



วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

ISSN 0858-2297



RESEARCH ARTICLE

The study of chemical composition, physical characteristic and cytotoxicity of Thai bentonite

Nikom Srikacha¹, Bundit Tengjaroensakul^{*}

¹Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^{*}Corresponding author E-mail: btengjar@kku.ac.th

Received 6 December 2021, Revised 7 March 2022 Accepted 2 April 2022, Published 30 May 2022

Abstract

Objectives: The aims of this study were to investigate the structurally chemical and physical properties, and to evaluate primary cytotoxicity of Thai bentonite on Vero cell line.

Materials and Methods: The structure of Thai bentonite was investigated by measuring pH, cation exchange capacity (CEC), specific surface area, swelling index, crystal structure, functional group, surface morphology and elemental composition, while the cytotoxicity of Thai bentonite was conducted by MTT assay on Vero cell line.

Results: The results revealed that Thai bentonite had chemical and physical properties as reported of another bentonite, and it had high adsorption property because of high CEC, specific surface area and swelling index. In addition, it had no contamination of harmful element. Thai bentonite showed the low cytotoxicity level on Vero cell line as presenting the half-maximal inhibitory concentration at 66, 20 and 15 mg/L after exposure at 24, 48 and 72 h, respectively.

Conclusion: All results indicated that Thai bentonite had the great adsorption property with safe application in organism, and it also contained supplementarily necessary elements for animals.

Keywords: : Adsorption, bentonite, clay, cytotoxicity, livestock

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ลักษณะทางกายภาพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของ เบนทอไนต์ของไทย

นิคม ศรีกระชา¹, บัณฑิตย์ เต็งเจริญสกุล^{1*}

¹คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

*ผู้ประพันธ์บรรณกิจ อีเมลล์: btengjar@kku.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ลักษณะทางกายภาพของโครงสร้าง และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของเบนทอไนต์ของไทย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-เบส ความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออน พื้นที่ผิวจำเพาะ ดัชนีการพองตัว โครงสร้างผลึก หมู่ฟังก์ชัน ลักษณะโครงสร้างภายนอก และองค์ประกอบธาตุ รวมทั้งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไตด้วยวิธีการเตตราโซเลียม ดาย

ผลการศึกษา ผลการศึกษาพบว่าเบนทอไนต์ของไทยมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพคล้ายคลึงกับเบนทอไนต์ทั่วไป และมีประสิทธิภาพในการดูดซับสูงเนื่องจากมีค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออน พื้นที่ผิวจำเพาะ และดัชนีการพองตัวสูง นอกจากนี้เบนทอไนต์ไทยไม่พบการปนเปื้อนธาตุที่เป็นอันตรายต่อสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไตที่พบว่าเบนทอไนต์มีความเป็นพิษต่ำ โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ได้ร้อยละ 50 อยู่ที่ 66, 20 และ 15 mg/L เมื่อได้รับการทดสอบที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

สรุป จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่าเบนทอไนต์ของไทยมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการดูดซับสารที่มีประจุ และมีความปลอดภัยในการประยุกต์ใช้ในสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้เบนทอไนต์ยังเป็นแหล่งแร่ธาตุเสริมที่จำเป็นต่อร่างกายสัตว์

คำสำคัญ: การดูดซับ, ความเป็นพิษต่อเซลล์, เบนทอไนต์, ปุ๋ยสัตว์, แร่ดินเหนียว

บทนำ

สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxin) เป็นสารประกอบทุติย-
ภูมิ (Secondary metabolites) ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากเชื้อราเป็น
หนึ่งในปัจจัยที่สร้างผลกระทบต่อเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมการ
เลี้ยงสัตว์มาอย่างยาวนาน ซึ่งมักพบการปนเปื้อนมาในผลผลิต
ทางการเกษตรที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยเชื้อราสามารถ
เจริญเติบโตและผลิตสารพิษได้ในภาวะอุณหภูมิ ความชื้นและ
สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Poapolathep, 2019) สารพิษที่สร้าง
จากเชื้อราที่มักพบการปนเปื้อนมาในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์
ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ซีราลีโนน (Zearalenone) ดี-
ออกซีนิวาลีโนน (Deoxynivalenol) ฟูโมนิซิน (Fumonisin) และ
โอคราทอกซิน (Ochratoxins) (Gonçalves and Kovalsky,
2015) ซึ่งอะฟลาทอกซินเป็นสารพิษจากเชื้อราชนิดหนึ่งที่ได้รับ
การเฝ้าระวังการปนเปื้อนเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยง
สัตว์โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อน (Tropical region) และ
เขตเหนือหรือใต้เขตร้อน (Subtropical region) สารพิษจากเชื้อ
รามักพบการปนเปื้อนมากับอาหารสัตว์สำเร็จรูป และวัตถุดิบ
อาหารสัตว์ ได้แก่ กากถั่วเหลือง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง กากถั่วลิสง
กากมะพร้าว กากปาล์ม กระดุกป่น และปลาป่น (Changsupun,
2005) ซึ่งสัตว์ที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนจะทำให้มีการเจ็บป่วย
และส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจตามมา จาก
สถานการณ์การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราดังที่กล่าวมาข้าง
ต้นทำให้ปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญในการควบคุมและ
ป้องกันการปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และอาหารสัตว์
สำเร็จรูปเป็นอย่างมาก การใช้สารดูดซับสารพิษจากเชื้อราเป็น
อีกทางเลือกหนึ่งที่มีความนิยมเป็นอย่างมาก จึงทำให้บริษัท
เอกชนต่างๆ ได้ผลิตสารดูดซับเชิงพาณิชย์ออกมาจำหน่ายอย่าง
ต่อเนื่อง ขณะเดียวกันนักวิจัยยังได้ศึกษาการใช้สารดูดซับสารพิษ
จากแหล่งธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นดินเหนียวชนิดแคลเซียมมอน-
ต์มอริลโลไนท์ (Ca-Montmorillonite) โซเดียมมอนต์มอริลโลไนท์
(Na-Montmorillonite) แรซีโอไลท์ (Zeolite) และเบนทอนไนต์
(Bentonite) เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเบนทอนไนต์
สามารถดูดซับสารพิษจากเชื้อราได้ดีกว่าสารดูดซับชนิดอื่น ๆ
เนื่องจากสามารถยึดเกาะกับสารพิษได้ทั้งในส่วนของแผ่นด้าน
ใน และบริเวณผิวด้านนอกของโมเลกุลสารดูดซับ จากรายงาน
การวิจัยในสัตว์ปีกพบว่าเบนทอนไนต์สามารถดูดซับอะฟลาทอก-
ซินได้ดีจึงทำให้การดูดซับสารพิษเข้าสู่ร่างกายที่บริเวณลำไส้เล็ก
ลดลง (Rosa et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้
เบนทอนไนต์ในการลดพิษจากอะฟลาทอกซินในอาหารปลานิลซึ่ง
พบว่าเบนทอนไนต์สามารถลดการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินใน
ปลานิลได้อย่างมีนัยสำคัญ (Tengjaroenkul et al., 2006)

เบนทอนไนต์เป็นแร่ทุติยภูมิที่ประกอบด้วยผลึกของแร่
ดินที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพของหินอัคนีเนื้อแก้วจากพวกหิน
ทัฟฟ์ หรือเถ้าภูเขาไฟ และประกอบด้วยแร่มอนต์มอริลโลไนท์เป็น
ส่วนใหญ่ มีคุณสมบัติพองตัวได้สูง ในประเทศไทยพบแร่
เบนทอนไนต์ที่จังหวัดกาญจนบุรี ลำปาง เชียงใหม่ ตาก เพชรบูรณ์
และขอนแก่น โดยแหล่งใหญ่ที่สุดพบที่อำเภอชัยบาดาล จังหวัด
ลพบุรี แร่มอนต์มอริลโลไนท์มีลักษณะเป็นแผ่นหรือเกล็ด ขนาด
เล็กซ้อนกัน 3 ชั้น มีแผ่นกลางเป็นแผ่นของกลุ่มโมเลกุลอลูมิเนียมไฮ-
ดรอกซิลโมเลกุลแปดระนาบ (Octahedral aluminum hydroxyl)
อยู่ตรงกลางระหว่างแผ่นของกลุ่มโมเลกุลซิลิคอนออกไซด์
โมเลกุลพารามิตสี่ระนาบ (Silicon oxide tetrahedral) โดยที่
อะตอมของอลูมิเนียมบางส่วนจะถูกแทนที่ด้วยอะตอมของ
แมกนีเซียม หรืออะตอมของธาตุเหล็กซึ่งจะช่วยสร้างประจุลบบน
ระนาบด้านฐานของโมเลกุลซิลิกา และจะมีการสร้างสมดุลโดย
การแลกเปลี่ยนประจุบวกกับแผ่นที่อยู่ติดกันในแร่มอนต์มอริลโล-
ไนท์ตามธรรมชาติ โดยสัดส่วนของจำนวนธาตุองค์ประกอบจะ
แตกต่างกันไปตามแหล่งที่พบจึงทำให้เบนทอนไนต์มีลักษณะทาง
กายภาพและทางเคมีที่ไม่ซ้ำกัน (Suklert, 2015) ดังนั้นการที่จะ
นำเบนทอนไนต์มาใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์จึงควรมีการศึกษา
คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี หรือองค์ประกอบต่างๆ เพื่อประเมิน
ประสิทธิภาพที่เหมาะสม และเพื่อป้องกันสิ่งปนเปื้อนที่อาจส่งผล
ให้เกิดอันตรายต่อสัตว์ นอกจากนี้การทดสอบความเป็นพิษ
เบื้องต้นก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถพิสูจน์ความปลอดภัยของ
เบนทอนไนต์ได้

การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะ
โครงสร้างทางกายภาพและทางเคมีของเบนทอนไนต์ของไทย และ
ศึกษาความเป็นพิษเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยง
สัตว์อย่างปลอดภัยในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมเบนทอนไนต์

เบนทอนไนต์ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับมาจากแหล่งที่
ถูกค้นพบในจังหวัดลพบุรี โดยทำการบดเบนทอนไนต์ให้ละเอียด
แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก จากนั้นนำไปผึ่ง
ลมให้แห้ง และบดให้ละเอียดอีกครั้ง ทำการร่อนเบนทอนไนต์ด้วย
เครื่องวิเคราะห์ขนาดเม็ดดิน (Sieve analysis) เบอร์ 40 (ขนาด
420 ไมครอน) จากนั้นนำเบนทอนไนต์ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Akpomie and Dawodu,
2015)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของโครงสร้างเบนทอนไนต์

ทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออน (Cation exchange capacity: CEC) ของเบนทอนไนต์ด้วยวิธีการของคู่มือการวิเคราะห์ตรวจจสอบดินทางเคมี (Land Development Department, 2010) การวิเคราะห์พื้นที่ผิวจำเพาะ (Specific surface area) ด้วยวิธี Methylene blue ใช้วิธีของ Suttanan and Piyamongkala (2011) การศึกษาดัชนีการพองตัวของเบนทอนไนต์ (Swelling index) ดัดแปลงจากวิธีการศึกษาของ Yukselen and Kaya (2008) ทำการศึกษาโครงสร้างผลึกของเบนทอนไนต์โดยใช้เครื่อง XRD (D8 Advance, X-ray Diffractometer, Bruker, USA) ที่ค่า 2 Theta ระหว่าง 2°-60° ศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลโดยใช้เครื่อง FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer; Bruker, TENSOR 27, USA) ในช่วงเลขคลื่นระหว่าง 4000-600 cm⁻¹ และวิเคราะห์โครงสร้างภายนอก และองค์ประกอบธาตุด้วยเครื่อง Focus ion beam (FIB)-field emission scanning electron microscopy (FESEM) (Helios NanoLab-G3 CX, FEI, USA)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (In vitro)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของเบนทอนไนต์ได้รับการทดสอบโดยใช้เซลล์ไตลิง (Vero cell line) ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวไตของลิงเขียวแอฟริกา (African green monkey: *Cercopithecus aethiops*) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) Fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ และยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์ ใน Culture flask และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้ปริมาณเซลล์เพียงพอแล้วทำการย้ายเซลล์มาเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเบนทอนไนต์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 0-100 mg/L แล้วบ่มถาดหลุมในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีเซลล์ที่ถูกเลี้ยงเฉพาะในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม ในแต่ละหน่วยทำการทดลอง 4 ซ้ำ เมื่อครบเวลาบ่มแล้วนำถาดหลุมไปถ่ายภาพลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ จากนั้นนำถาดหลุมไปทดสอบหาเซลล์เป็นด้วยวิธีเตตราไซเลียม ดาย (MTT assay) โดยมีวิธีการดังนี้ (1) เติมน้ำยา MTT ที่ละลายใน PBS ในความเข้มข้น 5 mg/L ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ลงในแต่ละหลุม และนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (2) ดูดสารละลายทิ้งและเติม DMSO 200 ไมโครลิตรต่อหลุม (3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต และความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (Half-maximal inhibitory concentration หรือ IC₅₀)

การคำนวณและการวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต (ค่าเฉลี่ย±SD) แต่ละกลุ่มทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance: ANOVA) และทดสอบภายหลังด้วย Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05) ส่วนการหาค่า IC₅₀ คำนวณด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบโพรบิต (Probit analysis) โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 23 สำหรับการคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต} = (\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มทดลอง} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม}) \times 100$$

ผลการศึกษา

องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของโครงสร้างเบนทอนไนต์

จากการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของเบนทอนไนต์พบว่าค่าความเป็นกรด-เบส ความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออน พื้นที่ผิวจำเพาะ และดัชนีการพองตัวดังแสดงใน Table 1

Table 1. The properties of Thai bentonite

Properties	Value±SD
1. pH	10.33 ±0.50
2. Cation exchange capacity (meq/100g)	89.67 ±9.07
3. Specific surface area (m ² /g)	735.00 ±18.03
4. Swelling index (mg/2g)	4.30 ±0.85

จากการศึกษาผลึกของเบนทอไนต์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD) ใน Figure 1 พบว่าเบนทอไนต์มีแรมมอนต์โมริลโลไนท์เป็นองค์ประกอบหลักที่ตำแหน่ง 5.99 2θ โดยมีระยะห่างระหว่างระนาบเท่ากับ 14.75 Å นอกจากนี้เบนทอไนต์ยังประกอบด้วยแร่ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ เวอร์มิคูไลท์ (Vermiculite) ที่ตำแหน่ง 20.99 2θ และควอตซ์ (Quartz) ที่ตำแหน่ง 26.74 2θ

ในการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของเบนทอไนต์ด้วยเทคนิค FTIR (Figure 2) พบว่าเบนทอไนต์ประกอบไปด้วยหมู่ฟังก์ชันหลักดังนี้ Si-O bonds stretching ที่ตำแหน่ง 619, 792, 999 และ 1425 cm⁻¹, Si-O-Si ที่ตำแหน่ง 711 cm⁻¹, Al-Al-OH ที่ตำแหน่ง 917 cm⁻¹ และ O-H asymmetric stretching ที่ตำแหน่ง 3621 cm⁻¹ นอกจากนี้ที่ตำแหน่ง 1633 และ 3100-3500 cm⁻¹ แสดงพีคของโมเลกุลน้ำภายในโครงสร้างของเบนทอไนต์

จากภาพถ่ายด้วยเทคนิค FESEM (Figure 3) พบว่าเบนทอไนต์มีลักษณะภายนอกขรุขระ เป็นเกล็ด และผลึกซ้อนทับกัน และจากการวัดองค์ประกอบของธาตุพบว่าเบนทอไนต์ประกอบไปด้วยธาตุ O, Si, C, Al และ Ca ที่เป็นองค์ประกอบหลักเนื่องจากสูตรทางเคมีของเบนทอไนต์คือ $(Ca_{0.14} Na_{0.02})_{\Sigma} = 0.16 (Al_{1.66} Mg_{0.36} Fe_{0.04})_{\Sigma} = 2.08 (Si_{3.90} Al_{0.10})_{\Sigma} = 4.00 O_{10} (OH)_2 \cdot 1.02H_2O$ (Uddin, 2017)

ความเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของเบนทอไนต์ต่อเซลล์ไตลิงในความเข้มข้น 0-100 mg/L เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง (Figure 4) พบว่าความเข้มข้นของเบนทอไนต์และระยะเวลาที่ทดสอบมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่ออัตราการตายของเซลล์เนื่องจากเซลล์กลุ่มควบคุมมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.464, 0.757 และ 0.954 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบด้วยเบนทอไนต์เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่าค่าดูดกลืนแสงลดลงตามระยะเวลาและความเข้มข้นที่ทดสอบ จากการศึกษาที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 25 mg/L พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตมีปริมาณใกล้เคียงกันเมื่อได้รับการทดสอบเป็นระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง แต่เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 25 mg/L พบเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตที่ 48-72 ชั่วโมง น้อยกว่าที่ทดสอบ 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และเมื่อทดสอบเซลล์ด้วยเบนทอไนต์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 mg/L พบเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 24-72 ชั่วโมง (p<0.05) เมื่อพิจารณาถึงค่าความเข้มข้นของเบนทอไนต์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ได้ร้อยละ 50 พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เบนทอไนต์มีค่า IC₅₀ อยู่ที่ 66 mg/L และเมื่อทำการทดสอบเบนทอไนต์ที่เวลา 48-72 ชั่วโมง พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นเนื่องจากมีค่า IC₅₀ ลดลงอยู่ที่ 20 และ 15 mg/L ตามลำดับ

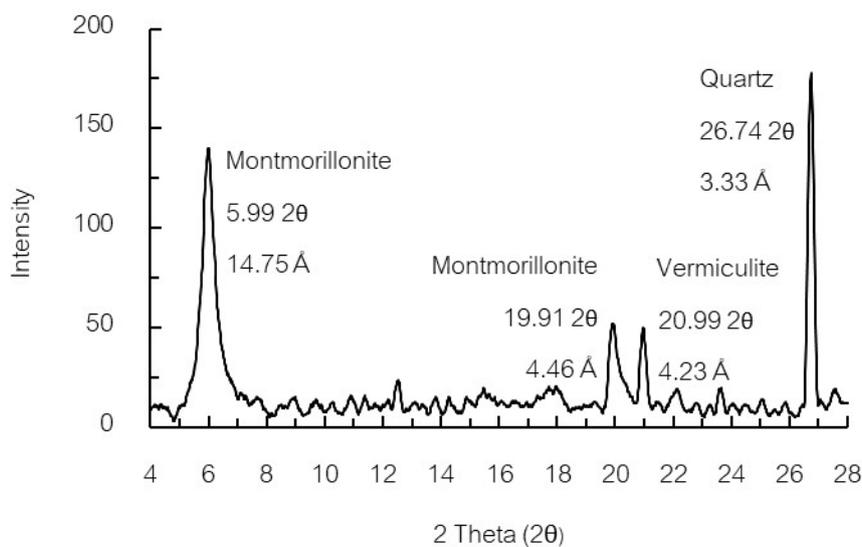


Figure 1. XRD diffractogram of Thai bentonite

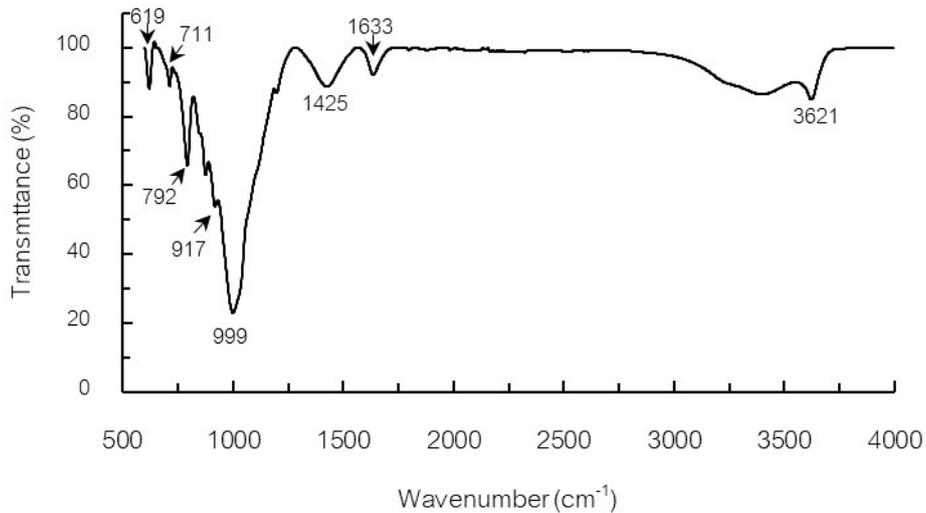


Figure 2. FTIR spectra of Thai bentonite

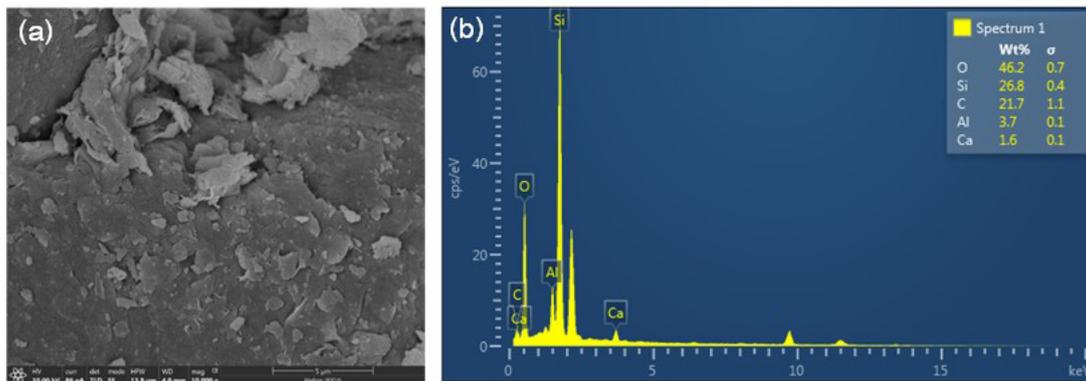


Figure 3. Surface morphology (10,000X) (a) and elemental composition (b) of Thai bentonite

จากภาพถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับของเซลล์ไตลิงที่ได้รับการทดสอบด้วยเบนทอไนต์ที่มีความเข้มข้น 50 mg/L ในระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง (Figure 5) พบว่าในกลุ่มควบคุมเซลล์มีการเจริญเติบโตปกติโดยมีการยึดเกาะและกระจายตัวอย่างเป็นระเบียบ โดยในระยะเวลาการทดสอบที่ 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีขนาดที่เล็กลงเนื่องจากเซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นจึงทำให้มีการอัดแน่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับการทดสอบความเป็นพิษด้วยเบนทอไนต์มีขนาดเซลล์ที่ใกล้เคียงกันในช่วงการทดสอบที่ระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง เนื่องจากมีเซลล์ตายหลังได้รับการทดสอบทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ลดลง จึงทำให้พบช่องว่างระหว่างเซลล์และเศษเซลล์ตายลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยจะเห็นได้ชัดเจนที่สุดในกลุ่มที่ได้รับการทดสอบเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

วิจารณ์

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของโครงสร้างพบว่าเบนทอไนต์ของไทยมีคุณสมบัติพื้นฐานที่ใกล้เคียงกับการศึกษาเบนทอไนต์จากแหล่งอื่นในต่างประเทศ โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเบนทอไนต์มีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ที่ pH 7-10 เช่นเดียวกันกับค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนของเบนทอไนต์ที่มีแรมอนต์โมริลโลไนท์เป็นองค์ประกอบหลักจะมีค่าอยู่ที่ 70-120 meq/100g (Kaufhold et al., 2008) ซึ่งเบนทอไนต์ที่มีค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนสูงจะยังมีความสามารถในการดูดซับสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้ Yukselen and Kaya (2008) รายงานว่าเบนทอไนต์มีพื้นที่ผิวจำเพาะตั้งแต่ 300-900 m²/g และมีดัชนีการบวมอยู่ระหว่าง 3-6 mg/2g โดยค่าพื้นที่ผิวจำเพาะและดัชนีการบวมตัวสามารถบอก

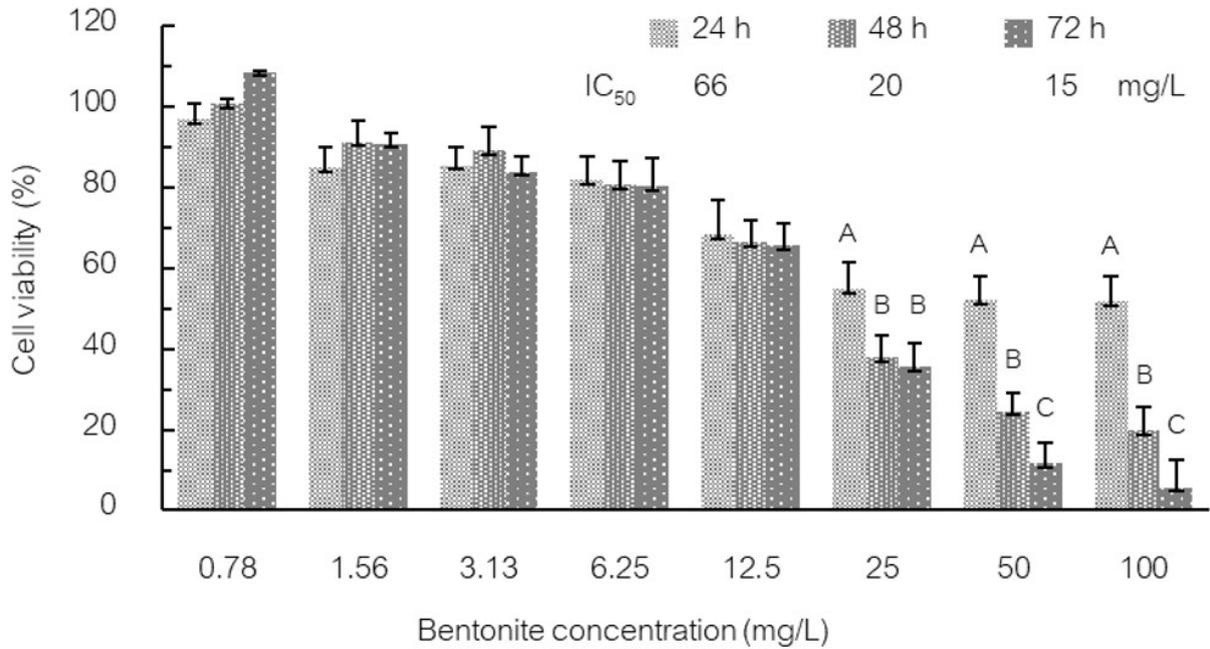


Figure 4. Percentage of cell viability after exposure with Thai bentonite. Mean±SD with different letters is significantly different between exposure time at the same concentration ($p < 0.05$).

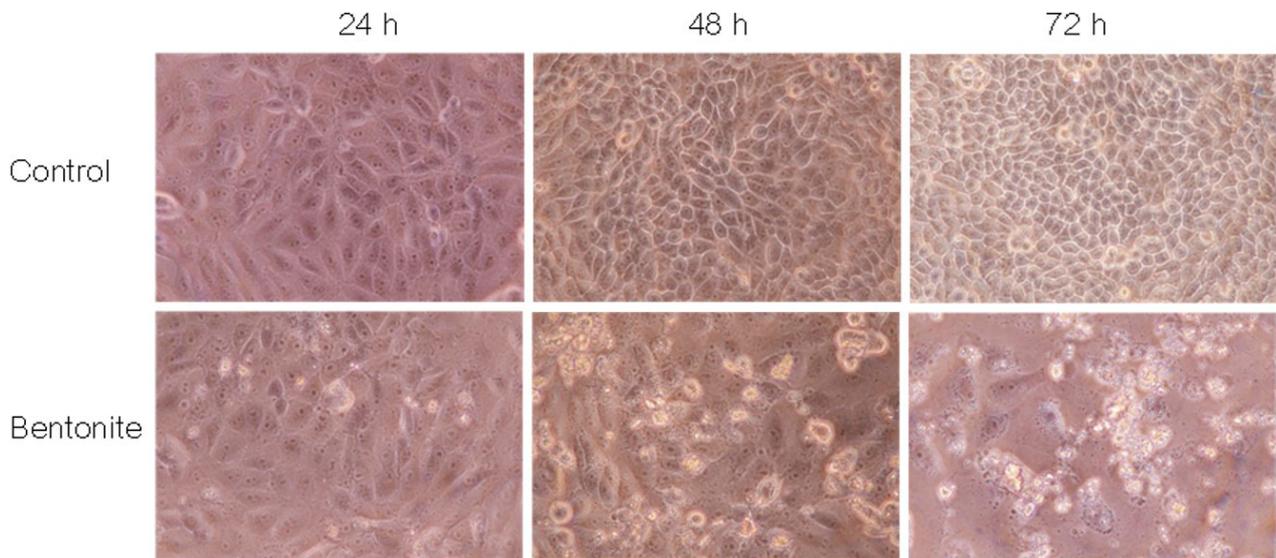


Figure 5. Cell morphology after exposure with Thai bentonite at 50 mg/L (40X)

ถึงประสิทธิภาพในการดูดซับของเบนทอไนต์ในพื้นที่นั้น ๆ ได้เช่นเดียวกัน ถ้าหากเบนทอไนต์มีค่าพื้นที่ผิวจำเพาะสูงก็แสดงว่ามีพื้นที่ผิวที่สามารถเกาะจับกับโมเลกุลได้สูง และหากเบนทอไนต์มีค่าดัชนีการpongตัวสูงแสดงว่าสามารถอุ้มของเหลวเก็บไว้ได้มาก

ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการดูดซับส่งผลให้ชั้นโครงสร้างภายในเกิดการขยายตัว (Sompech, 2008) สำหรับการศึกษาผลของเบนทอไนต์พบว่ามีแรมอนต์โมริลโลไนท์เป็นองค์ประกอบหลักจากการรายงานที่ผ่านมาพบว่าเบนทอไนต์มีพีคหลักของแรมอน-

ติโมริลโลไนท์อยู่ที่ตำแหน่ง 6-7 2θ และมีค่าระยะห่างระหว่างระนาบ 12-15 Å (Andrunik and Bajda, 2019; Bertagnolli and Silva, 2012; Pandey and De, 2018) ถึงแม้ว่าเบนทอนไนต์จะมีแร่มอนติโมริลโลไนท์เป็นองค์ประกอบหลักแต่การศึกษาที่ผ่านมาได้รายงานว่าเบนทอนไนต์มีแร่ชนิดอื่นผสมอยู่ด้วย เช่น คริสโตบาไลต์ (Cristobalite) แคลไซต์ (Calcite) เฟลด์สปาร์ (Feldspar) ซิลิกา (Silica) ยิปซัม (Gypsum) และควอตซ์ เป็นต้น ซึ่งชนิดและอัตราส่วนในการปนเปื้อนของแร่ชนิดดังกล่าวขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่ถูกค้นพบ (Suklert, 2015; Thai Environmental Engineers Association, 2016) โดยทั่วไปแล้วหมู่ฟังก์ชันของเบนทอนไนต์จะประกอบไปด้วย Si-O, Si-O-Si, Al-Al-OH, O-H และโมเลกุลของน้ำ (Andrunik and Bajda, 2019; Bertagnolli and Silva, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ส่วนการวัดองค์ประกอบของธาตุพบว่าเบนทอนไนต์ประกอบไปด้วยธาตุหลักที่สอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชัน ได้แก่ O, Si, C, Al และ Ca โดยปริมาณของธาตุที่วัดได้จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่ถูกค้นพบ นอกจากนี้ยังพบว่าเบนทอนไนต์ของไทยในการศึกษานี้ไม่พบการปนเปื้อนของธาตุโลหะหนัก หรือธาตุที่เป็นอันตรายชนิดอื่น ๆ

ในทางการแพทย์เบนทอนไนต์มักถูกนำมาใช้เป็นตัวนำส่งยาเนื่องจากประสิทธิภาพในการดูดซับยาและความปลอดภัย (Park et al., 2016) สำหรับการใส่เบนทอนไนต์ในปศุสัตว์มักใช้เป็นสารที่ป้องกันอันตรายต่อระบบทางเดินอาหารจากสารพิษโดยใช้เป็นสารดูดซับ (Enterosorbents) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา เช่น อะฟลาทอกซิน (Trckova et al., 2004) นอกจากนี้เบนทอนไนต์สามารถนำมาใช้ผสมอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มแร่ธาตุเสริม (Thai Environmental Engineers Association, 2016) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาความปลอดภัยของเบนทอนไนต์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งที่ถูกค้นพบขึ้นมาใหม่ หรือยังไม่เคยมีการนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิต การศึกษาความเป็นพิษของเบนทอนไนต์ต่อเซลล์ได้พบว่ามีผลต่อการศึกษาศาสตร์ของ Nones et al. (2015) และ Nones et al. (2017) ที่ได้รายงานว่าเบนทอนไนต์มีความเป็นพิษต่ำจากการทดสอบต่อเซลล์ fibroblasts, epithelial colorectal adenocarcinoma และ neural crest stem cell แต่อย่างไรก็ตามเบนทอนไนต์ในปริมาณสูงสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้หลายรูปแบบ เช่น การปกคลุมเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ (Baek et al., 2012) นอกจากนี้คุณสมบัติในการดูดซับของเบนทอนไนต์ทำให้เกิดการสลายของไลโปโซม (Liposome) จากการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเซลล์และเบนทอนไนต์ (Zhang et al., 2010) ขณะเดียวกันเบนทอนไนต์ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (Free radicals) หรือ

Reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจะสัมพันธ์กับการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยระดับของสารอนุมูลอิสระสามารถเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเบนทอนไนต์ (Lordan et al., 2011; Osman et al., 2017; Zhang et al., 2010)

สรุป

จากการศึกษาเบนทอนไนต์ของไทยพบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับเบนทอนไนต์ทั่วไป นอกจากนี้เบนทอนไนต์ไทยยังแสดงค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนพื้นที่ผิวจำเพาะ และดัชนีการพองตัวสูง ขณะเดียวกันการศึกษาคู่ประกอบธาตุยังพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของธาตุกลุ่มโลหะหนักที่เป็นอันตรายต่อสัตว์ ผลการศึกษาคือความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ของเบนทอนไนต์พบว่ามีค่าความเป็นพิษต่ำจึงทำให้สามารถนำไปปรับใช้ในสิ่งมีชีวิตได้ แต่อย่างไรก็ตามการที่จะนำเบนทอนไนต์ไปใช้กับสิ่งมีชีวิตควรผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ก่อน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยสำหรับคณาจารย์บัณฑิตศึกษาเพื่อให้สามารถรับนักศึกษาที่มีความสามารถและศักยภาพสูงเข้าศึกษาในหลักสูตรและทำวิจัยในสาขาที่อาจารย์มีความเชี่ยวชาญประจำปีการศึกษา 2561

เอกสารอ้างอิง

- Akpmie KG, Dawodu FA, 2015. Potential of a low-cost bentonite for heavy metal abstraction from binary component system. *BJBAS* 4, 1-13.
- Andrunik M, Bajda T, 2019. Modification of bentonite with cationic and nonionic surfactants: Structural and textural features. *Materials (Basel)* 12.
- Baek M, Lee JA, Choi SJ, 2012. Toxicological effects of a cationic clay, montmorillonite *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Toxicol* 8, 95-101.
- Bertagnolli C, Silva MGCd, 2012. Characterization of brazilian bentonite organoclays as sorbents of petroleum-derived fuels. *Materials Research* 15, 253-259.
- Changsupun A, 2005. Aflatoxin in agricultural product. Biological science project, Department of science service, Ministry of science and technology, Thailand.
- Gonçalves R, Kovalsky P, 2015. Mycotoxins and their economic impact on aquaculture. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <http://www.biomin.net>
- Kaufhold S, Dohrmann R, Koch D, Houben G, 2008. The pH of

- aqueous bentonite suspensions. *Clays Clay Miner* 56, 338-343.
- Land Development Department, 2010. Soil analysis manual. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <https://www.ldd.go.th>
- Latifi N, Vahedifard F, Ghazanfari EA, Rashid AS, 2018. Sustainable usage of calcium carbide residue for stabilization of clays. *J Mater Civ Eng* 30, 04018099.
- Lordan S, Kennedy JE, Higginbotham CL, 2011. Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line. *J Appl Toxicol* 31, 27-35.
- Nones J, Nones J, Riella HG, Kuhnlen NC, Trentin A, 2015. Bentonite protects neural crest stem cells from death caused by aflatoxin B₁. *Appl Clay Sci* 104, 119-127.
- Nones J, Solhaug A, Eriksen GS, Macuvele DLP, Poli A, Soares C, Trentin AG, Riella HG, Nones J, 2017. Bentonite modified with zinc enhances aflatoxin B₁ adsorption and increase survival of fibroblasts (3T3) and epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2). *J Hazard Mater* 337, 80-89.
- Osman AF, M Fitri TF, Rakibuddin M, Hashim F, Tuan Johari SAT, Ananthakrishnan R, Ramli R, 2017. Pre-dispersed organo-montmorillonite (organo-MMT) nanofiller: Morphology, cytocompatibility and impact on flexibility, toughness and biostability of biomedical ethyl vinyl acetate (EVA) copolymer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 74, 194-206.
- Pandey P, De N, 2018. Surfactant-induced changes in physico-chemical characters of bentonite clay. *IJPAC* 15(4), 1-11.
- Park J-H, Shin H-J, Kim MH, Kim J-S, Kang N, Lee J-Y, Kim K-T, Lee JI, Kim D-D, 2016. Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems. *Int J Pharm Investig* 46, 363-375.
- Poapolathep A, 2019. Mycotoxin: Danger in food. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <https://thaimycotoxin.org>
- Rosa CA, Miazzo R, Magnoli C, Salvano M, Chiacchiera SM, Ferrero S, Saenz M, Carvalho EC, Dalcero A, 2001. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poult Sci* 80, 139-144.
- Sompech S, 2008. Preparation of polymer-nanoclay composite for use as sealing material in proton exchange membrane fuelcell [Master Thesis of Science in Materials Science]. Chiang Mai, Faculty of Science, Chiang Mai University.
- Suklert S, 2015. How sodium bentonite effects to plant. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <http://www.onep.go.th>
- Suttanan R, Piyamongkala K, 2011. Kinetic and thermodynamic adsorption of methylene blue by modified rice husk. *King Mongkut Univ Tehnol North Bangk Inter J Appl Sci Technol* 21(2), 339-340.
- Tengjaroenkul B, Tengjaroenkul U, Pimpukdee K, 2006. Adsorption study for the detoxification of aflatoxin B₁ by using the different clays minerals in Thailand. *Mycotoxins* 57(Supplement), 240-244.
- Thai Environmental Engineers Association, 2016. Bentonite for engineering and environment. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <https://www.eeat.or.th>
- Trckova M, Matlova L, Dvorska L, Pavlik I, 2004. Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks. *Vet Med (Praha)* 49(10), 389-399.
- Uddin MK, 2017. A review on the adsorption of heavy metals by clay minerals, with special focus on the past decade. *Chem Eng J* 308, 438-462.
- Yukselen Y, Kaya A, 2008. Suitability of the methylene blue test for surface area, cation exchange capacity and swell potential determination of clayey soils. *Eng Geol* 102, 38-45.
- Zhang M, Lu Y, Li X, Chen Q, Lu L, Xing M, Zou H, He J, 2010. Studying the cytotoxicity and oxidative stress induced by two kinds of bentonite particles on human B lymphoblast cells *in vitro*. *Chem Biol Interact* 183, 390-6.