การสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทหลากสีจากสารสกัดจากมัลเบอร์รี่เพื่อประยุกต์ใช้ในทางชีวการแพทย์

Facile and Green Synthesis of Multicolored Carbon Quantum Dots from Mulberry Extract for Biomedical Applications

จันทร์เพ็ญ ทองเหลือง (Janpen Thonghlueng)* พุทธธิดา รัชตเมธี (Puttatidar Ruchatametee)*
สาวินีย์ เงินพิมาย (Sawunee Ngernpimai)** คฑาวุธ นามดี (Dr.Katawut Namdee)***
ดร.ชฎามาศ สกลศิลป์ศิริ (Dr.Chadamas Sakonsinsiri))**** ดร.ธีระพงษ์ พวงมะลิ (Dr.Theerapong Puangmali)*****

บทคัดย่อ

คาร์บอนควอนตัมดอทเป็นวัสดุนาโนที่ถูกประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางทางด้านชีวการแพทย์ เนื่องจากมีสมบัติเชิงแสงที่โดดเด่น มีความเปนพิษต่อเซลล์ต่ำ และสามารถเข่ากับสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี ในงานวิจัยนี้ประกอบไปด้วย 2 ส่วนหลัก คือ การสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากมัลเบอร์รี่ด้วยเงื่อนไขต่าง ๆ และการทดสอบคาร์บอนควอนตัมดอทกับเซลล์ จากผลการศึกษาการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทด้วยวิธีไพโรไลซีสด้วยคลื่นไมโครเวฟ พบว่าที่กำลังไฟฟ้าของเครื่องไมโครเวฟ 800 วัตต์ และระยะเวลาในการสังเคราะห์ 10 นาที คาร์บอนควอนตัมดอทสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มแสงสูง และจากผลการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท พบว่าเมื่อเติมกรดไฮโดรคลอริก สามารถเตรียมคาร์บอนควอนตัมดอทขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1.6 - 2.3 นาโนเมตร นอกจากนี้แล้วการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาส พบว่าคาร์บอนควอนตัมดอทสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีและไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ อีกทั้งยังเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์อย่างชัดเจน ดังนั้นคาร์บอนควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ เปล่งแสงได้หลากสี เข้ากับสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดีจึงเหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในทางชีวการแพทย์

ABSTRACT

Carbon dots (CQDs) have been used in a broad range of biomedical applications due to its unique optical property, low toxicity, and excellent biocompatibility. The present study is divided into two main parts including (i) the synthesis of CQDs from the extract of mulberry and (ii) the cytotoxicity test. It was found that the CQDs synthesized by the microwave-based pyrolysis exhibited strong fluorescence intensity under the condition of 800 W for 10 minutes. The CQDs obtained from this method emit multicolor ranging from bright blue to yellow-green under UV light and its average size is 1.6-2.3 nm. According to the cytotoxicity test in fibroblast cell, it was found that the CQDs demonstrated excellent cellular uptake, non-toxicity, and improved cell division. These indicate that they are easily prepared, low-cost, multicolored, excellent biocompatibility, and suitable for biomedical applications.

คำสำคัญ: คาร์บอนควอนตัมดอท การสังเคราะห์ทางชีวภาพ ความเป็นกรดด่าง

Keywords: Carbon Quantum Dots (CQDs), Green synthesis, pH dependent

**นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
***นักวิจัย สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
****นักวิจัย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)*
*****ผู้ช่วยศาสตรจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*****รองศาสตรจารย์ สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นโรคที่มีอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก (Siegel et al., 2020)โดยสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตเนื่องมาจาก ผู้ป่วยรับรู้การเกิดโรคมะเร็งช้า ซึ่งส่วนใหญ่มักพบว่ามะเร็งอยู่ในระยะลุกลามแล้ว ทำให้การรักษาไม่ทันท่วงที ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว แม่นยำ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดอัตราการเสียชีวิตได้ (Al-Azri, 2016) รังสีวินิจฉัยเป็นหนึ่งในขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ในปัจจุบันที่สามารถระบุชนิด ตำแหน่ง รวมไปถึงระดับความรุนแรงของโรคมะเร็งจากการตรวจดูเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ผิดปกติผ่านการสร้างภาพทางรังสี เช่น การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT scan) การตรวจอัลตราซาวด์ และการตรวจคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) โดยการฉีดสารทึบรังสี (Contrast media) สามารถช่วยการตรวจวินิจฉัยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Brasch, Turetschek, 2000; Harvey et al., 2001) อย่างไรก็ตาม การตรวจเหล่านี้ล้วนมีข้อจำกัด เช่น มีค่าใช้จ่ายสูง ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้เครื่องมือที่มีเทคโนโลยีขั้นสูง และสารทึบรังสีราคาสูง ดังนั้นการลดต้นทุนในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง โดยการสร้างนวัตกรรมและวัสดุทดแทนที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงสารทึบรังสีและเกิดผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยที่สุด จึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

คาร์บอนควอนตัมดอท (Carbon quantum dots หรือ CQDs) เป็นวัสดุนาโนชนิดหนึ่งที่มีสมบัติโดดเด่นเฉพาะตัว ด้านสมบัติเชิงแสงที่สามารถดูดกลืนพลังงานและเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่นที่กว้าง มีความเข้ากันได้ดีกับสิ่งมีชีวิตเซลล์ มีความเป็นพิษต่ำ สามารถเข้าสู่เซลล์และอวัยวะภายในเซลล์ได้ง่าย รวมทั้งสามารถตรวจจับหรือติดตามเซลล์ในร่างกายได้จึงทำให้คาร์บอนควอนตัมดอทถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ได้หลากหลาย เช่น การนำส่งยาไปยังโมเลกุลเป้าหมาย การประยุกต์ใช้เป็นเซนเซอร์และการสร้างภาพทางชีวภาพ เป็นต้น (Hola et al., 2014, Tajik et al., 2020) คาร์บอนควอนตัมดอทจึงเป็นอีกหนึ่งวัสดุที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวย้อมสีทางชีวภาพ (biolabeling) (Unnikrishnan et al., 2020)ตัวถ่ายทางชีวภาพ (bioimaging) (Kim et al., 2017) ที่สามารถทดแทนสารทึบรังสีที่มีผลข้างเคียงต่อร่างกายได้ การสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทเพื่อนำไปใช้ในทางแพทย์นั้นต้องการความบริสุทธิ์สูงซึ่งมีวิธีการเตรียมที่หลากหลาย เช่น วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี วิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ และวิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ (Liu et al., 2019) การสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทโดยวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีสามารถลดการปนเปื้อนของสารเคมี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ สามารถใช้วัตถุดิบทางธรรมชาติ เช่น พืช สาหร่าย จุลินทรีย์ (Devatha, Thalla,2018) เป็นต้น

เบอร์รี่ (Berry) เป็นพืชตระกูลหนึ่งที่มีสรรพคุณมากมาย เช่น ช่วยในการควบคุมความเสี่ยงของโรคเรื้อรัง (Chronic diseases) ลดการอักเสบ และต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระ (Yang, Kortesniemi, 2015) ด้วยเหตุนี้เบอร์รี่จึงถูกประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์อย่างหลากหลาย อีกทั้งยังนำไปใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโน เช่น อนุภาคนาโนทอง หรืออนุภาคนาโนเงิน (Nadagouda et al., 2014) และสามารถสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทได้ (Kumar et al., 2019) จากรายงานวิจัยของ Rajkumar Bandi และคณะ (Bandi et al., 2018) ได้สังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากผลผกากรอง (Lantana camara berries) จากผลการทดลองพบว่าคาร์บอนควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้มีความเป็นพิษต่ำ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี และเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มแสงสูง สามารถตรวจจับไอออนของตะกั่วในน้ำได้ รวมทั้งสามารถนำไปใช้เป็นสร้างภาพทางชีวภาพได้ (Multi-color bioimaging) และสามารถนำไปต่อยอดทำเป็นตัวย้อมสีทางชีวภาพ (Biolabeling) ตัวถ่ายภาพทางชีวภาพ (Bioimaging) เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค หรือนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านชีวการแพทย์อื่น ๆ ได้ (Ahmadian-Fard-Fini et al., 2018)

ในการศึกษานี้จึงมุ่งความสนใจในการประยุกต์คาร์บอนควอนตัมดอทในทางการแพทย์ โดยเชื่อมโยงวิธีการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากมัลเบอร์รี่ ซึ่งเป็นพืชตระกูลเบอร์รี่ที่มีในท้องถิ่น ด้วยวิธีทางชีวภาพ นอกจากจะเพิ่มมูลค่าของพืชที่มีในท้องถิ่น

แล้ว ยังเป็นการสร้างวัสดุนาโนชนิดใหม่จากมัลเบอร์รี่ที่มีสมบัติเชิงแสงที่โดดเด่น และยังมีฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง วัสดุนี้จะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับวัสดุนาโนที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ ไม่ว่าจะเป็นการตรวจวินิจฉัยโรค รวมถึงการรักษาโรคในปัจจุบัน หรือสามารถนำไปต่อยอดได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทสีจากสารสกัดมัลเบอร์รี่ด้วยวิธีไมโครเวฟไพโรไลซิส
2. เพื่อศึกษาตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทด้วย ได้แก่ กำลังไฟฟ้า ระยะเวลา และความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก
3. เพื่อทดสอบคาร์บอนควอนตัมดอทต่อความเป็นพิษของเซลล์ (Cytotoxicity) และความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ (Cellular uptake)

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและเตรียมสารสกัดจากมัลเบอร์รี

เก็บตัวอย่างมัลเบอร์รี่ที่มีในจังหวัดขอนแก่น นำมาล้างให้สะอาดแล้วเอาขั้วมัลเบอร์รี่ออก จากนั้นจึงบดและคั้น แล้วต้มเป็นระยะเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และทำการกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารสกัดไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้สารสกัดเป็นผงจากผลมัลเบอร์รี่ หลังจากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทในขั้นตอนถัดไป โดยขั้นตอนการสกัด แสดงดังรูปที่ 1

ล้างทำความสะอาดผลมัลเบอร์รี่สด | บดและคั้นผลมัลเบอร์รี่จากนั้นนำไปต้ม | ผงมัลเบอร์รี่ที่ได้จากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

รูปที่ 1 ขั้นตอนการสกัดสารจากผลมัลเบอร์รี่

2. การศึกษาผลของกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท

ชั่งผงมัลเบอร์รี่ที่เตรียมได้ ปริมาณ 100 มิลลิกรัม นำมาละลายลงในน้ำปราศจากไอออน (DI) 10 มิลลิลิตร คนสารละลายผสมที่อุณภูมิห้อง และทำให้กระจายตัวในรูปสารแขวนลอยในเครื่องอัลตราโซนิค(ultrasonication bath) นำไปสังเคราะห์ด้วยเครื่องไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 600 และ 800 วัตต์ โดยควบคุมระยะเวลาในการสังเคราะห์ 10 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง

24 ชั่วโมง แล้วทำการละลายกลับด้วยน้ำ DI 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยการนำมากรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซสเซียสเพื่อรอนำไปศึกษาในขั้นตอนถัดไป

3. การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท

ชั่งผงมัลเบอร์รี่ที่เตรียมได้ ปริมาณ 100 มิลลิกรัม นำมาละลายลงในน้ำปราศจากไอออน (DI) 10 มิลลิลิตร คนสารละลายผสมที่อุณภูมิห้อง และทำให้กระจายตัวในรูปสารแขวนลอยในเครื่องอัลตราโซนิค (ultrasonication bath) นำไปสังเคราะห์ด้วยเครื่องไมโครเวฟที่โดยควบคุมกำลังไฟฟ้าที่เหมาะสมจากการศึกษาที่ 2 โดยการสังเคราะห์ที่ระยะเวลา 3 นาที (CDQs-0M-3) และการสังเคราะห์ที่ระยะเวลา 10 นาที (CDQs-0M-10) หลังจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วทำการละลายกลับด้วยน้ำ DI 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยการนำมากรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซสเซียสเพื่อ รอนำไปศึกษาในขั้นตอนถัดไป

4. การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท

ทำการทดลองโดยการเติม ความเข้มข้นกรดไฮโดคลอริก 1 โมลาร์ (CQDs-1M), ความเข้มข้นกรดไฮโดคลอริก 5 โมลาร์ (CQDs-5M), ความเข้มข้นกรดไฮโดคลอริก 7 โมลาร์ (CQDs-7M) และความเข้มข้นกรดไฮโดคลอริก 10 โมลาร์ (CQDs-10M) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในผงมัลเบอร์รี่ปริมาณ 100 มิลลิกรัม สังเคราะห์มัลเบอร์รี่โดยให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟเป็นระยะเวลา 10 นาที กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ หลังจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วทำการละลายกลับด้วยน้ำ DI 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยการนำมากรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซสเซียสเพื่อรอนำไปศึกษาในขั้นตอนถัดไป

5. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์ของคาร์บอนควอนตัมดอท ด้วยวิธี Methyl tetrazolium 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) โดยศึกษาร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ไฟโบรบลาส ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ เลี้ยงเซลล์ลงในแผ่นหลุม โดยให้มีเซลล์ประมาณ 1,000 – 10,000 เซลล์ต่อหลุม ทำการเลี้ยงเซลล์ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ประกอบด้วย 90% DMEM และ 10% SERUM จากนั้นเติมด้วยคาร์บอนควอนตัมดอทและสารสกัดมัลเบอร์รี่ที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการชะล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) เติมสารละลาย MTT ที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วดูดเอาสารละลาย MTT ออก แล้วเติมดีเอ็มเอสโอ (Dimethyl Sulfoxide หรือ DMSO) เพื่อละลายผลึกที่เกิดขึ้นออกไป แล้วนำสารตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำมาวิเคราะห์ผล

6. การศึกษาความสามารถในการเข้าสู่เซลล์

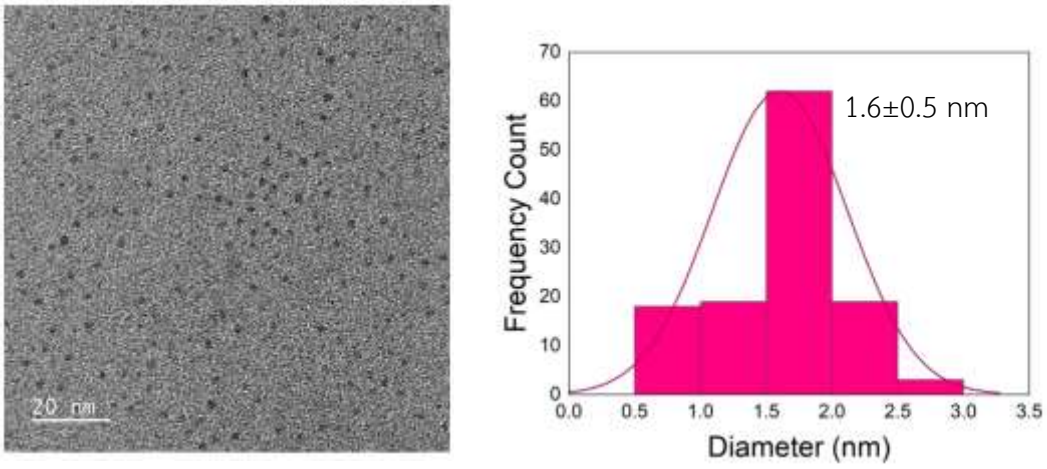
การศึกษาความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของคาร์บอนควอนตัมดอท ด้วยการทำ Uptake assay โดยศึกษาการศึกษาอันตรกิริยาของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีต่อคาร์บอนควอนตัมดอทและสารสกัดมัลเบอร์รี่ ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ เตรียมเซลล์ไฟโบ

รบลาสด้วยการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์ แล้วนำมาใส่ลงถาดหลุม โดยให้มีเซลล์ประมาณ 3 x 10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วรอให้เซลล์ลงเกาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์และเติม CQDs และสารสกัดมัลเบอร์รี่ที่เตรียมไว้แล้วลงไป โดยกำหนดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 0 นาที, 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมงและ 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการสลายเซลล์ด้วย titanx100 แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่าการเปล่งแสงด้วยเครื่องเครื่องฟลูออเรสเซนส์ไมโครเพลทรีดเดอร์ แล้วนำมาวิเคราะห์ผล

ผลการวิจัย

1. ผลจากการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากสารสกัดมัลเบอร์รี่

จากการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทด้วยวิธีไพโรไลซิส (pyrolysis) หรือปฏิกิริยาการรวมตัวของคารบอน (carbonization) จากสารสกัดมัลเบอร์รี่ โดยใช้ไมโครเวฟ พบว่าคาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้จากการสังเคราะห์ มีลักษณะรูปทรงเป็นกึ่งทรงกลม มีขนาดไม่สม่ำเสมอและมีปริมาณเยอะ โดยการตรวจสอบลักษณะสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) และเมื่อวัดอนุภาคด้วยโปรแกรม (Image J) พบว่าตัวอย่างคาร์บอนควอนตัมดอท (CQD-0M-10) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0-3 nm และมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.6±0.5 นาโนเมตร ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2



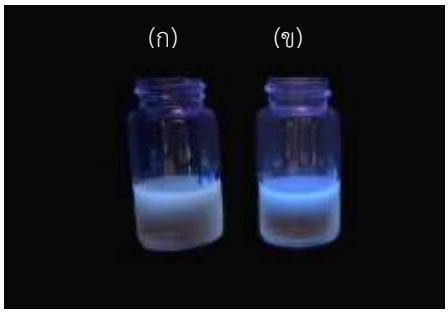
รูปที่ 2 ภาพถ่าย TEM ของคาร์บอนควอนตัมดอท และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายตัวและขนาดของคาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้จากการสังเคราะห์

2. ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท

2.1 ผลของการใช้กำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟในการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ทำการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากสารสกัดมัลเบอร์รี่ ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของกำลังไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยที่เคยมีการสังเคราะห์จากสารสกัดจากพืช จากงานวิจัยของ Urooj Gul และคณะ (Gul et al., 2018) ทำการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากเปลือกกล้วย โดยสังเคราะห์ด้วยวิธีไมโครเวฟใช้

กำลังไฟฟ้า 700 วัตต์ รวมไปถึงงานวิจัยของ Kaviyarasan Raji และคณะ (Raji et al., 2018) ทำการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอจากเมล็ดขนุน โดยสังเคราะห์ด้วยวิธีไมโครเวฟใช้กำลังไฟฟ้า 600 วัตต์ นอกจากนี้ Zahra Ramezani และคณะ (Ramezani et al., 2018) ทำการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากลูกควินซ์ (Quince) โดยสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทที่เงื่อนไขต่าง ๆ โดยศึกษากำลังไฟฟ้าในช่วง 600-850 วัตต์ จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทดอทจากสารสกัดจากพืชโดยใช้วิธีไมโครเวฟ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยนี้ จึงเป็นที่มาในการเลือกกำลังไฟฟ้าในการสังเคราะห์ที่ 600 วัตต์และ 800 วัตต์ จากการศึกษาผลของกำลังไฟฟ้าของเครื่องไมโครเวฟต่อการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท พบว่าคาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้จากการสังเคราะห์ที่กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ เปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่นสีฟ้าภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) 365 นาโนเมตร เช่นเดียวกับคาร์บอนควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ด้วยกำลังไฟฟ้า 600 วัตต์ นอกจากนี้พบว่าคาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ มีความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์มากกว่าเมื่อสังเคราะห์ที่กำลังไฟฟ้า 600 วัตต์ ดังแสดงในรูปที่ 3 ผลที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากความร้อนในกระบวนการสังเคราะห์ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของคาร์บอน (carbonization) ดังนั้นเมื่อปริมาณความร้อนที่สูงกว่าช่วยในการสลายพันธะตั้งต้นของมัลเบอร์รี่ได้มากกว่า ทำให้โมเลกุลตั้งต้นเกิดการควบแน่นการก่อตัวของผลึก ทำให้เกิดการรวมตัวของคาร์บอนควอนตัมดอทมีปริมาณมากขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟ 800 วัตต์ เป็นการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากมัลเบอร์รี่

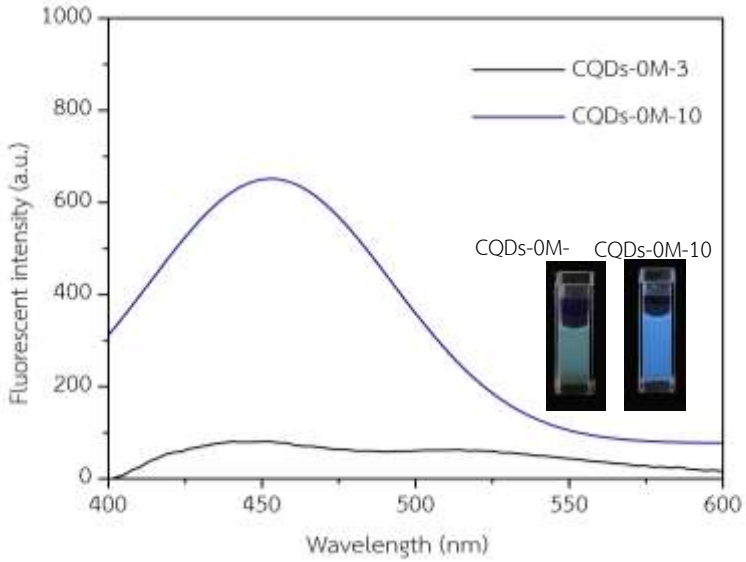


รูปที่ 3 คาร์บอนควอนตัมดอทภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีไมโครเวฟไพโรไลซิส เมื่อใช้กำลังฟ้าของไมโครเวฟ (ก) 600 วัตต์ และ (ข) 800 วัตต์

2.2 ผลของระยะเวลาในการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท

จากการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท โดยการสังเคราะห์ที่ระยะเวลา 3 นาที และ 10 นาที พบว่าคาร์บอนควอนตัมดอทเปล่งแสงความยาวคลื่นสีฟ้าเดียวกันภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้จากสังเคราะห์ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติเชิงแสงด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี และฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี เมื่อทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 370 นาโมเมตร เกิดการเปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการศึกษานี้พบว่าระยะเวลาในการสังเคราะห์ต่างกันไม่ส่งผลต่อความยาวคลื่นของแสงที่เปล่งออกมา แต่ส่งผลต่อค่าความเข้มการเปล่งแสงของคาร์บอนควอนตัมดอท แสดงดังรูป 4 เมื่อระยะเวลาในการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นคาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้จะสว่างมากขึ้น เนื่องมาจากระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับปริมาณความร้อนสะสม และระยะเวลาในการสลายพันธะของมัลเบอร์รี่ที่เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เกิดการรวมตัวของสารตั้งต้นมีปริมาณมากขึ้น นอกจากนี้คาร์บอน

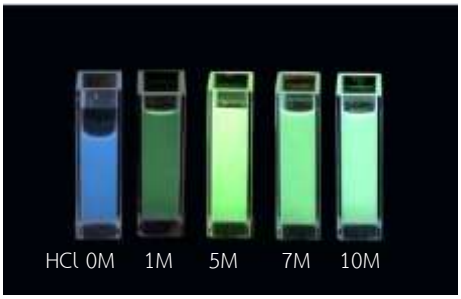
ควอนตัมดอทที่ได้จากการสังเคราะห์ที่ระยะเวลา 3 นาทีอาจเกิดปฏิกิริยาการคาร์บอไนเซชั่นไม่สมบูรณ์ จึงเปล่งแสงได้น้อยเมื่อเทียบกับการสังเคราะห์ที่ระยะเวลา 10 นาที



รูปที่ 4 สเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ (Em) ของคาร์บอนควอนตัมดอทจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีไมโครเวฟไพโรไลซิส ที่เวลา (ก) 3 นาที และ (ข) 10 นาที

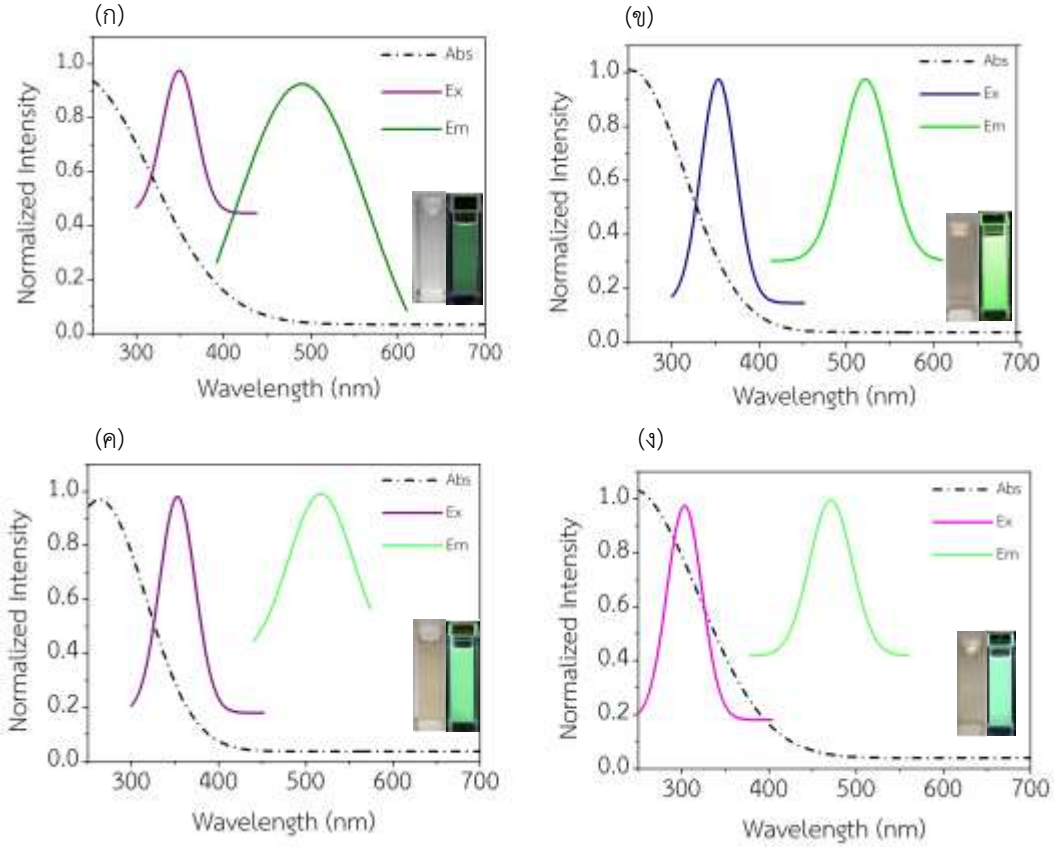
2.3 ผลของความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริกในการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอท

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริต่อการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทที่ความเข้มข้น CQDs-1M CQDs-5M CQDs-7M และ CQDs-10M โดยให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟด้วยกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ พบว่าความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกส่งผลต่อสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ของคาร์บอนควอนตัมดอท เมื่อสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทที่ CQDs-1M คาร์บอนควอนตัมดอทเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่นสีฟ้าภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) ในขณะที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ คาร์บอนควอนตัมดอทเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่นสีเขียว และ CQDs-5M, CQDs-7M และ CQDs-10M คาร์บอนควอนตัมดอทที่เปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่นสีเขียวอมเหลือง แสดงดังรูปที่ 5



รูป 5 คาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีไมโครเวฟไพโรไลซิสด้วยความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกตั้งแต่ 0 โมลาร์ จนไปถึง 10 โมลาร์ ภายใต้แสงยูวี 365 นาโนเมตร

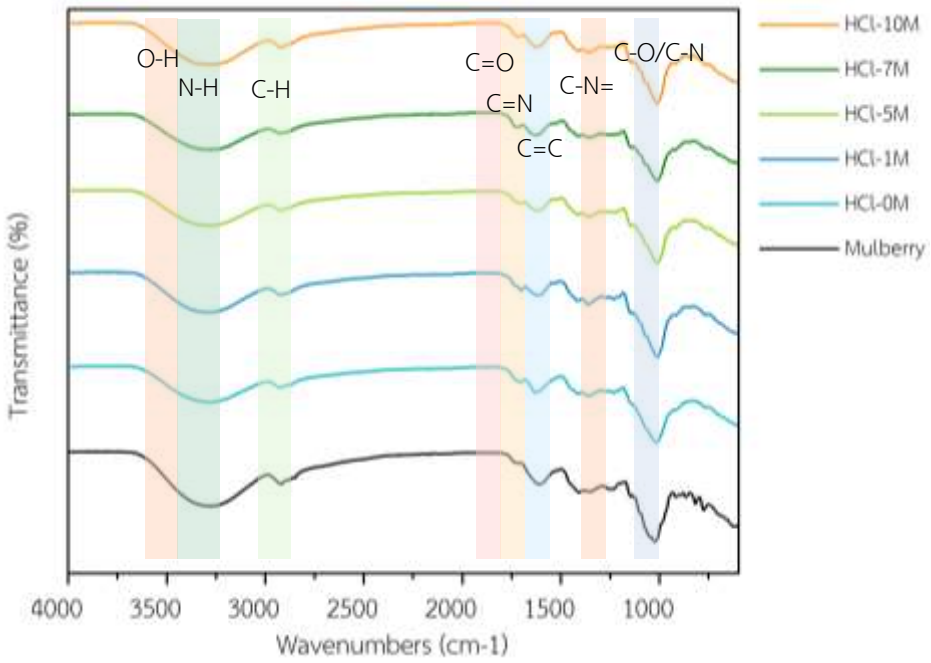
หลังจากนั้นได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนควอนตัมดอทด้วยเทคนิคการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล (UV-Vis), และสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ จากการศึกษาพบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคาร์บอนควอนตัมดอท มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 300-365 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 6 (เส้นประสีดำ) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร CQDs-1M เปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร สำหรับตัวอย่าง CQDs-5M กระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และตัวอย่าง CQDs-7M กระตุ้นแสงด้วยความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร เปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสุดท้ายตัวอย่าง CQDs-10M กระตุ้นที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร แสดงดังรูป ซึ่งพบว่าสเปกตรัมการเปล่งแสงมีการเลื่อนไปในทิศทางความยาวคลื่นที่สูงขึ้น (red-shifted) เมื่อความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริกมากขึ้น เนื่องมาจากกรดไฮโดรคลอริกเร่งให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน และคาร์บอไนเซชันขององค์ประกอบในสารสกัดจากมัลเบอร์รี่ ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่มาก



รูปที่ 6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง (Abs) สเปกตรัมการกระตุ้นแสง (Ex) และสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ (Em) ของคาร์บอนควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ด้วยความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (ก) 1 M (ข) 5 M (ค) 7M (ง) 10M

นอกจากนี้ศึกษาหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของคาร์บอนควอนตัมดอทด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟาเรด ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของแสงส่งผ่าน (Transmittance) และเลขคลื่น โดยมัลเบอรี่และคาร์บอนควอนตัมดอทแต่ละเงื่อนไขนั้น จะมีลักษณะของสเปกตรัมลักษณะที่คล้ายกัน โดยสเปกตรัมความเข้มแสงที่ส่งผ่าน สามารถอธิบายผลการองค์ประกอบของพันธะ

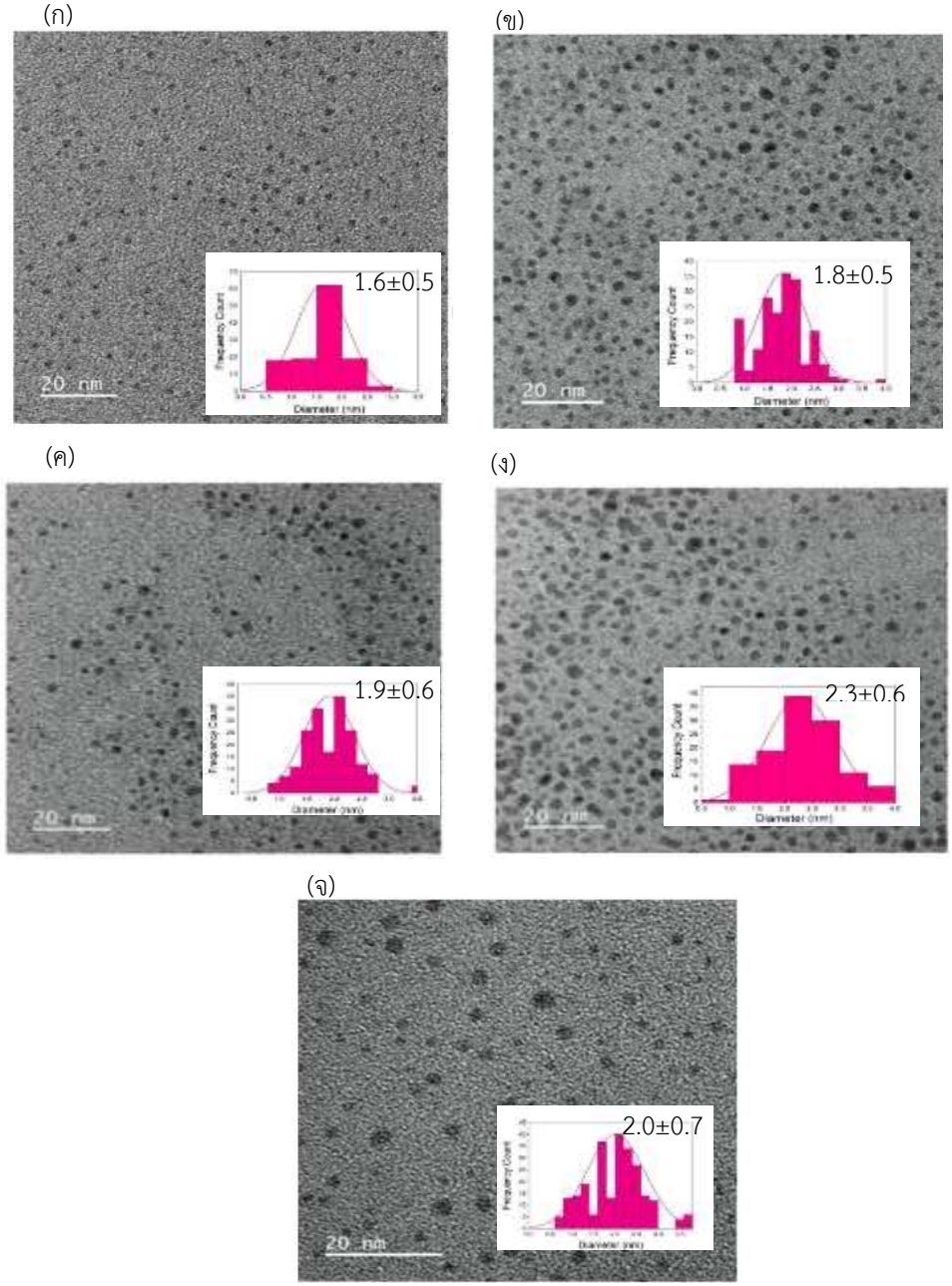
เคมีโดยใช้ข้อมูลดังต่อไปนี้ องค์ประกอบพันธะเคมีส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของอะโรมาติก (Aromatic group) ได้แก่พันธะของ C-H พบได้ที่พีคเลขคลื่น 2900 cm^{-1} พันธะของ C=C พบได้ที่พีค 1400 cm^{-1} และพบหมู่คาร์บอนิล C=O ที่ 1710 cm^{-1} นอกจากนี้ยังมีพบหมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนพื้นผิวของคาร์บอนควอนตัมดอทของหมู่เอไมด์ ได้แก่ พันธะ C-N ที่ 1012 cm^{-1} พันธะ C=N พบได้ที่พีค 1630 cm^{-1} พันธะ C-N= ได้ที่พีค 1365 cm^{-1} และ พันธะ N-H พบได้ที่พีค 3279 cm^{-1} ซึ่งยืนยันได้ว่าคาร์บอนควอนตัมดอทมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยอะโรมาติกที่คอนจูเกตกับกลุ่มของออกซิเจนและไนโตรเจนที่พื้นผิว แสดงดังรูปที่ 6 เมื่อนำไปวัดด้วนเครื่อง zeta-sizer พบว่าคาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้แสดงประจุลบบนพื้นผิวเมื่ออยู่ในน้ำ DI (pH 7.4) ที่อุณหภูมิห้อง โดย CQDs-0M-10 มีค่าประจุบนพื้นผิวเท่ากับ -14.4 ± 0.8 mV CQDs-1M มีค่าประจุบนบนพื้นผิวเท่ากับ -15.1 ± 0.7 mV CQDs-5M มีค่าประจุบนบนพื้นผิวเท่ากับ -15.7 ± 0.4 mV CQDs-7M มีค่าประจุบนบนพื้นผิวเท่ากับ -18.4 ± 1.1 mV และ CQDs-10M มีค่าประจุบนบนพื้นผิวเท่ากับ -19.1 ± 0.5 mV แสดงดังรูปที่ 7 จากผลการศึกษาหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวคาร์บอนควอนตัมดอทเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก คาร์บอนควอนตัมดอทมีหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวชนิดเดียวกัน แต่การเพิ่มความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอกริกทำให้คาร์บอนควอนตัมดอทมีขนาดใหญ่ขึ้น อาจเนื่องมาจากจำนวนหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวเพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดสถานะกัก (surface state) ส่งผลให้เกิดการ red-shifted



รูปที่ 7 สเปกตรัมกระตุ้นสารด้วยพลังงานแสงช่วงแสงอินฟราเรด (FTIR) แสดงหมู่ฟังก์ชันและพันธะเคมีของคาร์บอนควอนตัมดอท

นอกจากนี้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของคาร์บอนควอนตัมดอทด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) เมื่อวัดอนุภาคด้วยโปรแกรม (Image J) พบว่าตัวอย่าง CQDs-0M มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.6±0.5 นาโนเมตร ตัวอย่าง CQDs-1M มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.8±0.5 นาโนเมตร ตัวอย่าง CQDs-5M มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย1.9±0.6 นาโนเมตร ตัวอย่าง CQDs-7M มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.0±0.7 นาโนเมตร และสุดท้ายตัวอย่าง CQDs-10M มีขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลางเฉลี่ย 2.3±0.6 นาโนเมตร ดังแสดงในรูป 5.14 คาร์บอนควอนตัมดอทที่ได้จากการสังเคราะห์ มีลักษณะรูปทรงเป็นกึ่งทรงกลม มีขนาดไม่สม่ำเสมอและมีปริมาณเยอะ และมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริกเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากกรดไฮโดรคลอริกไปช่วยเร่งปฏิกิยาการสลายพันธะและการเกิดกระบวนการรวมตัวของคาร์บอนจึงทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันจนขนาดใหญ่ขึ้น ดังรูปที่ 8

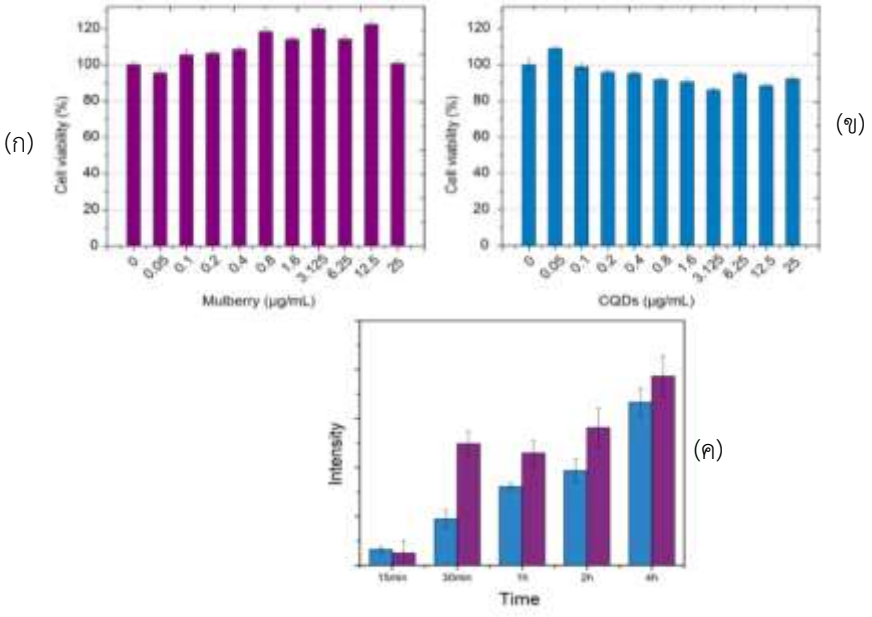


รูปที่ 8 ภาพถ่าย TEM ของคาร์บอนควอนตัมดอท และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างของการกระจายตัวและขนาดของคาร์บอนควอนตัมดอท (รูปเล็กด้านล่าง) ของตัวอย่าง (ก) CQDs-0M (ข) CQDs-1M (ค) CQDs-5M (ง) CQDs-7M และ (จ) CQDs-10M

3. ผลความเป็นพิษต่อเซลล์และความสามารถในการเข้าสู่เซลล์

จากการศึกษาความเป็นพิษของคาร์บอนควอนตัมดอทและสารสกัดจากมัลเบอร์รี่ด้วย MTT assay พบว่า ที่เงื่อนไขความเข้มข้นสูงสุด 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้เวลผ่านไป 48 ชั่วโมง สารสกัดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาส นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์สูงสุดได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 7 (ก) และคาร์บอนควอนตัมดอท (CDQs-0M-10) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาส ความเข้มข้นสูงสุด คือ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูป 9 (ข) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงโอกาสที่จะนำคาร์บอนควอนตัมดอทไปประยุกต์ใช้ในทางชีวการแพทย์

จากการศึกษาความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของคาร์บอนควอนตัมดอทและสารสกัดจากมัลเบอร์รี่ที่มีต่อเซลล์ไฟโบรบลาส พบว่ามัลเบอร์รี่และคาร์บอนควอนตัมดอท (CQDs-0M-10) สามารถเข้าสู่ได้ โดยที่มัลเบอร์รี่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีดว่า CQDs-0M-10 ดังแสดงในรูปที่ 9 (ค) คาดว่าอาจเป็นผลเนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีของมัลเบอร์รี่ นอกจากนี้อนุภาคที่มีประจุลบหรือ CQDs-0M-10 นั้นก็ยังสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องมาจากการเข้าสู่เซลล์นั้นอาศัยปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน เช่น 1) ประจุบนพื้นผิว โดยที่ประจุบวกสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด ตามด้วยประจุเป็นกลางและประจุลบตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากลักษณะและองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นฟอสโฟลิปิดไบเลเยอร์ที่มีประจบบนพื้นผิวเป็นลบ และ 2) ขนาดของอนุภาค โดยถ้าอนุภาคขนาดใหญ่กว่า 10 นาโนเมตร จะเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี endocytosis ในลักษณะของ vesicle ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งานภายในเซลล์ หากต้องการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์จำต้องทำการสลาย vesicle นั้นก่อนเพื่อให้อนุภาคออกมาจาก vesicle และถ้าขนาดของอนุภาคเล็กกว่า 10 นาโนเมตร จะมีวิธีการเข้าสู่เซลล์ diffusion หรือการแทรกตัวของอนุภาคขนาดเล็ก โดยขนาดของ CQDs-0M-10 มีขนาดเฉลี่ยราว 1.53±0.4 นาโนเมตร ทำให้สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ค่อนข้างดี



รูปที่ 9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสของคาร์บอนควอนตัมดอท (ก) ความเป็นพิษต่อเซลล์ของมัลเบอร์รี่ (ข)ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ CQDs-0M และ(ค) ความสามารถการเข้าสู่เซลล์ของมัลเบอร์รี่เทียบกับคาร์บอนควอนตัมดอท (CQDs-0M)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทด้วยวิธีทางชีวภาพ จากสารสกัดจากมัลเบอร์รี่ โดยการสังเคราะห์ด้วยวิธีไพโรไลซิสโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ ผลจากการสังเคราะห์คาร์บอนควอนตัมดอทจากมัลเบอร์รี่ พบว่าเมื่อเพิ่มความเป็นกรดด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคาร์บอนควอนตัมดอทจะเลื่อนไปทางความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น (Red-shifted) หรือจากสีฟ้าไปเป็นสีเขียวอมเหลือง เนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกไปช่วยในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะและการเกิดกระบวนการการรวมตัวของคาร์บอน จึงทำให้คาร์บอนควอนตัมดอทเกิดการรวมตัวจนมีขนาดใหญ่ขึ้น จาก 1.6 ±0.5 นาโนเมตร ไปจนถึง 2.3±0.6 นาโนเมตร และระยะเวลาในการสังเคราะห์ยังส่งผลต่อความเข้มของการเปล่งแสงคาร์บอนควอนตัมดอทด้วย นอกจากนี้ได้ศึกษาความเป็นพิษและความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของคาร์บอนควอนตัมดอทที่มีต่อเซลล์ไฟโบรบลาส เมื่อคาร์บอนควอนตัมดอทที่ความเข้มข้นสูงสุดเกิดอันตรกิริยากับเซลล์ไฟโบรบลาส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทดสอบสารสกัดจากมัลเบอร์รี่กับเซลล์ไฟโบรบลาส แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์อีกด้วย โดยที่สารสกัดจากมัลเบอร์รี่และคาร์บอนควอนตัมดอทนั้นแสดงความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ได้ดี คาร์บอนควอนตัมดอทจึงเป็นวัสดุที่มีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ วิธีการสังเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้คาร์บอนควอนตัมดอทจึงสามารถมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในทางชีวการแพทย์ไม่ว่าจะเป็นการย้อมสีเซลล์ การถ่ายภาพทางชีวภาพ ไปจนถึงการนำส่งยาและตัวตรวจวัดทางชีวภาพได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Ahmadian-Fard-Fini, S., Salavati-Niasari, M., & Ghanbari, D. Hydrothermal green synthesis of magnetic Fe3O4-carbon dots by lemon and grape fruit extracts and as a photoluminescence sensor for detecting of E. coli bacteria. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2018; 203: 481-493.

Al-Azri, M. H. Delay in cancer diagnosis: causes and possible solutions. Oman Medical Journal 2016; 31(5): 325.

Brasch, R., & Turetschek, K. MRI characterization of tumors and grading angiogenesis using macromolecular contrast media: status report. European journal of radiology 2000; 34(3): 148-155.

Bandi, R., Dadigala, R., Gangapuram, B. R., & Guttena, V. Green synthesis of highly fluorescent nitrogen–doped carbon dots from Lantana camara berries for effective detection of lead (II) and bioimaging. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2018; 178:330-338.

Devatha, C. P., & Thalla, A. K. Green synthesis of nanomaterials. In Synthesis of inorganic nanomaterials. Woodhead Publishing 2018: 169-184

Gul, U., Kanwal, S., Tabassum, S., Gilani, M. A., & Rahim, A.. Microwave-assisted synthesis of carbon dots as reductant and stabilizer for silver nanoparticles with enhanced-peroxidase like activity for colorimetric determination of hydrogen peroxide and glucose. Microchimica Acta 2020; 187(2): 1-8.

Harvey, C. J., Blomley, M. J., Eckersley, R. J., & Cosgrove, D. O. Developments in ultrasound contrast media. European radiology 2001; 11(4): 675-689.

Hola, K., Zhang, Y., Wang, Y., Giannelis, E. P., Zboril, R., & Rogach, A. L. Carbon dots—Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. Nano Today 2014; 9(5) : 590-603.

Kim, S., Choi, Y., Park, G., Won, C., Park, Y. J., Lee, Y., ... & Min, D. H. Highly efficient gene silencing and bioimaging based on fluorescent carbon dots in vitro and in vivo. Nano Research 2017; 10(2): 503-519.

Kumar, B., Vizuete, K. S., Sharma, V., Debut, A., & Cumbal, L. Ecofriendly synthesis of monodispersed silver nanoparticles using Andean Mortiño berry as reductant and its photocatalytic activity. Vacuum 2019; 160: 272-278.

Liu, M. L., Chen, B. B., Li, C. M., & Huang, C. Z. Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. Green chemistry 2019; 21(3): 449-471.

Liu, Q., Zhang, N., Shi, H., Ji, W., Guo, X., Yuan, W., & Hu, Q. One-step microwave synthesis of carbon dots for highly sensitive and selective detection of copper ions in aqueous solution. New Journal of Chemistry 2018; 42(4): 3097-3101.

Nadagouda, M. N., Iyanna, N., Lalley, J., Han, C., Dionysiou, D. D., & Varma, R. S. Synthesis of silver and gold nanoparticles using antioxidants from blackberry, blueberry, pomegranate, and turmeric extracts. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 2014; 2(7): 1717-1723.

Ramezani, Z., Qorbanpour, M., & Rahbar, N. Green synthesis of carbon quantum dots using quince fruit (Cydonia oblonga) powder as carbon precursor: application in cell imaging and As3+ determination. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2018; 549: 58-66.

Raji, K., Ramanan, V., & Ramamurthy, P. Facile and green synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots from jackfruit seeds and its applications towards the fluorimetric detection of Au 3+ ions in aqueous medium and in in vitro multicolor cell imaging. New Journal of Chemistry 2019; 43(29): 11710- 11719.

Tajik, S., Dourandish, Z., Zhang, K., Beitollahi, H., Van Le, Q., Jang, H. W., & Shokouhimehr, M. Carbon and graphene quantum dots: A review on syntheses, characterization, biological and sensing applications for neurotransmitter determination. RSC Advances 2020; 10(26) : 15406-15429.

Unnikrishnan, B., Wu, R. S., Wei, S. C., Huang, C. C., & Chang, H. T. Fluorescent carbon dots for selective labeling of subcellular organelles. Acs Omega 2020; 5(20) : 11248-11261.

Yang, B., & Kortesniemi, M. Clinical evidence on potential health benefits of berries. Current Opinion in Food Science 2015; 2: 36-42.