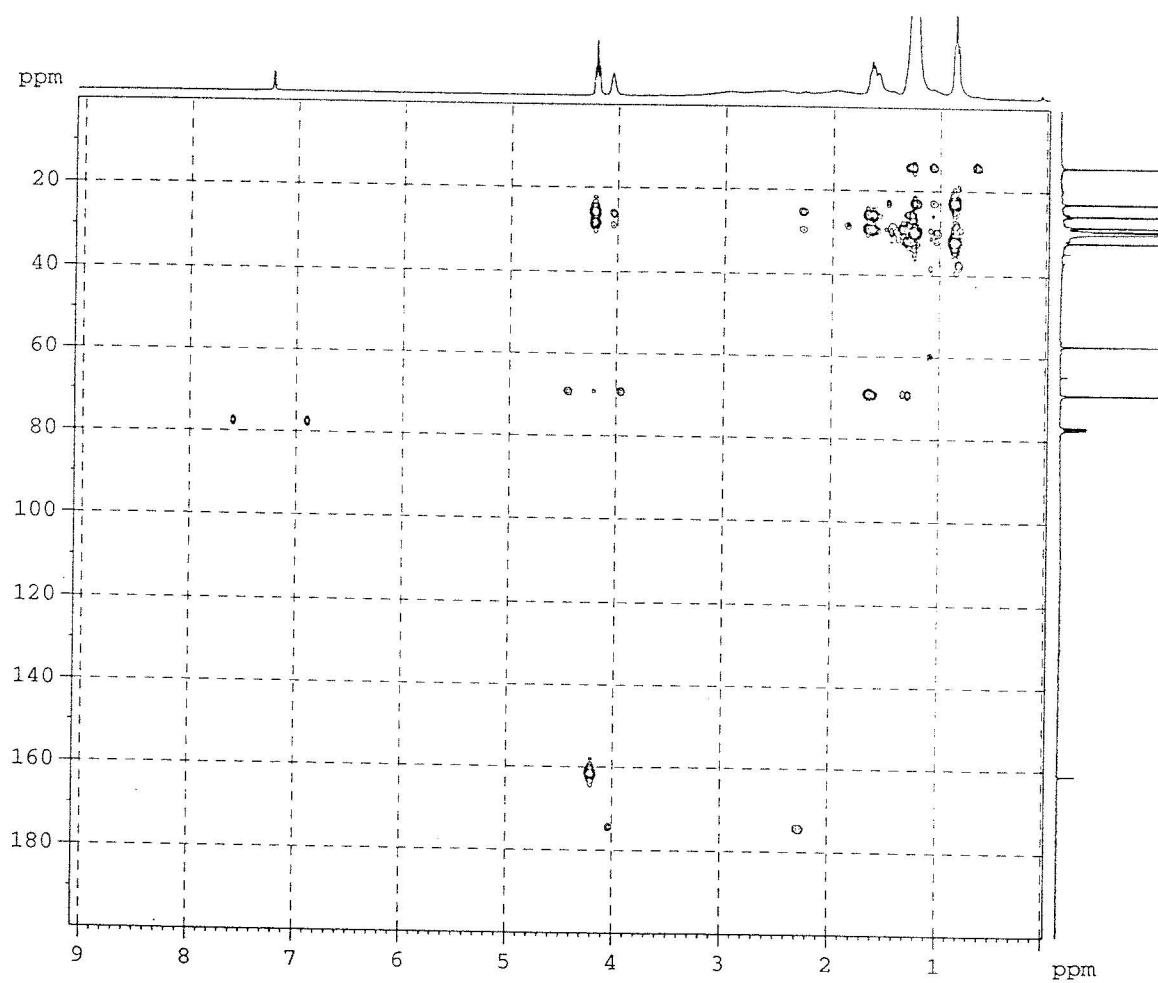
ภาพประกอบ 30 ^{13}C NMR, DEPT90 และ DEPT135 สเปกตรัมของ palmityl carboranate (75 MHz, 300 MHz ; CDCl_3)



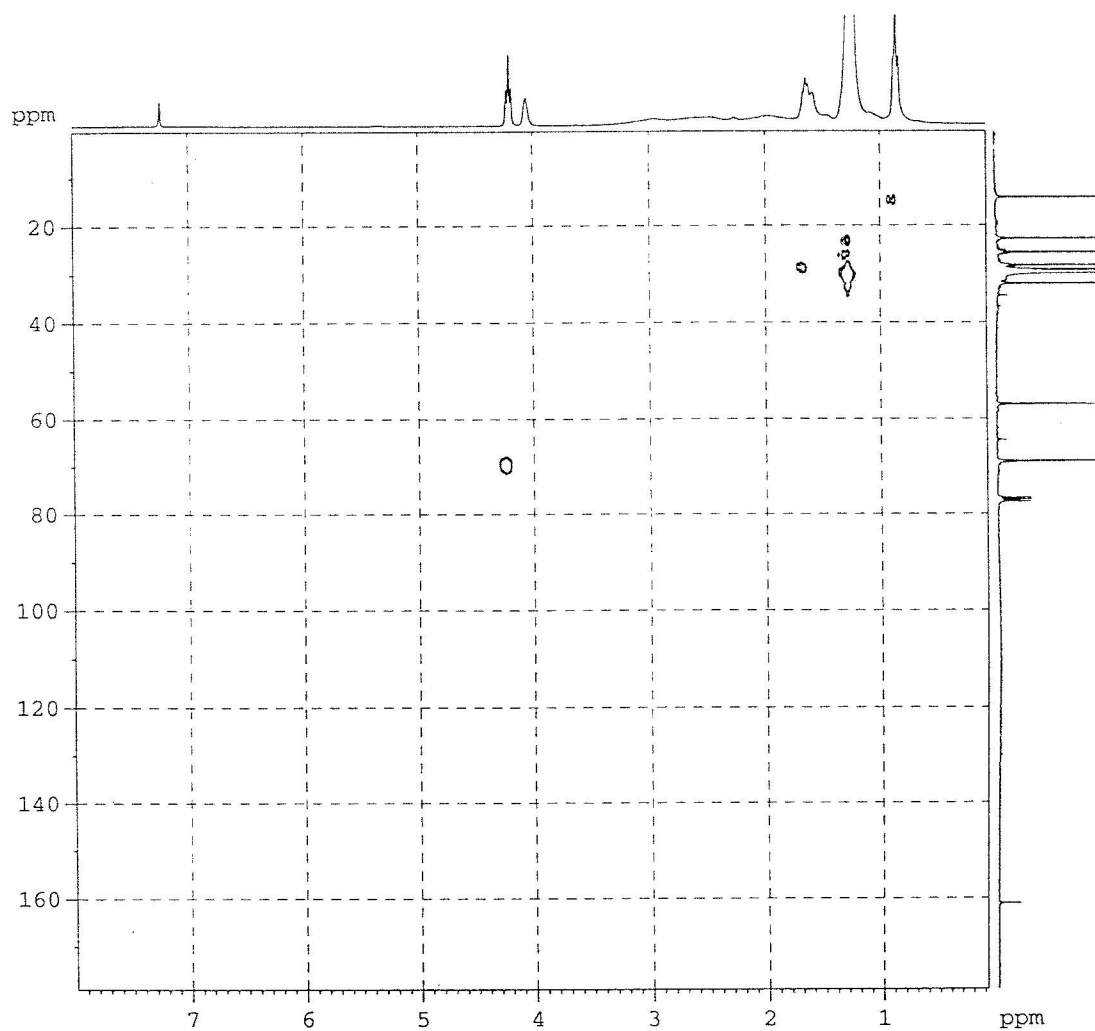
ภาพประกอบ 31 ขยายสัญญาณ ^{13}C NMR สเปกตรัมของ palmityl carboranate



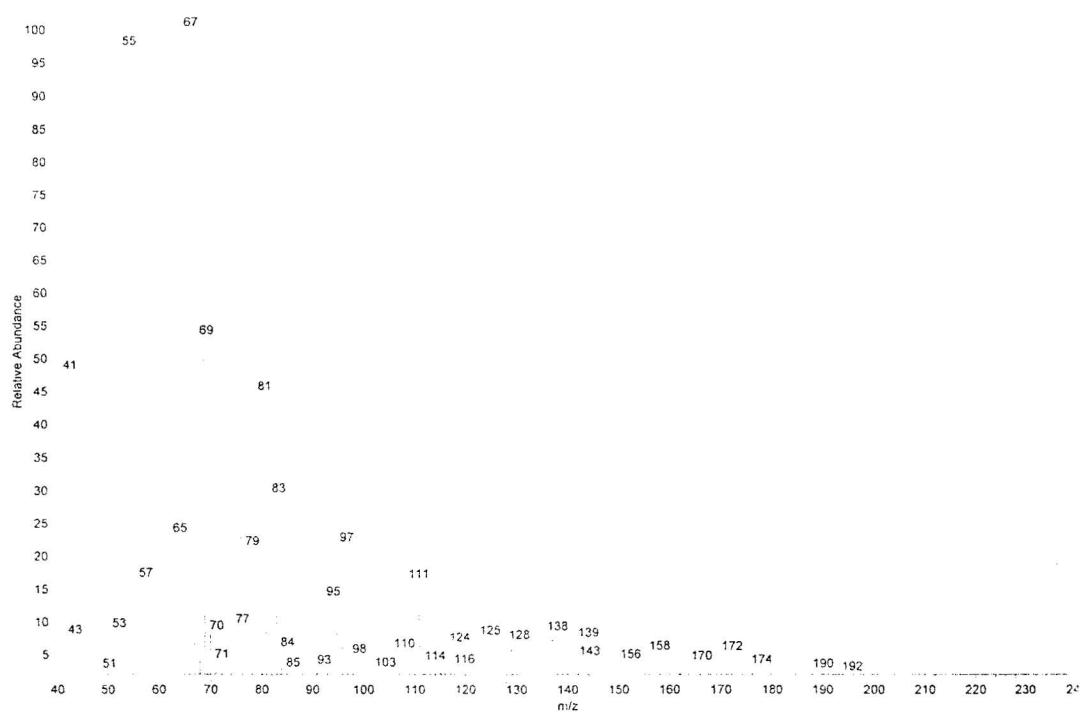
ภาพประกอบ 32 COSY สเปกตรัมของ palmityl carborane (300 MHz ; CDCl_3)



ภาพประกอบ 33 HMBC สเปกตรัมของ palmityl carborane (300 MHz ; CDCl₃)

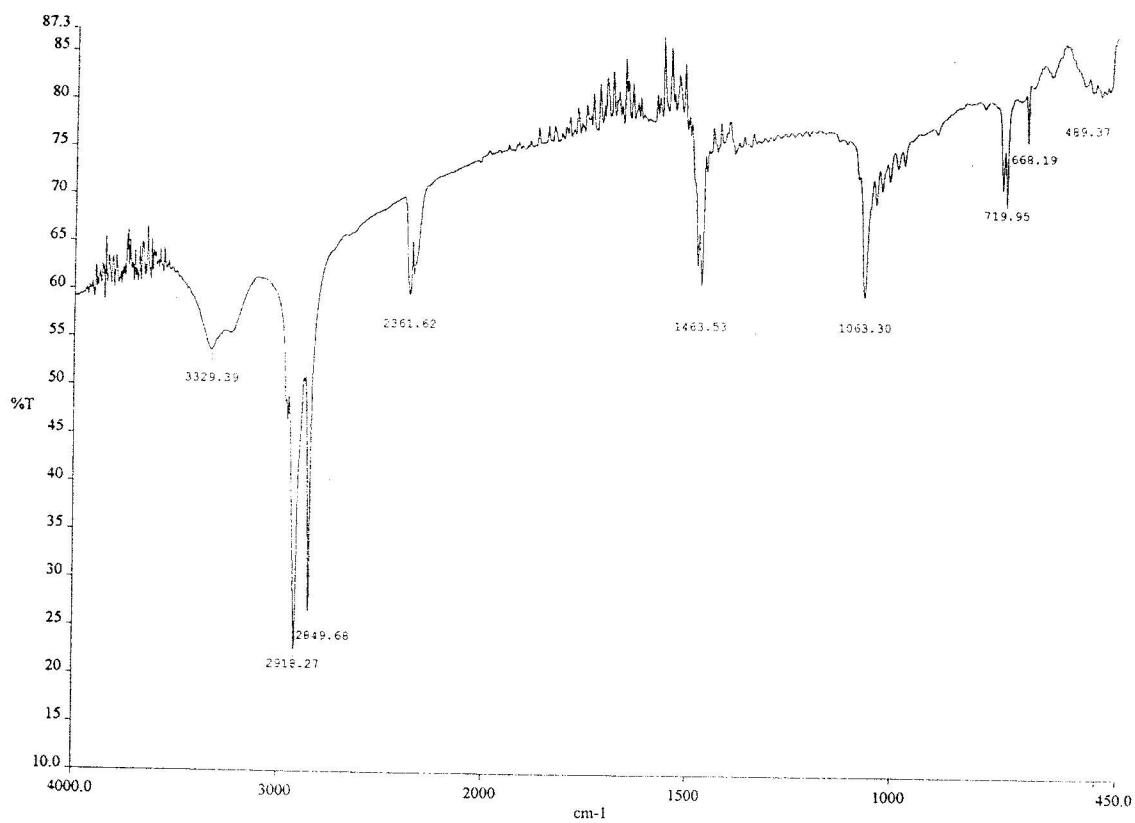


ภาพประกอบ 34 HMQC สเปกตรัมของ palmityl carborane (300 MHz ; CDCl_3)

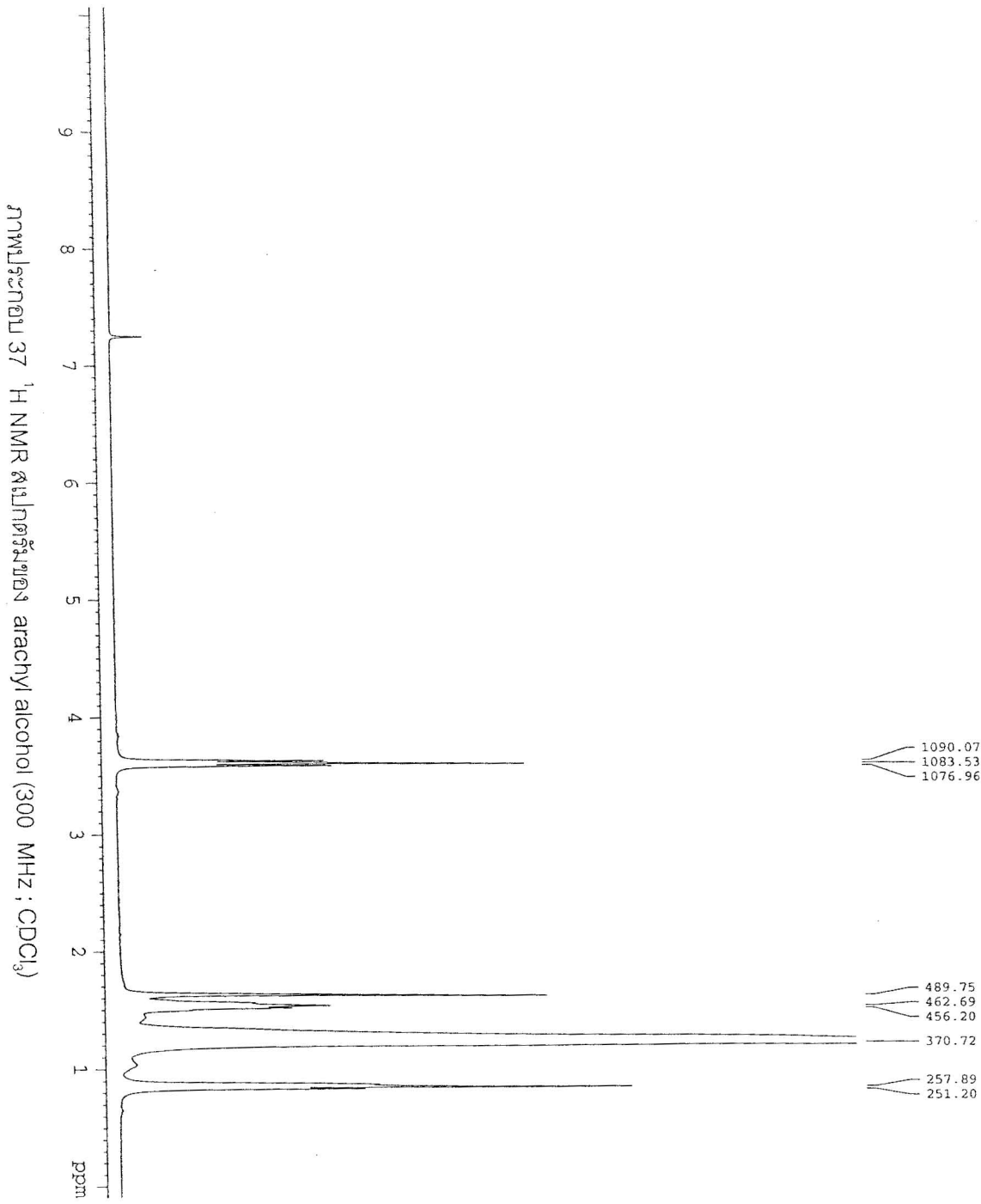


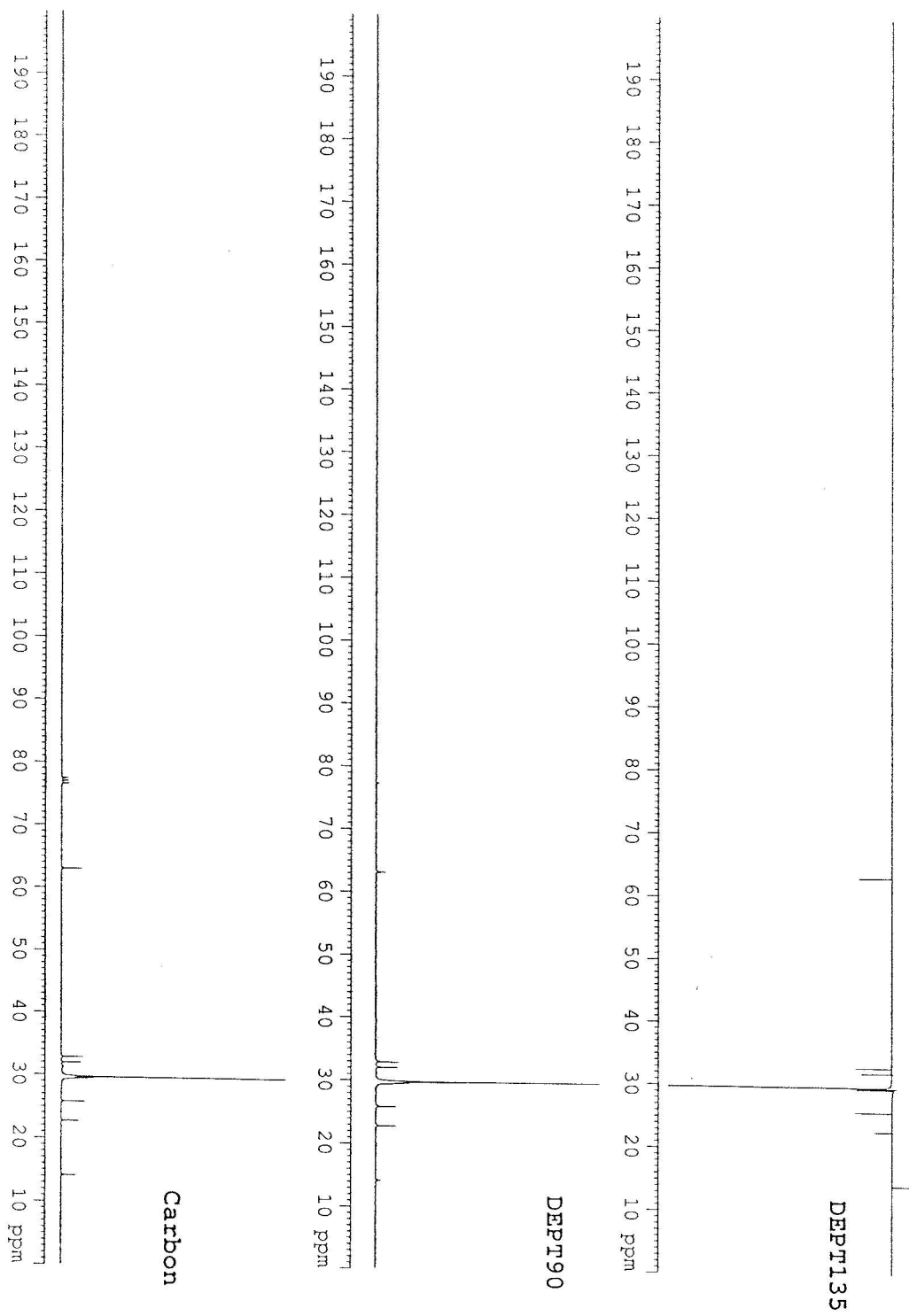
m/z	intensity	relative	m/z	intensity	relative
40.83	592603.0	47.79	114.02	44845.0	3.62
42.89	94121.0	7.59	123.06	71540.0	5.77
52.90	106191.0	8.56	123.97	79650.0	6.42
54.90	1204292.0	97.13	124.93	93083.0	7.51
55.92	161866.0	13.05	126.04	84233.0	6.79
56.93	201598.0	16.26	128.08	84402.0	6.81
64.84	286021.0	23.07	129.04	72757.0	5.87
65.87	77614.0	6.26	130.18	70327.0	5.67
66.84	1239909.0	100.00	134.01	44650.0	3.60
67.88	105893.0	8.54	135.11	44901.0	3.62
68.85	658698.0	53.12	136.02	66280.0	5.35
69.96	101853.0	8.21	137.07	98252.0	7.92
70.96	47853.0	3.86	138.07	100751.0	8.13
76.91	114068.0	9.20	139.01	88884.0	7.17
78.93	261101.0	21.06	140.07	68721.0	5.54
80.89	553812.0	44.67	141.12	74246.0	5.99
81.86	254344.0	20.51	142.02	42762.0	3.45
82.94	361896.0	29.19	143.04	53841.0	4.34
83.86	70247.0	5.67	156.15	47895.0	3.86
94.89	166499.0	13.43	157.13	59767.0	4.82
95.91	124612.0	10.05	158.09	63536.0	5.12
96.88	268407.0	21.65	159.09	59813.0	4.82
97.98	57860.0	4.67	160.18	59884.0	4.83
108.92	47337.0	3.82	170.09	44885.0	3.62
109.92	68274.0	5.51	171.18	59880.0	4.83
110.94	199378.0	16.08	172.22	63065.0	5.09
113.02	42117.0	3.40			

ภาพประกอบ 35 GC-MS สเปกตรัมของ palmityl carborante

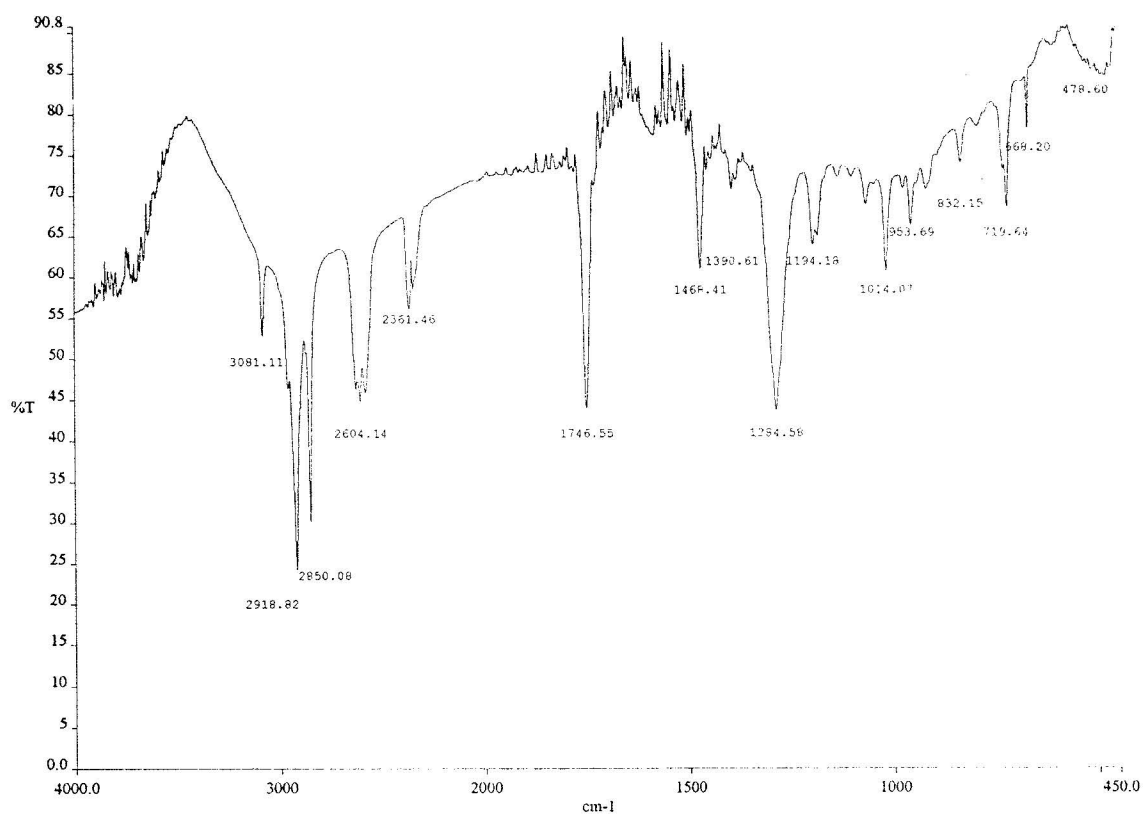


ภาพประกอบ 36 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ arachyl alcohol (KBr)



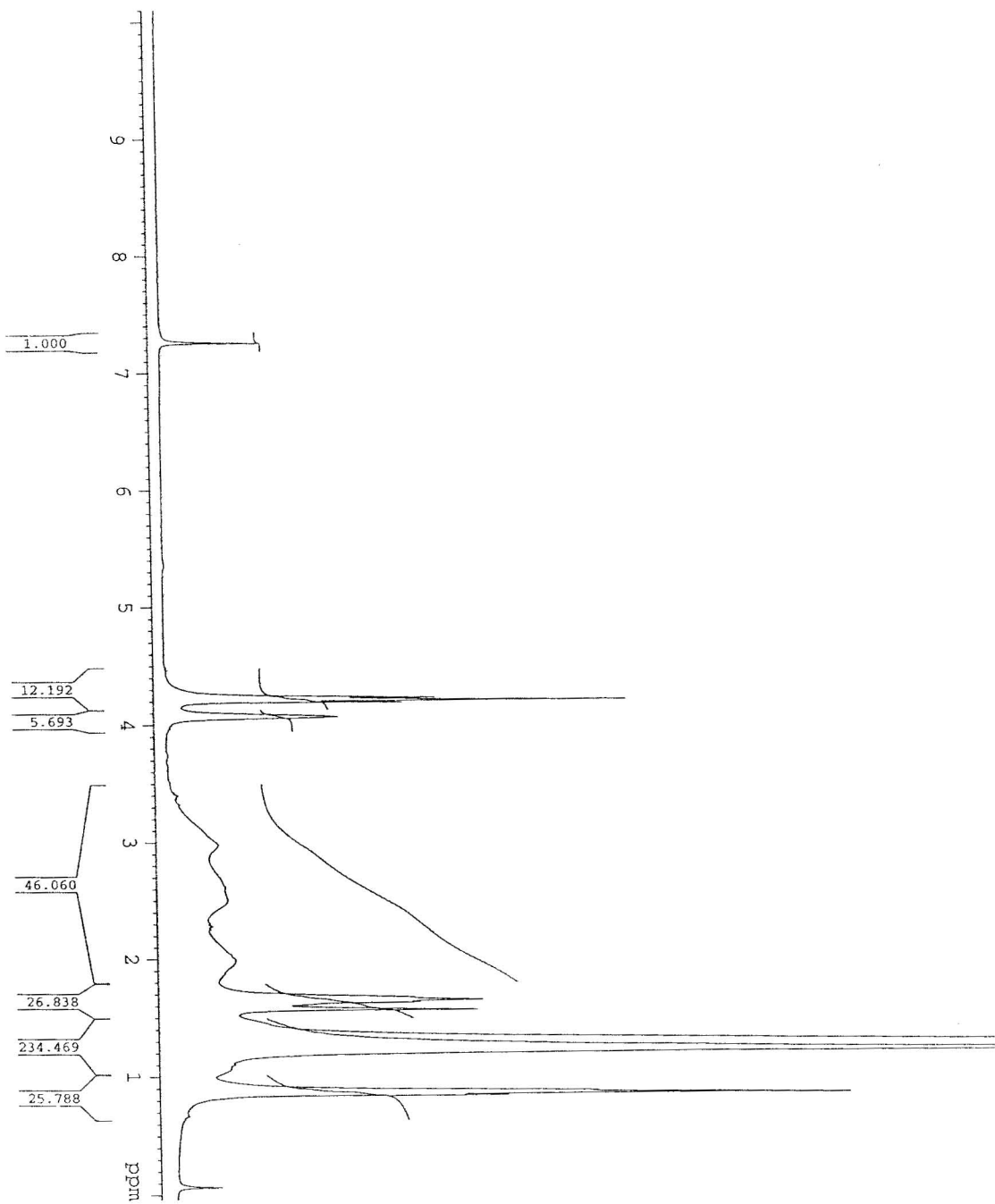


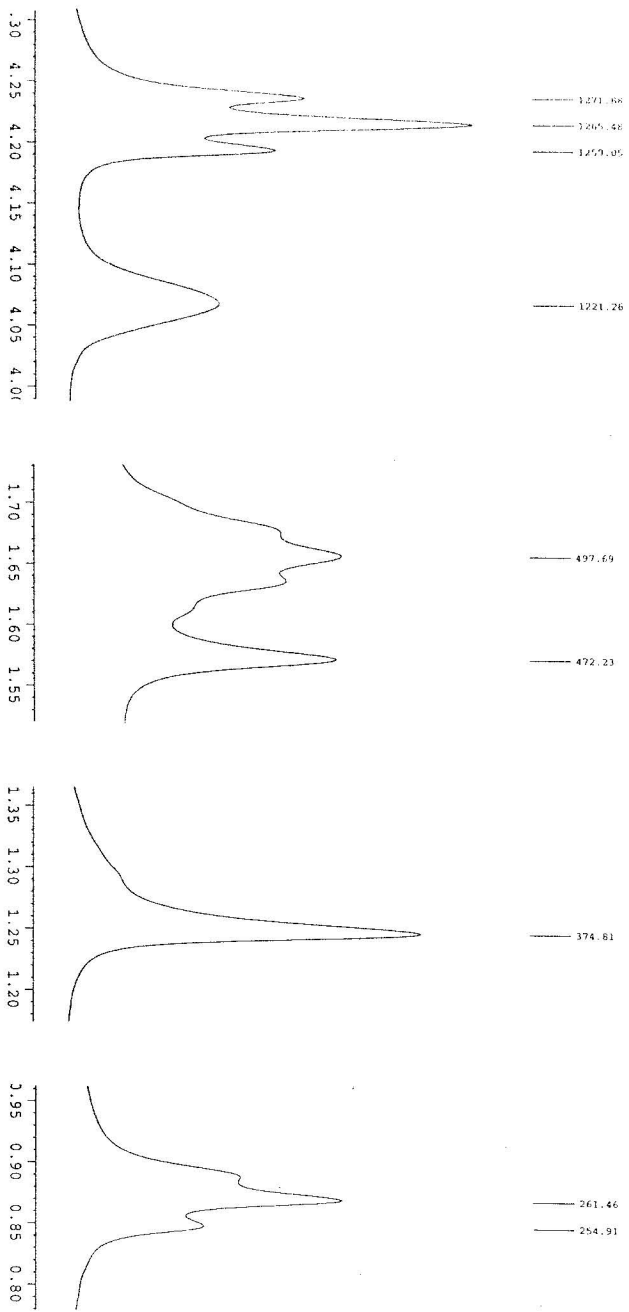
ภาพประกอบ 38 ^{13}C NMR, DEPT90 และ DEPT135 ของ arachyl alcohol (75 MHz, 300 MHz ; CDCl_3)



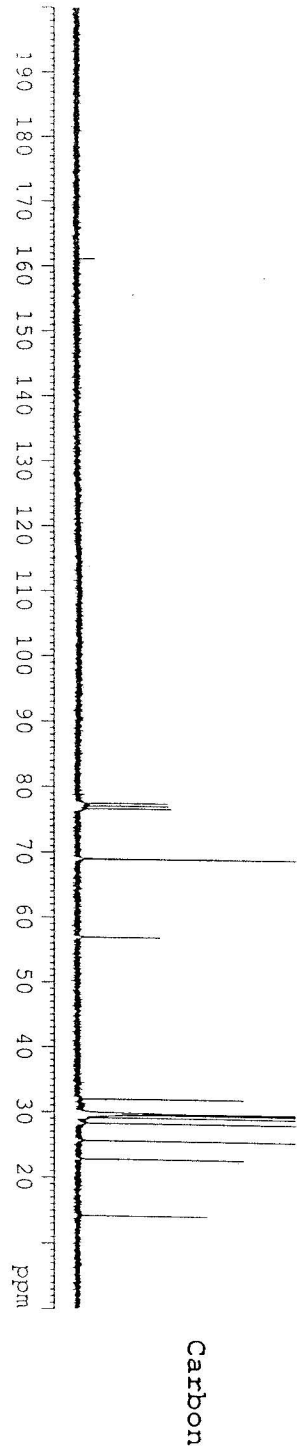
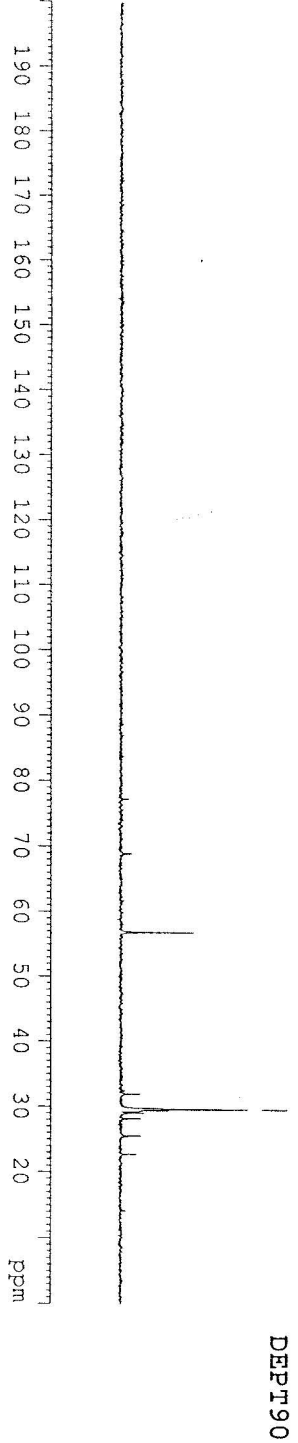
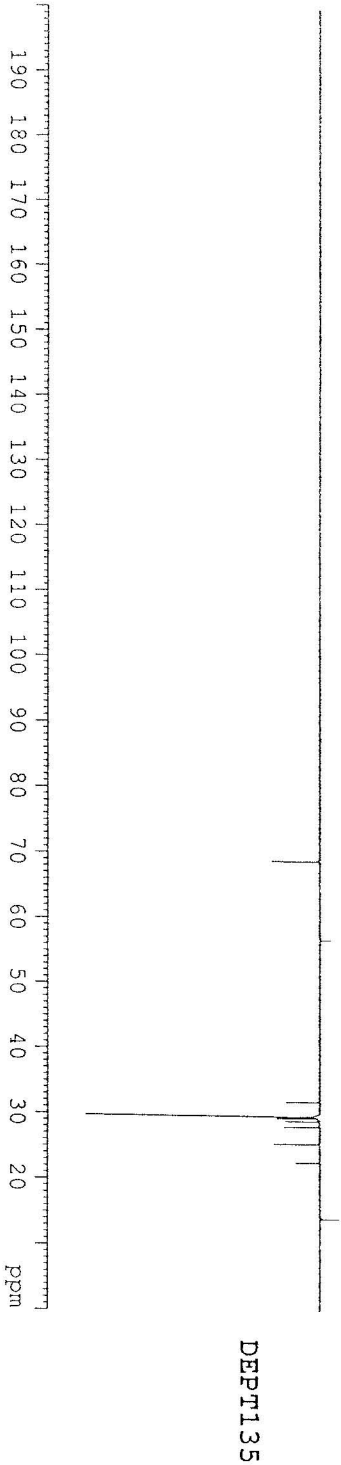
ภาพประกอบ 39 การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ arachyl carborate (KBr)

ภาพประกอบ 40 ^1H NMR สเปกตรัมของ arachyl carboranate (300 MHz ; CDCl_3)

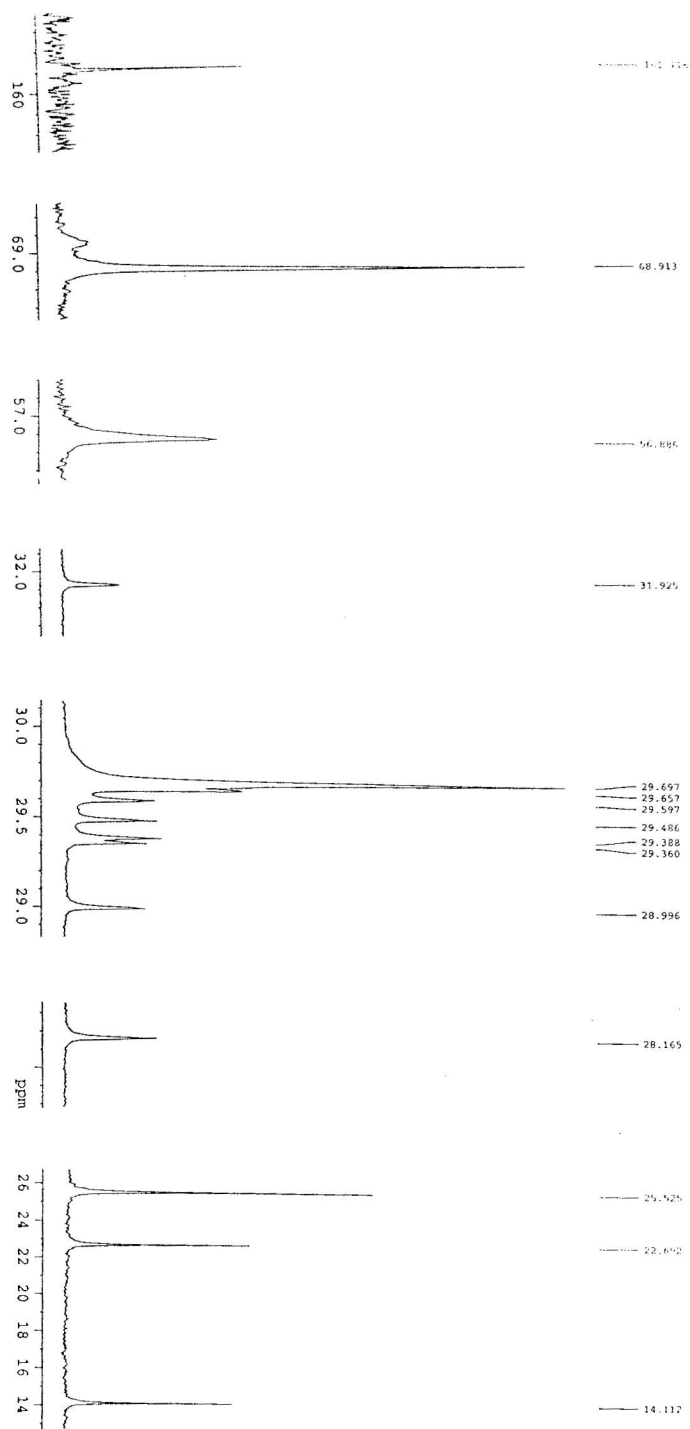




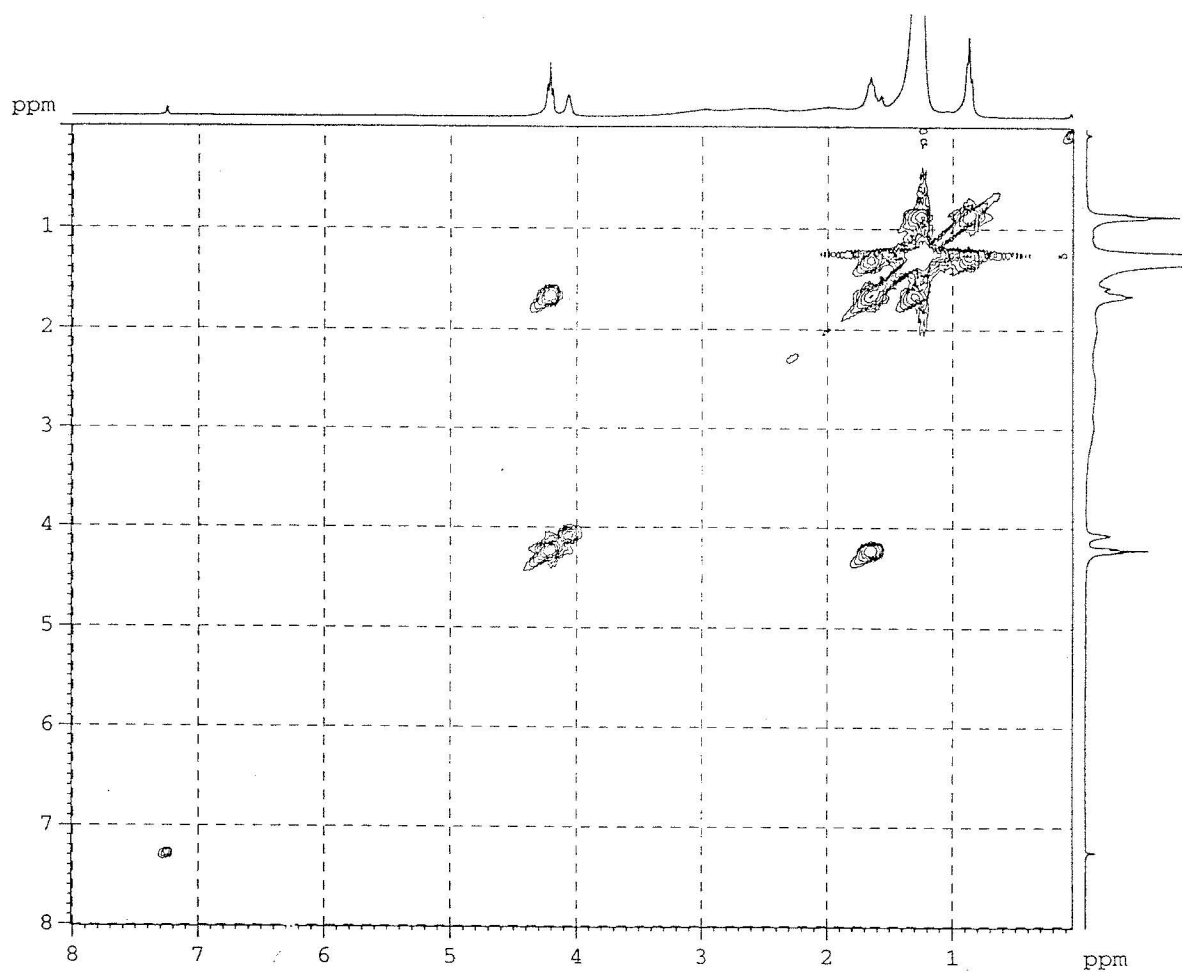
ภาพประกอบ 41 ขยายสัญญาณ ^1H NMR สเปกตรัมของ arachyl carboranate



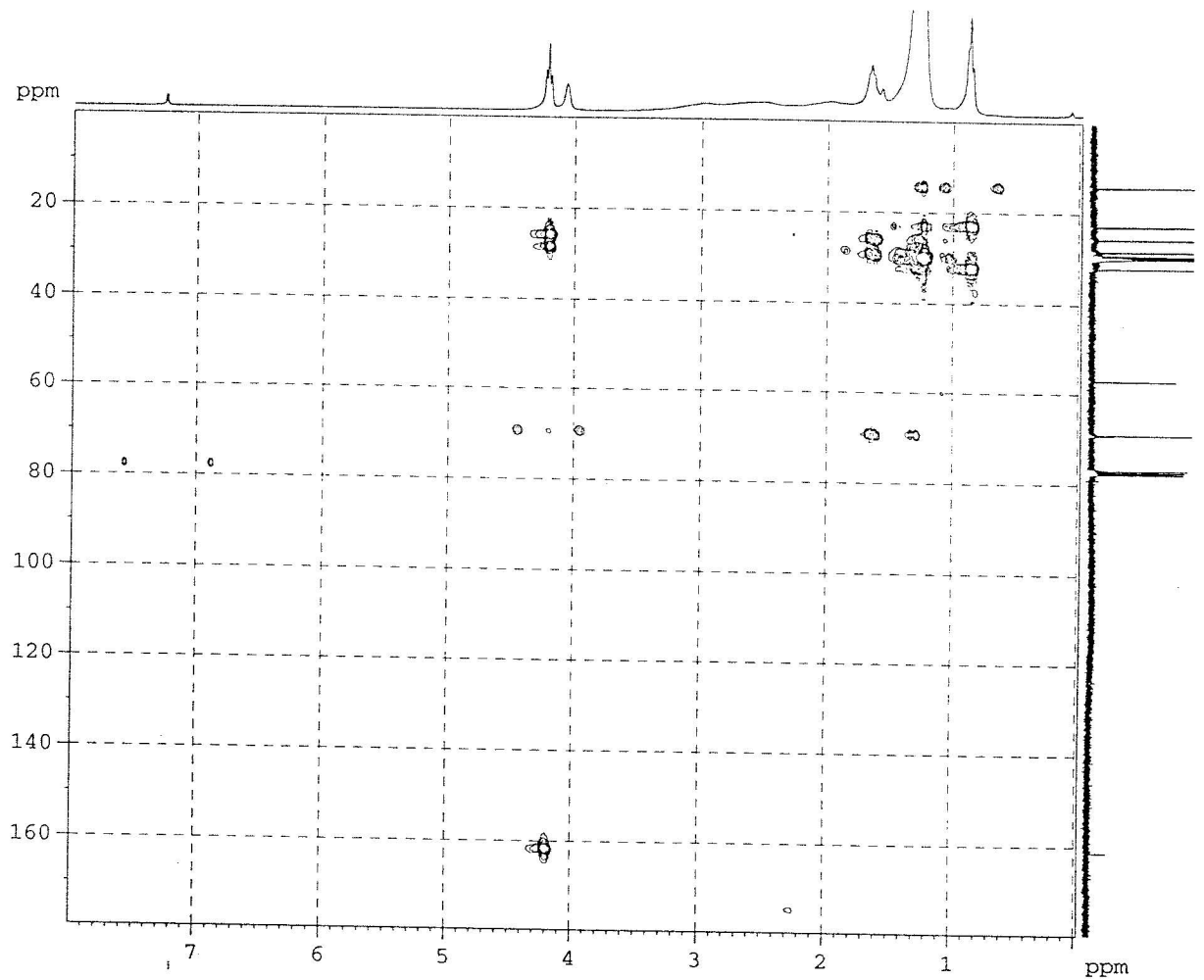
ภาพประกอบ 42 ^{13}C NMR, DEPT90 และ DEPT135 สเปกตรัมของ arachyl carboranate (75 MHz, 300 MHz ; CDCl_3)



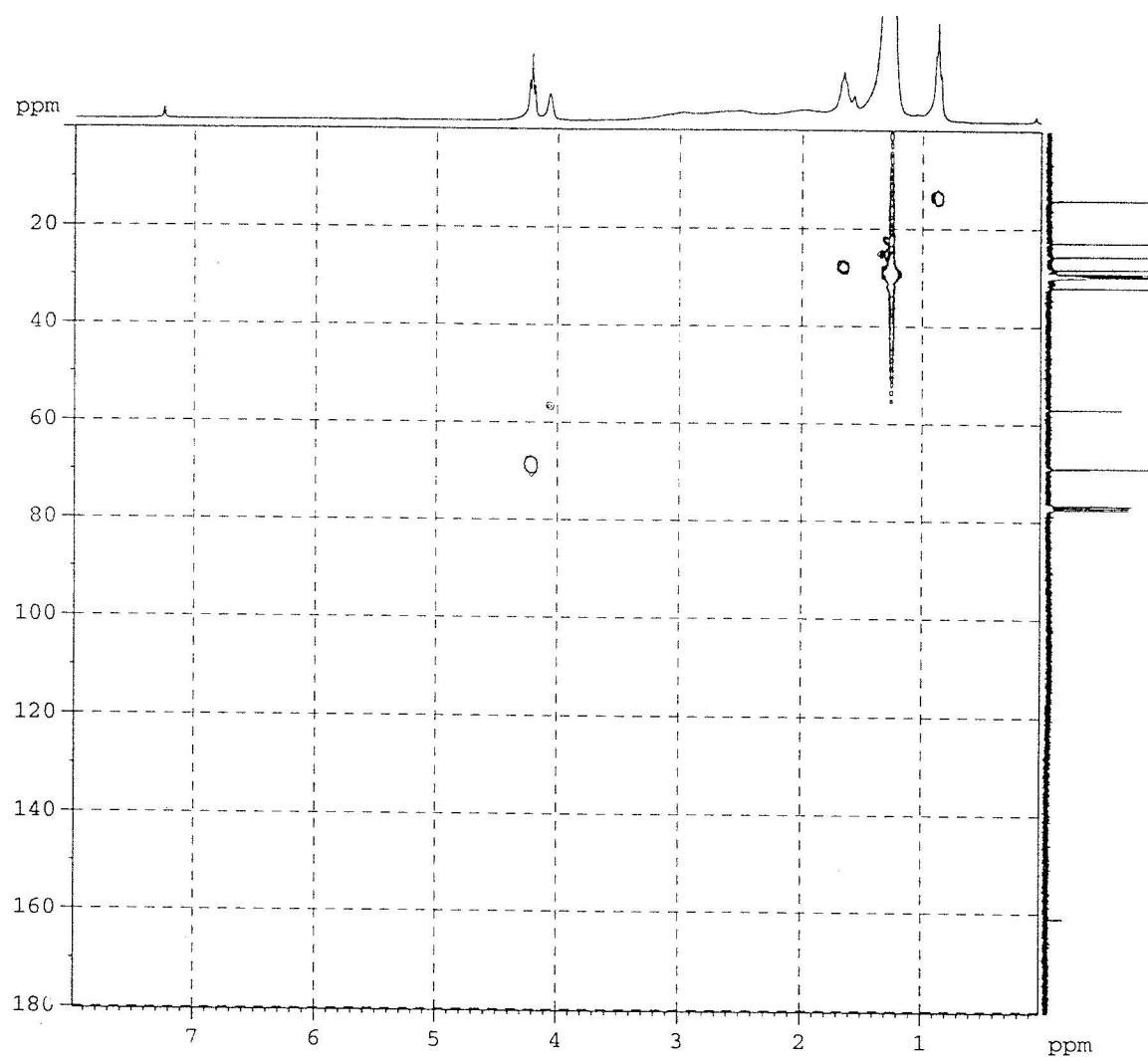
ภาพประกอบ 43 ขยายสัญญาณ ^{13}C NMR สเปกตรัมของ arachyl carboranate



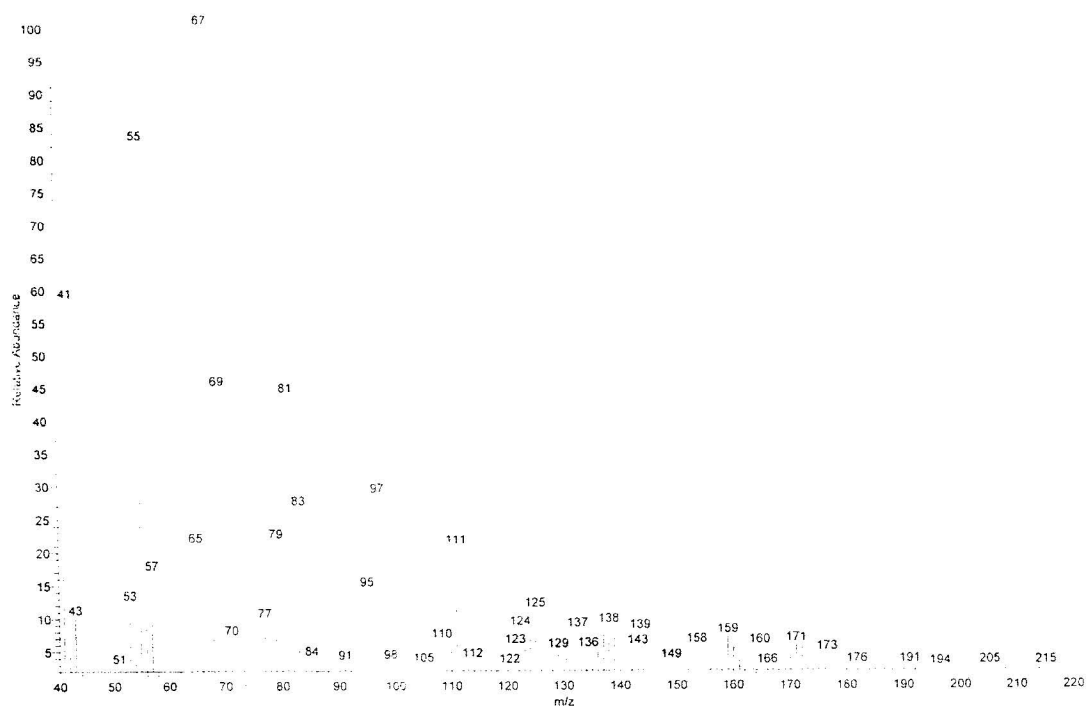
ภาพประกอบ 44 COSY สเปกตรัมของ arachyl carborane (300 MHz ; CDCl₃)



ภาพประกอบ 45 HMBC สเปกตรัมของ arachyl carborane (300 MHz ; CDCl₃)



ภาพประกอบ 46 HMQC สเปกตรัมของ arachyl carborane (300 MHz ; CDCl_3)



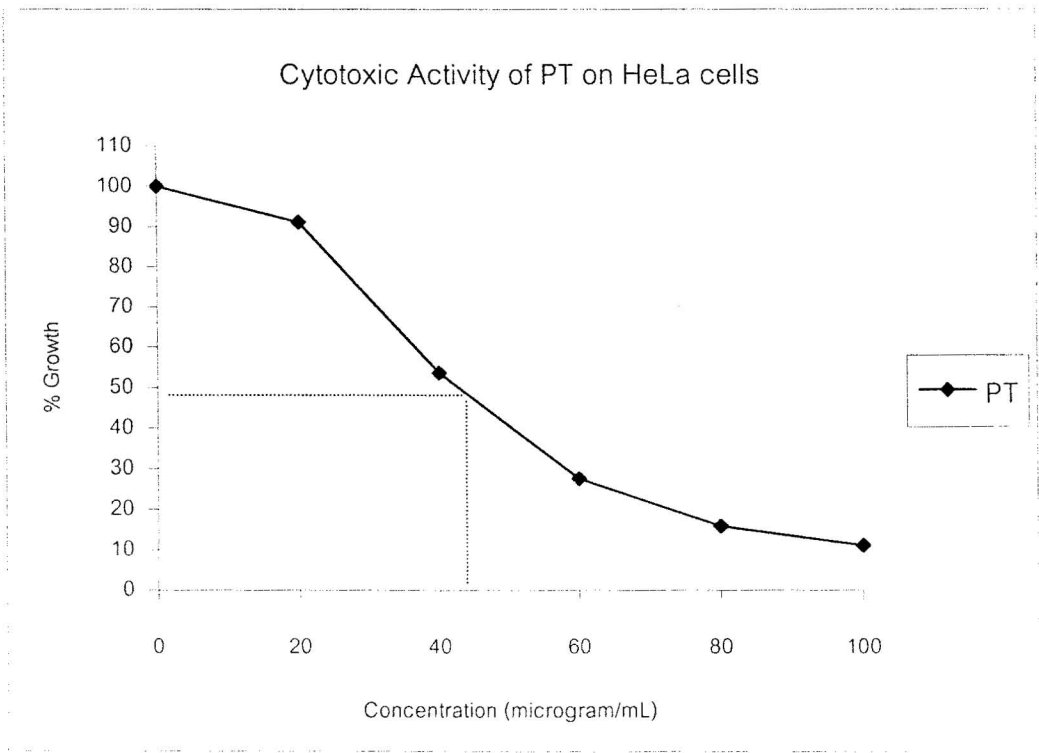
m/z	intensity	relative	m/z	intensity	relative
40.88	143026.0	58.32	110.95	50539.4	20.61
41.88	11440.5	4.67	123.08	13727.1	5.60
42.91	24764.0	10.10	123.99	20469.0	8.35
52.93	30071.4	12.26	124.97	27243.3	11.11
53.94	8875.2	3.62	126.04	10009.0	4.08
54.95	201955.9	82.35	128.10	8796.0	3.59
55.94	21064.4	8.59	129.09	12136.9	4.95
56.96	41077.0	16.75	130.11	9482.3	3.87
64.94	51314.1	20.93	135.08	8865.7	3.62
65.92	19749.6	8.05	136.09	12401.1	5.06
66.95	245226.5	100.00	137.09	19743.7	8.05
67.93	20155.7	8.22	138.03	21307.2	8.69
68.96	109758.5	44.76	139.03	18999.7	7.75
69.97	17016.0	6.94	140.08	10967.5	4.47
70.96	12202.6	4.98	141.12	12716.9	5.19
76.96	23361.0	9.53	142.13	13068.0	5.33
78.98	52739.4	21.51	143.14	13289.3	5.42
79.98	9414.8	3.84	144.12	8783.3	3.58
80.96	107032.2	43.65	157.13	10509.0	4.29
81.92	41187.1	16.80	158.15	13712.1	5.59
82.98	64941.7	26.48	159.13	17340.0	7.07
83.97	9283.6	3.79	160.12	13487.4	5.50
94.99	34884.8	14.23	170.14	9573.4	3.90
95.92	30135.8	12.29	171.13	14154.8	5.77
96.98	69522.2	28.35	172.16	14092.2	5.75
109.06	11902.2	4.85	173.13	10848.0	4.42
109.98	15822.7	6.45			

ภาพประกอบ 47 GC-MS สเปกตรัมของ arachyl carborante

ตาราง 16 แสดง % growth ของ palmityl carboranate ต่อ HeLa cells

ความเข้มข้น μg/mL	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		เฉลี่ย Mean ± S.D.
	O.D.	% Growth	O.D.	% Growth	O.D.	% Growth	
20	0.175	89.3	0.186	94.9	0.175	89.3	91.2 ± 3.23
40	0.099	50.5	0.111	56.6	0.105	53.6	53.6 ± 3.05
60	0.056	28.6	0.048	24.5	0.058	29.6	27.6 ± 2.70
80	0.030	15.3	0.032	16.3	0.031	15.8	15.8 ± 0.50
100	0.025	12.8	0.021	10.7	0.019	9.7	11.1 ± 1.58

$$\begin{aligned} \text{O.D. Day 4} / \text{O.D. Day 0} &= 0.196 / 0.048 \\ &= 4.08 \end{aligned}$$

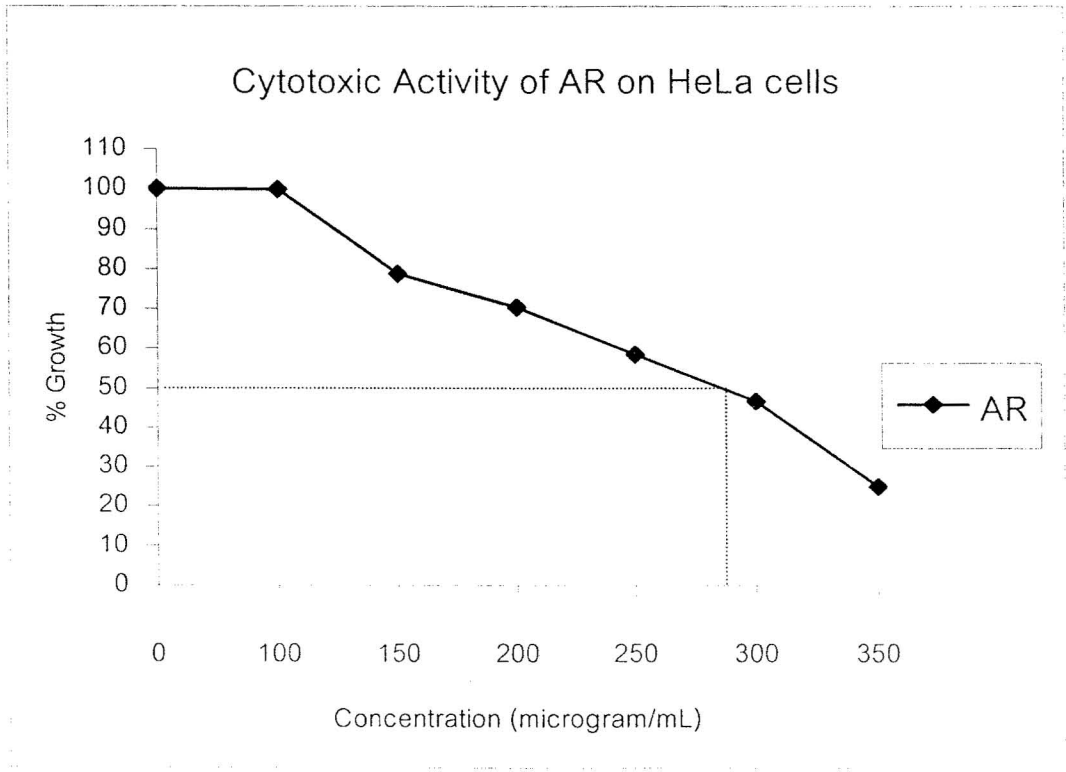


ภาพประกอบ 48 IC₅₀ ของ palmityl carboranate ต่อ HeLa cells

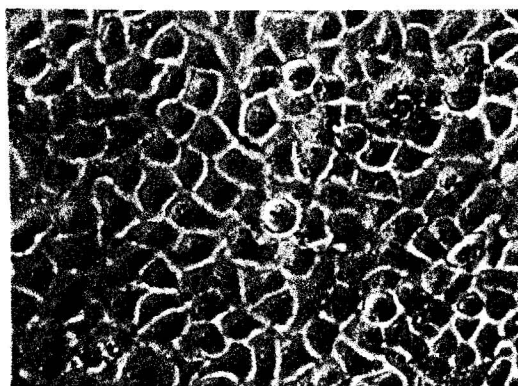
ตาราง 17 แสดง % growth ของ arachyl carboranate ต่อ HeLa cells

ความเข้มข้น μg/mL	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		เฉลี่ย
	O.D.	% Growth	O.D.	% Growth	O.D.	% Growth	
100	0.196	98.9	0.198	100.0	0.198	100.0	99.6 ± 0.63
150	0.160	80.8	0.151	76.3	0.157	79.3	78.8 ± 2.29
200	0.145	73.2	0.138	69.7	0.139	70.2	71.0 ± 1.89
250	0.111	56.1	0.120	60.6	0.117	59.1	58.6 ± 2.29
300	0.097	49.0	0.089	44.9	0.091	46.0	46.6 ± 2.12
350	0.054	27.3	0.048	24.2	0.046	23.2	24.9 ± 2.13

O.D. Day 4 / O.D. Day 0 = 0.198 / 0.048
= 4.12



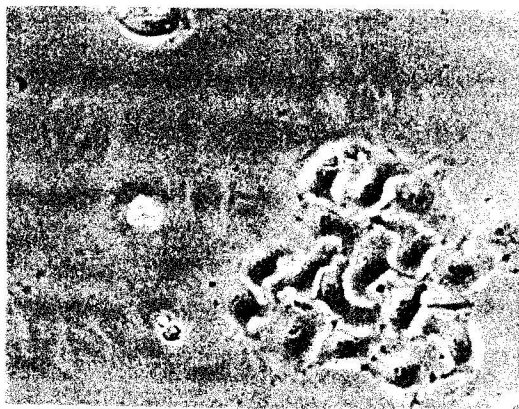
ภาพประกอบ 49 IC₅₀ ของ arachyl carboranate ต่อ HeLa cells



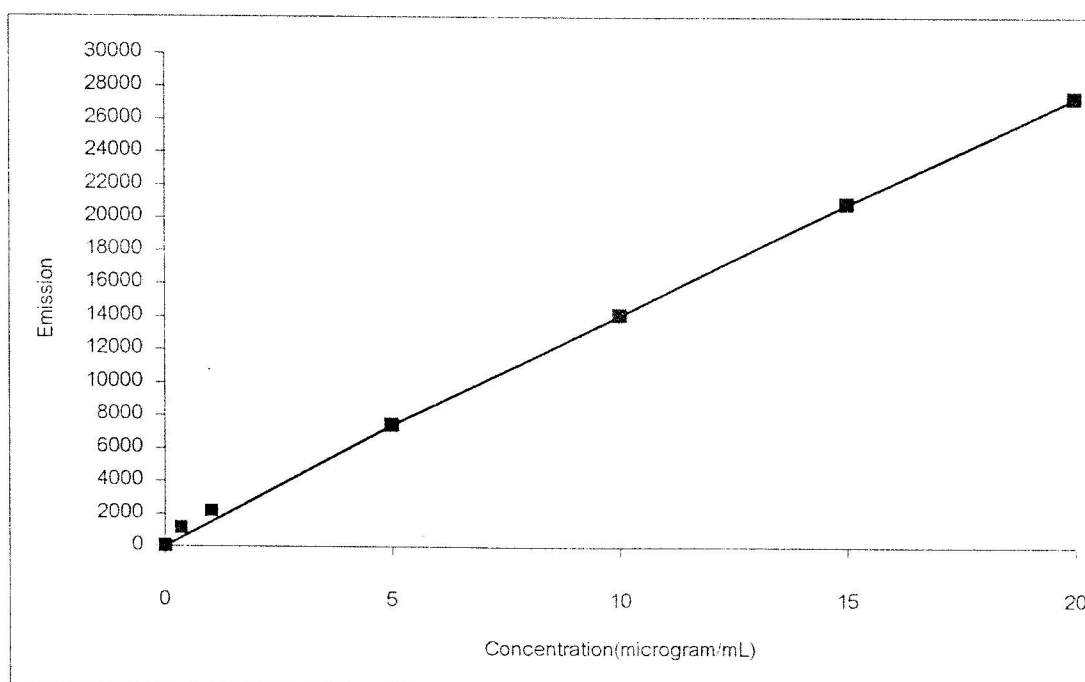
ภาพประกอบ 50 ลักษณะ HeLa cells (ที่เป็น negative control)



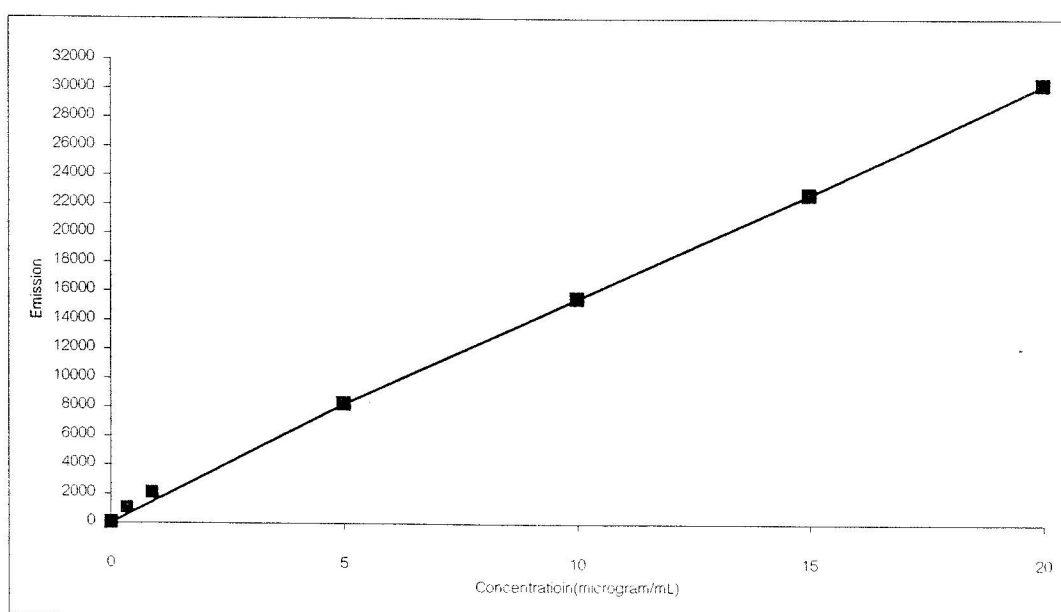
ภาพประกอบ 51 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ palmitoyl carboranate ต่อ HeLa cells
ที่ความเข้มข้น 43.0 $\mu\text{g/mL}$



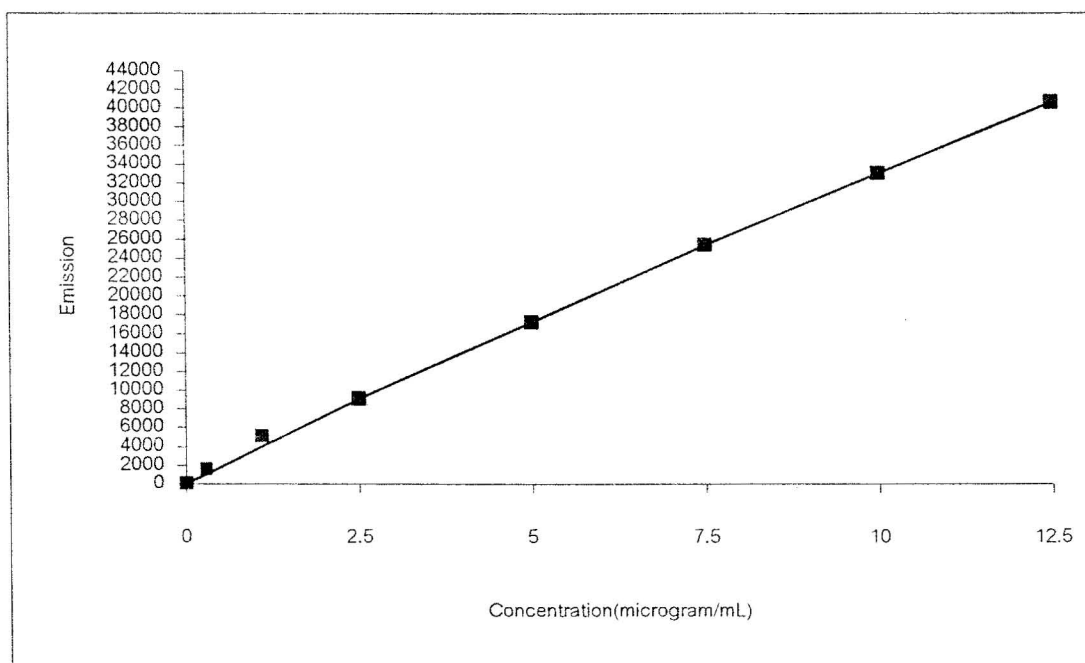
ภาพประกอบ 52 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ arachyl carboranate ต่อ HeLa cells
ที่ความเข้มข้น 287.0 µg/mL



ภาพประกอบ 53 กราฟมาตรฐานของ standard H_3BO_3 เมื่อย่อยสลายด้วยกรด $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$



ภาพประกอบ 54 กราฟมาตรฐานของ standard H_3BO_3 เมื่อย่อยสลายด้วยกรด $\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$



ภาพประกอบ 55 กราฟมาตรฐานของ standard H_3BO_3

ข้อมูลแสดงผลการตรวจวัดปริมาณโบรอนจาก ICP-AES (Perkin Elmer ; Optima 3000)

Standard calibration curve of HNO₃

Blank of HNO₃

rep	1	b249	EM	342.1
rep	2	b249	EM	347.7

Blank of HNO₃

b249	av	344.88	EM	sd	3.974	%cv	1.15
------	----	--------	----	----	-------	-----	------

Standard 1

rep	1	b249	EM	1227.6
rep	2	b249	EM	1250.1

Standard 1

b249	av	1238.8	EM	sd	15.86	%cv	1.28	conc	0.5
------	----	--------	----	----	-------	-----	------	------	-----

Standard 2

rep	1	b249	EM	2008.8
rep	2	b249	EM	2024.4

Standard 2

b249	av	2016.6	EM	sd	11.03	%cv	0.55	conc	1.0
------	----	--------	----	----	-------	-----	------	------	-----

Standard 3

rep	1	b249	EM	7367.7
rep	2	b249	EM	7461.4

Standard 3

b249	av	7414.6	EM	sd	66.29	%cv	0.89	conc	5.0
------	----	--------	----	----	-------	-----	------	------	-----

Standard 4

rep	1	b249	EM	14142.8
rep	2	b249	EM	14053.0

Standard 4

b249	av	14097.9	EM	sd	63.50	%cv	0.45	conc	10.0
------	----	---------	----	----	-------	-----	------	------	------

Standard 5

rep	1	b249	EM	20856.3
rep	2	b249	EM	20895.4

Standard 5

b249	av	20875.8	EM	sd	27.62	%cv	0.13	conc	15.0
------	----	---------	----	----	-------	-----	------	------	------

Standard 6

rep	1	b249	EM	27299.5
rep	2	b249	EM	27365.0

Standard 6

b249	av	27332.2	EM	sd	46.30	%cv	0.17	conc	20.0
------	----	---------	----	----	-------	-----	------	------	------

Sample of HNO₃

Blank

rep	1	b249	EM	899.2
rep	2	b249	EM	760.9

Blank

b249	av	830.08	EM	sd	97.79	%cv	11.78
------	----	--------	----	----	-------	-----	-------

Sample 1

rep	1	b249	conc	0.8
rep	2	b249	conc	0.8

Sample 1

b249	av	0.8	sd	0.02	%cv	2.11
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 2

rep	1	b249	conc	0.9
rep	2	b249	conc	0.9

Sample 2

b249	av	0.9	sd	0.01	%cv	1.01
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 3

rep	1	b249	conc	1.4
rep	2	b249	conc	1.4

Sample 3

b249	av	1.4	sd	0.02	%cv	1.55
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 4

rep	1	b249	conc	1.5
rep	2	b249	conc	1.5

Sample 4

b249	av	1.5	sd	0.01	%cv	0.60
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 5

rep	1	b249	conc	3.0
rep	2	b249	conc	3.0

Sample 5

b249	av	3.0	sd	0.01	%cv	0.43
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 6

rep	1	b249	conc	3.1
rep	2	b249	conc	3.1

Sample 6

b249	av	3.1	sd	0.02	%cv	0.51
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 7

rep	1	b249	conc	6.4
rep	2	b249	conc	6.5

Sample 7

b249	av	6.4	sd	0.07	%cv	1.12
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 8

rep	1	b249	conc	6.4
rep	2	b249	conc	6.4

Sample 8

b249	av	6.4	sd	0.01	%cv	0.21
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 9

rep	1	b249	conc	9.3
rep	2	b249	conc	9.5

Sample 9

b249	av	9.4	sd	0.16	%cv	1.73
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 10

rep	1	b249	conc	9.7
rep	2	b249	conc	9.8

Sample 10

b249	av	9.8	sd	0.05	%cv	0.49
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 11

rep	1	b249	conc	12.9
rep	2	b249	conc	13.1

Sample 11

b249	av	13.0	sd	0.12	%cv	0.96
------	----	------	----	------	-----	------

Sample 12

rep	1	b249	conc	12.9
rep	2	b249	conc	13.2

Sample 12

b249	av	13.0	sd	0.24	%cv	1.83
------	----	------	----	------	-----	------

Sample 13

rep	1	b249	conc	16.1
rep	2	b249	conc	16.4

Sample 13

b249	av	16.3	sd	0.18	%cv	1.10
------	----	------	----	------	-----	------

Sample 14

rep	1	b249	conc	16.1
rep	2	b249	conc	16.4

Sample 14

b249	av	16.2	sd	0.19	%cv	1.19
------	----	------	----	------	-----	------

Standard calibration curve of HClO₄

Blank of HClO₄

rep	1	b249	EM	994.1
rep	2	b249	EM	938.3

Blank of HClO₄

b249	av	966.2	EM	sd	39.48	%cv	4.09
------	----	-------	----	----	-------	-----	------

Standard 1

rep	1	b249	EM	1844.0
rep	2	b249	EM	1851.7

Standard 1

b249	av	1847.9	EM	sd	5.41	%cv	0.29	conc	0.5
------	----	--------	----	----	------	-----	------	------	-----

Standard 2

rep	1	b249	EM	2508.2
rep	2	b249	EM	2526.7

Standard 2

b249	av	2517.5	EM	sd	13.09	%cv	0.52	conc	1.0
------	----	--------	----	----	-------	-----	------	------	-----

Standard 3

rep	1	b249	EM	8140.2
rep	2	b249	EM	8284.1

Standard 3

b249	av	8212.1	EM	sd	101.71	%cv	1.24	conc	5.0
------	----	--------	----	----	--------	-----	------	------	-----

Standard 4

rep	1	b249	EM	15533.4
rep	2	b249	EM	15463.0

Standard 4

b249	av	15498.2	EM	sd	49.75	%cv	0.32	conc	10.0
------	----	---------	----	----	-------	-----	------	------	------

Standard 5

rep	1	b249	EM	22638.8
rep	2	b249	EM	22718.4

Standard 5

b249	av	22678.6	EM	sd	56.31	%cv	0.25	conc	15.0
------	----	---------	----	----	-------	-----	------	------	------

Standard 6

rep	1	b249	EM	30029.5
rep	2	b249	EM	30513.8

Standard 6

b249	av	30271.6	EM	sd	342.44	%cv	1.13	conc	20.0
------	----	---------	----	----	--------	-----	------	------	------

Sample of HClO₄

Blank

rep	1	b249	EM	1147.7
rep	2	b249	EM	1069.6

Blank

b249	av	1108.6	EM	sd	55.23	%cv	4.98
------	----	--------	----	----	-------	-----	------

Sample 1

rep	1	b249	conc	0.8
rep	2	b249	conc	0.8

Sample 1

b249	av	0.8	sd	0.00	%cv	0.28
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 2

rep	1	b249	conc	0.8
rep	2	b249	conc	0.8

Sample 2

b249	av	0.8	sd	0.00	%cv	0.51
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 3

rep	1	b249	conc	1.5
rep	2	b249	conc	1.5

Sample 3

b249	av	1.5	sd	0.01	%cv	0.71
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 4

rep	1	b249	conc	1.6
rep	2	b249	conc	1.6

Sample 4

b249	av	1.6	sd	0.00	%cv	0.21
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 5

rep	1	b249	conc	3.2
rep	2	b249	conc	3.2

Sample 5

b249	av	3.2	sd	0.01	%cv	0.17
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 6

rep	1	b249	conc	3.1
rep	2	b249	conc	3.1

Sample 6

b249	av	3.1	sd	0.02	%cv	0.77
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 7

rep	1	b249	conc	6.2
rep	2	b249	conc	6.2

Sample 7

b249	av	6.2	sd	0.02	%cv	0.30
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 8

rep	1	b249	conc	6.6
rep	2	b249	conc	6.7

Sample 8

b249	av	6.6	sd	0.04	%cv	0.66
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 9

rep	1	b249	conc	9.4
rep	2	b249	conc	9.6

Sample 9

b249	av	9.5	sd	0.09	%cv	0.91
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 10

rep	1	b249	conc	9.6
rep	2	b249	conc	9.6

Sample 10

b249	av	9.6	sd	0.02	%cv	0.24
------	----	-----	----	------	-----	------

Sample 11

rep	1	b249	conc	12.8
rep	2	b249	conc	12.9

Sample 11

b249	av	12.9	sd	0.02	%cv	0.15
------	----	------	----	------	-----	------

Sample 12

rep	1	b249	conc	13.2
rep	2	b249	conc	13.2

Sample 12

b249	av	13.2	sd	0.03	%cv	0.21
------	----	------	----	------	-----	------

Sample 13

rep	1	b249	conc	16.4
rep	2	b249	conc	16.5

Sample 13

b249	av	16.5	sd	0.06	%cv	0.38
------	----	------	----	------	-----	------

Sample 14

rep	1	b249	conc	15.6
rep	2	b249	conc	16.1

Sample 14

b249	av	15.8	sd	0.36	%cv	2.30
------	----	------	----	------	-----	------

Standard calibration curve

Blank

rep	1	b249	EM	1625.9
rep	2	b249	EM	1478.9

Blank

b249	av	1552.37	EM	sd	103.96	%cv	6.70
------	----	---------	----	----	--------	-----	------

Standard 1

rep	1	b249	EM	1610.4
rep	2	b249	EM	1600.5

Standard 1

b249	av	1605.43	EM	sd	6.969	%cv	0.43	conc	0.10
------	----	---------	----	----	-------	-----	------	------	------

Standard 2

rep	1	b249	EM	4430.7
rep	2	b249	EM	4498.3

Standard 2

b249	av	4464.47	EM	sd	47.808	%cv	1.07	conc	1.00
------	----	---------	----	----	--------	-----	------	------	------

Standard 3

rep	1	b249	EM	9036.1
rep	2	b249	EM	9135.9

Standard 3

b249	av	9086.00	EM	sd	70.507	%cv	0.78	conc	2.50
------	----	---------	----	----	--------	-----	------	------	------

Standard 4

rep	1	b249	EM	17123.5
rep	2	b249	EM	17458.0

Standard 4

b249	av	17290.75	EM	sd	236.513	%cv	1.37	conc	5.00
------	----	----------	----	----	---------	-----	------	------	------

Standard 5

rep	1	b249	EM	25300.5
rep	2	b249	EM	25535.0

Standard 5

b249	av	25417.73	EM	sd	165.786	%cv	0.65	conc	7.50
------	----	----------	----	----	---------	-----	------	------	------

Standard 6

rep	1	b249	EM	32979.3
rep	2	b249	EM	33044.5

Standard 6

b249	av	33011.89	EM	sd	46.071	%cv	0.14	conc	10.00
------	----	----------	----	----	--------	-----	------	------	-------

Standard 7

rep	1	b249	EM	40495.6
rep	2	b249	EM	40779.9

Standard 7

b249	av	40637.77	EM	sd	200.996	%cv	0.49	conc	12.50
------	----	----------	----	----	---------	-----	------	------	-------

Sample						
PT (intra boron) 1 ชั่วโมง						
	rep	1	b249	conc	-0.12	
	rep	2	b249	conc	-0.14	
PT (intra boron) 1 ชั่วโมง						
b249	av	-0.13	sd	0.017	%cv	12.43
PT (extra boron) 1 ชั่วโมง						
	rep	1	b249	conc	1.72	
	rep	2	b249	conc	1.74	
PT (extra boron) 1 ชั่วโมง						
b249	av	1.73	sd	0.015	%cv	0.88
PT (intra boron) 1 ชั่วโมง						
	rep	1	b249	conc	-0.13	
	rep	2	b249	conc	-0.15	
PT (intra boron) 1 ชั่วโมง						
b249	av	-0.14	sd	0.018	%cv	12.86
PT (extra boron) 1 ชั่วโมง						
	rep	1	b249	conc	1.70	
	rep	2	b249	conc	1.70	
PT (extra boron) 1 ชั่วโมง						
b249	av	1.70	sd	0.003	%cv	0.19

PT (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.14
rep	2	b249	conc	-0.16

PT (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.15	sd	0.016	%cv	10.81
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PT (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.71
rep	2	b249	conc	1.72

PT (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	1.71	sd	0.010	%cv	0.57
------	----	------	----	-------	-----	------

PT (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.14
rep	2	b249	conc	-0.17

PT (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.15	sd	0.020	%cv	13.12
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PT (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.64
rep	2	b249	conc	1.65

PT (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	1.64	sd	0.006	%cv	0.40
------	----	------	----	-------	-----	------

PT (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.14
rep	2	b249	conc	-0.16

PT (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.15	sd	0.016	%cv	10.74
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PT (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.62
rep	2	b249	conc	1.64

PT (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	1.63	sd	0.012	%cv	0.76
------	----	------	----	-------	-----	------

PT (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.14
rep	2	b249	conc	-0.16

PT (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.15	sd	0.016	%cv	10.98
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PT (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.61
rep	2	b249	conc	1.63

PT (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	1.62	sd	0.011	%cv	0.68
------	----	------	----	-------	-----	------

PT (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.13
rep	2	b249	conc	-0.15

PT (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.14	sd	0.017	%cv	12.44
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PT (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.61
rep	2	b249	conc	1.62

PT (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	1.62	sd	0.005	%cv	0.32
------	----	------	----	-------	-----	------

PT (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.14
rep	2	b249	conc	-0.16

PT (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.15	sd	0.015	%cv	10.19
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PT (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.64
rep	2	b249	conc	1.65

PT (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	1.65	sd	0.011	%cv	0.66
------	----	------	----	-------	-----	------

PE (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.09
rep	2	b249	conc	-0.09

PE (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.09	sd	0.001	%cv	1.17
------	----	-------	----	-------	-----	------

PE (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.57
rep	2	b249	conc	1.61

PE (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	1.59	sd	0.030	%cv	1.87
------	----	------	----	-------	-----	------

PE (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.07
rep	2	b249	conc	-0.09

PE (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.08	sd	0.016	%cv	21.16
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PE (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.50
rep	2	b249	conc	1.54

PE (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	1.52	sd	0.030	%cv	1.95
------	----	------	----	-------	-----	------

PE (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.07
rep	2	b249	conc	-0.08

PE (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.08	sd	0.010	%cv	12.47
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PE (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.54
rep	2	b249	conc	1.57

PE (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	1.56	sd	0.019	%cv	1.24
------	----	------	----	-------	-----	------

PE (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.07
rep	2	b249	conc	-0.08

PE (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.07	sd	0.012	%cv	15.96
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PE (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.48
rep	2	b249	conc	1.55

PE (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	1.51	sd	0.052	%cv	3.44
------	----	------	----	-------	-----	------

PE (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.06
rep	2	b249	conc	-0.08

PE (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.07	sd	0.010	%cv	14.10
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PE (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.33
rep	2	b249	conc	1.39

PE (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	1.36	sd	0.040	%cv	2.96
------	----	------	----	-------	-----	------

PE (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.06
rep	2	b249	conc	-0.08

PE (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.07	sd	0.010	%cv	14.91
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PE (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.66
rep	2	b249	conc	1.71

PE (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	1.69	sd	0.039	%cv	2.31
------	----	------	----	-------	-----	------

PE (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.04
rep	2	b249	conc	-0.06

PE (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.05	sd	0.014	%cv	27.57
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PE (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.61
rep	2	b249	conc	1.64

PE (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	1.63	sd	0.025	%cv	1.53
------	----	------	----	-------	-----	------

PE (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.04
rep	2	b249	conc	-0.06

PE (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.05	sd	0.011	%cv	21.70
------	----	-------	----	-------	-----	-------

PE (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	1.61
rep	2	b249	conc	1.66

PE (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	1.64	sd	0.034	%cv	2.09
------	----	------	----	-------	-----	------

SR (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.05
rep	2	b249	conc	-0.08

SR (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.07	sd	0.026	%cv	40.06
------	----	-------	----	-------	-----	-------

SR (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.89
rep	2	b249	conc	2.91

SR (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	2.90	sd	0.018	%cv	0.62
------	----	------	----	-------	-----	------

SR (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.08
rep	2	b249	conc	-0.12

SR (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.10	sd	0.025	%cv	25.53
------	----	-------	----	-------	-----	-------

SR (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.83
rep	2	b249	conc	2.91

SR (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	2.87	sd	0.053	%cv	1.84
------	----	------	----	-------	-----	------

SR (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.10
rep	2	b249	conc	-0.13

SR (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.11	sd	0.023	%cv	20.49
------	----	-------	----	-------	-----	-------

SR (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.92
rep	2	b249	conc	2.96

SR (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	2.94	sd	0.028	%cv	0.96
------	----	------	----	-------	-----	------

SR (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.11
rep	2	b249	conc	-0.14

SR (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.12	sd	0.022	%cv	17.73
------	----	-------	----	-------	-----	-------

SR (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.91
rep	2	b249	conc	2.93

SR (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	2.92	sd	0.013	%cv	0.45
------	----	------	----	-------	-----	------

SR (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.09
rep	2	b249	conc	-0.13

SR (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.11	sd	0.024	%cv	22.08
------	----	-------	----	-------	-----	-------

SR (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.92
rep	2	b249	conc	2.92

SR (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	2.92	sd	0.001	%cv	0.05
------	----	------	----	-------	-----	------

SR (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.10
rep	2	b249	conc	-0.13

SR (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.12	sd	0.023	%cv	19.73
------	----	-------	----	-------	-----	-------

SR (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.79
rep	2	b249	conc	2.78

SR (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	2.79	sd	0.007	%cv	0.26
------	----	------	----	-------	-----	------

SR (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.05
rep	2	b249	conc	-0.09

SR (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.07	sd	0.027	%cv	37.16
------	----	-------	----	-------	-----	-------

SR (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.94
rep	2	b249	conc	2.95

SR (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	2.94	sd	0.012	%cv	0.41
------	----	------	----	-------	-----	------

SR (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.05
rep	2	b249	conc	-0.08

SR (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.07	sd	0.022	%cv	32.64
------	----	-------	----	-------	-----	-------

SR (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.87
rep	2	b249	conc	2.90

SR (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	2.88	sd	0.022	%cv	0.77
------	----	------	----	-------	-----	------

OE (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.10
rep	2	b249	conc	-0.14

OE (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.12	sd	0.024	%cv	20.62
------	----	-------	----	-------	-----	-------

OE (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.33
rep	2	b249	conc	2.35

OE (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	2.34	sd	0.011	%cv	0.47
------	----	------	----	-------	-----	------

OE (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.11
rep	2	b249	conc	-0.14

OE (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.13	sd	0.024	%cv	19.05
------	----	-------	----	-------	-----	-------

OE (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.33
rep	2	b249	conc	2.35

OE (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	2.34	sd	0.014	%cv	0.61
------	----	------	----	-------	-----	------

OE (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.12
rep	2	b249	conc	-0.15

OE (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.13	sd	0.024	%cv	18.03
------	----	-------	----	-------	-----	-------

OE (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.31
rep	2	b249	conc	2.32

OE (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	2.32	sd	0.011	%cv	0.47
------	----	------	----	-------	-----	------

OE (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.12
rep	2	b249	conc	-0.15

OE (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.14	sd	0.023	%cv	16.33
------	----	-------	----	-------	-----	-------

OE (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.31
rep	2	b249	conc	2.36

OE (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	2.33	sd	0.034	%cv	1.46
------	----	------	----	-------	-----	------

OE (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.10
rep	2	b249	conc	-0.14

OE (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.12	sd	0.025	%cv	20.89
------	----	-------	----	-------	-----	-------

OE (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.29
rep	2	b249	conc	2.31

OE (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	2.30	sd	0.012	%cv	0.50
------	----	------	----	-------	-----	------

OE (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.10
rep	2	b249	conc	-0.14

OE (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.12	sd	0.026	%cv	21.54
------	----	-------	----	-------	-----	-------

OE (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.29
rep	2	b249	conc	2.31

OE (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	2.30	sd	0.009	%cv	0.40
------	----	------	----	-------	-----	------

OE (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.08
rep	2	b249	conc	-0.11

OE (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.10	sd	0.022	%cv	22.72
------	----	-------	----	-------	-----	-------

OE (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.29
rep	2	b249	conc	2.32

OE (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	2.31	sd	0.021	%cv	0.92
------	----	------	----	-------	-----	------

OE (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.08
rep	2	b249	conc	-0.12

OE (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.10	sd	0.026	%cv	26.52
------	----	-------	----	-------	-----	-------

OE (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.29
rep	2	b249	conc	2.31

OE (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	2.30	sd	0.016	%cv	0.68
------	----	------	----	-------	-----	------

ED (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.15
rep	2	b249	conc	-0.16

ED (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.15	sd	0.004	%cv	2.41
------	----	-------	----	-------	-----	------

ED (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.17
rep	2	b249	conc	2.18

ED (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	2.18	sd	0.006	%cv	0.30
------	----	------	----	-------	-----	------

ED (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.13
rep	2	b249	conc	-0.15

ED (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.14	sd	0.016	%cv	10.90
------	----	-------	----	-------	-----	-------

ED (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.17
rep	2	b249	conc	2.16

ED (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	2.16	sd	0.002	%cv	0.08
------	----	------	----	-------	-----	------

ED (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.14
rep	2	b249	conc	-0.16

ED (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.15	sd	0.017	%cv	11.35
------	----	-------	----	-------	-----	-------

ED (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.34
rep	2	b249	conc	2.35

ED (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	2.34	sd	0.010	%cv	0.42
------	----	------	----	-------	-----	------

ED (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.15
rep	2	b249	conc	-0.18

ED (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.16	sd	0.024	%cv	14.58
------	----	-------	----	-------	-----	-------

ED (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.36
rep	2	b249	conc	2.39

ED (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	2.38	sd	0.017	%cv	0.70
------	----	------	----	-------	-----	------

ED (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.13
rep	2	b249	conc	-0.16

ED (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.14	sd	0.023	%cv	16.35
------	----	-------	----	-------	-----	-------

ED (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.35
rep	2	b249	conc	2.36

ED (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	2.36	sd	0.013	%cv	0.55
------	----	------	----	-------	-----	------

ED (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.13
rep	2	b249	conc	-0.16

ED (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.14	sd	0.025	%cv	17.51
------	----	-------	----	-------	-----	-------

ED (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.32
rep	2	b249	conc	2.35

ED (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	2.33	sd	0.021	%cv	0.89
------	----	------	----	-------	-----	------

ED (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.10
rep	2	b249	conc	-0.14

ED (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.12	sd	0.023	%cv	19.17
------	----	-------	----	-------	-----	-------

ED (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.33
rep	2	b249	conc	2.36

ED (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	2.35	sd	0.016	%cv	0.67
------	----	------	----	-------	-----	------

ED (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.11
rep	2	b249	conc	-0.14

ED (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.12	sd	0.023	%cv	18.50
------	----	-------	----	-------	-----	-------

ED (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.34
rep	2	b249	conc	2.37

ED (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	2.35	sd	0.023	%cv	1.00
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.05
rep	2	b249	conc	-0.06

AR (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.06	sd	0.007	%cv	11.15
------	----	-------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.63
rep	2	b249	conc	9.71

AR (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	9.67	sd	0.058	%cv	0.60
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	0.05
rep	2	b249	conc	0.00

AR (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	0.02	sd	0.039	%cv	164.7
------	----	------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.49
rep	2	b249	conc	9.52

AR (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	9.51	sd	0.022	%cv	0.23
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.01
rep	2	b249	conc	-0.04

AR (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.02	sd	0.016	%cv	63.93
------	----	-------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.50
rep	2	b249	conc	9.53

AR (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	9.51	sd	0.017	%cv	0.17
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	0.03
rep	2	b249	conc	0.00

AR (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	0.02	sd	0.024	%cv	147.9
------	----	------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.56
rep	2	b249	conc	9.48

AR (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	9.52	sd	0.061	%cv	0.64
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.04
rep	2	b249	conc	-0.07

AR (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.05	sd	0.019	%cv	34.77
------	----	-------	----	-------	-----	-------

ED (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	2.34
rep	2	b249	conc	2.37

ED (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	2.35	sd	0.023	%cv	1.00
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.05
rep	2	b249	conc	-0.06

AR (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	-0.06	sd	0.007	%cv	11.15
------	----	-------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.63
rep	2	b249	conc	9.71

AR (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	9.67	sd	0.058	%cv	0.60
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	0.05
rep	2	b249	conc	0.00

AR (intra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	0.02	sd	0.039	%cv	164.7
------	----	------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 1 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.49
rep	2	b249	conc	9.52

AR (extra boron) 1 ชั่วโมง

b249	av	9.51	sd	0.022	%cv	0.23
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.01
rep	2	b249	conc	-0.04

AR (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	-0.02	sd	0.016	%cv	63.93
------	----	-------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.50
rep	2	b249	conc	9.53

AR (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	9.51	sd	0.017	%cv	0.17
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	0.03
rep	2	b249	conc	0.00

AR (intra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	0.02	sd	0.024	%cv	147.9
------	----	------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 3 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.56
rep	2	b249	conc	9.48

AR (extra boron) 3 ชั่วโมง

b249	av	9.52	sd	0.061	%cv	0.64
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.04
rep	2	b249	conc	-0.07

AR (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.05	sd	0.019	%cv	34.77
------	----	-------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.56
rep	2	b249	conc	9.62

AR (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	9.59	sd	0.039	%cv	0.41
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.04
rep	2	b249	conc	-0.07

AR (intra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	-0.05	sd	0.019	%cv	35.25
------	----	-------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 6 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.10
rep	2	b249	conc	9.18

AR (extra boron) 6 ชั่วโมง

b249	av	9.14	sd	0.055	%cv	0.60
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.04
rep	2	b249	conc	-0.06

AR (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.05	sd	0.013	%cv	25.23
------	----	-------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.11
rep	2	b249	conc	9.06

AR (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	9.09	sd	0.034	%cv	0.38
------	----	------	----	-------	-----	------

AR (intra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	-0.03
rep	2	b249	conc	-0.06

AR (intra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	-0.05	sd	0.015	%cv	33.55
------	----	-------	----	-------	-----	-------

AR (extra boron) 24 ชั่วโมง

rep	1	b249	conc	9.54
rep	2	b249	conc	9.50

AR (extra boron) 24 ชั่วโมง

b249	av	9.52	sd	0.028	%cv	0.29
------	----	------	----	-------	-----	------

การเตรียมสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Eagle's Minimum Essential Medium ; EMEM)

EMEM B10WHITTAKER (powder)	19.02	g
Sterile water for injection	2	L
HEPES	3	g
NaHCO ₃	2	g
ปรับ pH ด้วย 7.5% NaHCO ₃ ให้ได้ pH ประมาณ 7.0 – 7.2		
เติม Sodium Penicillin G	0.4	mL
เติม Streptomycin	1	mL

กรองด้วย millipore filter นำไปทดสอบ sterility เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเต็ม 10% Newborn Calf Serum

หมายเหตุ

1. การเตรียม Sodium Penicillin G โดยใช้ Sodium Penicillin G 5,000,000 units เติมน้ำกลั่น 10 mL จะได้ stock มีความเข้มข้น 500,000 units/mL ซึ่งปริมาณของ Sodium Penicillin G ที่ต้องใช้คือ 100,000 units/media 1 L

2. การเตรียม Streptomycin โดยใช้ Streptomycin base 1 g เติมน้ำกลั่น 5 mL จะได้ stock มีความเข้มข้น 0.2 g/mL ซึ่งปริมาณที่ต้องการคือ Streptomycin 0.1 g/media 1 L

2. 0.25% Trypsin in HEPES – Buffered Saline (HBS)

HEPES – Buffered Saline

NaCl	8.00	g
KCl	0.40	g
Na ₂ HPO ₄	0.10	g
D – Glucose	1.00	g
น้ำกลั่น	1.00	L

ละลาย Trypsin 2.5 g ใน HBS 1 L คนด้วยแท่งคนแม่เหล็ก ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.0 กรองด้วย millipore filter และนำไปทดสอบ sterility เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง

3. 0.4% Trypan blue dye

Trypan blue	1.60	g
NaCl	3.24	g
KH ₂ PO ₄	0.24	g
น้ำกลั่น	400	mL

นำไปอุ่นและปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2 – 7.3 ด้วย NaHCO₃

4. Hanks' balanced salt solution (HBSS)

		Per liter of 10X solution	
Solution 1			
NaCl	80.00	g	
KCl	4.00	g	
CaCl ₂	1.40	g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.00	g	
Solution 2			
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.7557	g	
KH ₂ PO ₄	0.60	g	
Glucose	10.00	g	
Phenol red 1%	16.00	mL	

ค่อย ๆ เทสารละลาย 2 ลงในสารละลาย 1 ให้มีปริมาตรรวมไม่เกิน 500 mL คนสารละลายด้วยแท่งคนแม่เหล็ก ปรับปริมาตรเป็น 1,000 mL ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย millipore filter จะได้สารละลาย HBSS ที่มีความเข้มข้นเป็น 10X ซึ่งตอนนำมาใช้ต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปเลี้ยงด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ปรับ pH ให้ได้ 7.0 – 7.2 ด้วย 2.8% NaHCO₃

5. Phosphate buffer solution (PBS)

NaCl	8.00	g
KCl	0.20	g
Na ₂ HPO ₄	1.15	g
KH ₂ PO ₄	0.20	g
น้ำกลั่น	1.00	L

autoclave 15 นาที

6. Solution C

เตรียมได้จากการผสม solution A และ solution B ในอัตราส่วน 50 : 1 โดยปริมาตร

Solution A

Na ₂ CO ₃	20.00	g
NaOH	4.00	g
Na – K tartate	0.20	g
น้ำกลั่น	1.00	L

Solution B

CuSO ₄ ·5H ₂ O	5.00	g
น้ำกลั่น	1.00	L

อภิธานศัพท์

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ สกุล	นางสาวกมลวรรณ แสนบุญรัตน์
วันเดือนปีเกิด	2 มกราคม 2520
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสระบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	44 หมู่ 1 ตำบลหนองโน อำเภอเมือง จังหวัดสระบุรี
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2535	มัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนเส้าไห้ “วิมลวิทยานุกูล”
พ.ศ. 2538	มัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนเส้าไห้ “วิมลวิทยานุกูล”
พ.ศ. 2542	กศ.บ.(เคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
พ.ศ. 2546	กศ.ม.(เคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร