

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนาโน

Preparation of Hydrogel Film with Silver Nano-Particles

โดย

สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

นางสาวกนกวรรณ แสงเกียรติคุณ	หัวหน้าโครงการ
นางสาวปราณี รัตนวลิตโรจน์	ผู้ร่วมวิจัย
นายธนิต สิงหนุญพงศ์	ผู้ร่วมวิจัย

มิถุนายน 2555

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาฯ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยและให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ ตลอดระยะเวลาการดำเนินโครงการ ขอขอบคุณ คุณสุทธิรัตน์ ลิขพันธ์ ที่เป็นกำลังสำคัญที่ทำให้การดำเนินโครงการสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาฯ และศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือ และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณ คณะผู้ประเมินผลงานวิจัยของสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัย ขอขอบคุณบุคลากรของสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และเนื่องจากโครงการวิจัย “การเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนาโน” ได้รับสนับสนุนทุนวิจัยทั้งหมดจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2554 คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2555

## บทคัดย่อ

การเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทำได้โดย เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส พอลิเอธิลีนไกลคอล พอลิไวนิลไพโรลิโดน ซิลเวอร์ไนเตรท และใช้กรดซัลฟิวริกเป็นสารเชื่อมโยงพันธะ จากนั้นจึงทำการขึ้นรูปด้วยวิธีหล่อแบบ ทำให้แห้งและอบผนึก จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี การทดสอบการดูดซับน้ำ การละลายน้ำ และสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล พบว่า นอกจากการเกิดพันธะเชื่อมโยงระหว่างคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสกับกรดซัลฟิวริกแล้ว ยังมีอันตรกิริยาเกิดขึ้นระหว่างพอลิไวนิลไพโรลิโดนกับกรดซัลฟิวริกด้วย ส่วนการเพิ่มปริมาณพอลิเอธิลีนไกลคอลนั้นมีผลทำให้แผ่นฟิล์มมีการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้น การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของซิลเวอร์ไอออนไปเป็นอนุภาคเงินในสารละลายที่ใช้เตรียมไฮโดรเจลสามารถยืนยันได้จากเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี จากผลการทดลองพบว่า การมีอนุภาคเงินเป็นองค์ประกอบในแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลมีผลทำให้ค่าการดูดซับน้ำและค่าความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มลดลง อย่างไรก็ตามจากการทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินเป็นองค์ประกอบที่ระดับความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ส่วนในล้านส่วน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Escherichia coli* และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดี ในขณะที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตต่ำกว่าแผ่นปิดแผลเกรดการค้าที่มีโลหะเงินเป็นองค์ประกอบ

## Abstract

Antimicrobial hydrogel films are successfully prepared by casting the mixed solutions of carboxymethylcellulose, polyethyleneglycol, polyvinylpyrrolidone and silver nitrate using citric acid as a crosslinking agent. Then this solution is dried and cured to generate the polymer films. The analytical results from infrared spectroscopy (IR), water absorption, solubility and mechanical property reveal that not only the cross-links between carboxymethylcellulose and citric acid are created in the films but there are also interactions between polyvinylpyrrolidone and citric acid. Additionally, increasing of polyethylene glycol content can improve the water absorption ability of the hydrogel films. The formation silver particles ( $\text{Ag}^0$ ) in the gels caused by the reduction of silver ions ( $\text{Ag}^+$ ) can be readily verified by UV-Vis spectroscopy. It can be noticed that the presence of silver particles significantly decreases the water absorption ability and the film strength. Nonetheless, the films containing 5,000 ppm and 10,000 ppm of silver particles exhibit high antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Interestingly, the cell toxicity of these films is lower than the commercially available silver wound dressing.

## สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อ.....	ii
Abstract.....	iii
สารบัญเรื่อง.....	iv
สารบัญตาราง.....	v
สารบัญรูป.....	vi
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
- สารเคมี.....	5
- วิธีการทดลอง.....	5
- การวิเคราะห์ทดสอบ.....	7
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....	13
- การศึกษาทดลองเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล.....	13
- การศึกษาทดลองเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มี Ag เป็นองค์ประกอบ.....	23
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....	39
บรรณานุกรม.....	40
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	42
ภาคผนวก.....	49

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1	สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ <i>Staphylococcus aureus</i> ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินเป็นองค์ประกอบที่เตรียมได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลเกรดการค้ำโดยใช้วิธีการทดสอบตามมาตรฐาน AATCC 147.....	25
ตารางที่ 3.2	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> และ <i>P.aeruginosa</i> ตามมาตรฐาน AATCC 147 ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลเกรดการค้ำและแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินระดับความเข้มข้น 1000, 5000 และ 10000 ppm .....	27
ตารางที่ 3.3	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> และ <i>P.aeruginosa</i> ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลเกรดการค้ำและแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm โดยใช้มาตรฐาน AATCC 100.....	30
ตารางที่ 3.4	แสดงค่าร้อยละของเซลล์ human skin fibroblast ATCC CRL 2522 passage 8 ที่มีชีวิต (% viability) ภายหลังจากเลี้ยงกับสารสกัดจากตัวอย่าง (Extraction vehicle) และสารสกัดจากตัวอย่างที่ถูกเจือจาง 2 เท่า (2-fold dilution of extraction vehicle) นาน 24 ชั่วโมง.....	37

## สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1	ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างโมเลกุล CMC และกรดซิทริก.....	3
รูปที่ 2.1	ขั้นตอนการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล.....	7
รูปที่ 2.2	เครื่อง universal testing machine .....	9
รูปที่ 3.1	ค่าการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิทริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที.....	14
รูปที่ 3.2	ค่าการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิทริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ.....	16
รูปที่ 3.3	ค่าการละลายของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิทริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ.....	17
รูปที่ 3.4	ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงขณะแห้งและขณะเปียกของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิทริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที.....	18
รูปที่ 3.5	ค่าเปอร์เซ็นต์การยึดตัว ณ จุดขาด ขณะแห้งและขณะเปียกของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิทริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที.....	19
รูปที่ 3.6	IR spectrum ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่เตรียมจาก CMC และที่เตรียมจากการใช้ CMC ผสมร่วมกับ PEG และ PVP ปริมาณ 2% และ 1% โดยน้ำหนักของ CMC ตามลำดับ โดยใช้กรดซิทริกความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักของ CMC เป็น crosslinking agent และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที เปรียบเทียบกับ spectrum ของผง CMC, PEG และ PVP ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง.....	21

## สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.7 โครงสร้างทางเคมีของ polyvinylpyrrolidone .....	22
รูปที่ 3.8 IR spectrum ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่เตรียมจากการใช้ CMC ผสมร่วมกับ PEG และ PVP ปริมาณ 2% และ 1% โดยน้ำหนักของ CMC ตามลำดับ โดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักของ CMC เป็น crosslinking agent และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 และ 150 วินาที .....	23
รูปที่ 3.9 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>S.aureus</i> ตามมาตรฐาน AATCC 147 ที่เวลา 24 ชั่วโมง .....	28
รูปที่ 3.10 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>E.coli</i> ตามมาตรฐาน AATCC 147 ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	28
รูปที่ 3.11 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>P.aeruginosa</i> ตามมาตรฐาน AATCC 147 ที่เวลา 24 ชั่วโมง .....	29
รูปที่ 3.12 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ตามมาตรฐาน AATCC 100 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของแผ่นปิดแผลเกรดการค้าและแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm .....	31
รูปที่ 3.13 ค่าการดูดซับน้ำและค่าการละลายของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 1000, 2000, 5000 และ 10000 ppm เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ไม่มีอนุภาคเงิน .....	32
รูปที่ 3.14 ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงขณะแห้งและขณะเปียกของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ไม่มีอนุภาคเงิน.....	33
รูปที่ 3.15 ค่าเปอร์เซ็นต์การยึดตัว ณ จุดขาด ขณะแห้งและขณะเปียกของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ไม่มีอนุภาคเงิน.....	34



## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.16 IR spectrum ของแผ่นฟิล์ม ไฮโดรเจล CMC ที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์ม ไฮโดรเจล CMC ที่ไม่มีอนุภาคเงิน.....	35
รูปที่ 3.17 แถบการดูดกลืนแสง UV-visible ของสารละลาย CMC-PEG-PVP ที่ผสม $\text{AgNO}_3$ ด้วยระดับความเข้มข้น Ag เท่ากับ 5000 ppm ก่อนการนำไปขึ้นรูป (A) และสารละลายของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มี Ag ปริมาณความเข้มข้น 5000 ppm ซึ่งผ่านการขึ้นรูปแล้ว (B).....	36
รูปที่ 3.18 รูปร่างลักษณะของเซลล์ Human skin fibroblast ที่ใช้ทดสอบ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงกับสารสกัดจากตัวอย่าง (อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM) ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	38

## บทที่ 1

### บทนำ

วัสดุปิดแผลในปัจจุบันได้รับการพัฒนาให้มีสมบัติที่เหมาะสมต่อการใช้งานมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบไฮโดรเจล ซึ่งเป็นวัสดุพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโครงข่ายร่างแห (network) มีลักษณะยืดหยุ่นคล้ายเนื้อเยื่อธรรมชาติ และมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดี เมื่อนำมาใช้เป็นวัสดุปิดบาดแผล (wound dressing) จึงสามารถช่วยลดความเจ็บปวดของผู้ป่วย และลดการทำลายเซลล์เนื้อเยื่อที่กำลังสร้างขึ้นใหม่ขณะที่ลอกแผ่นดังกล่าวออกจากบาดแผล

นอกเหนือจากพอลิเมอร์ประเภทสังเคราะห์ เช่น พอลิเมทาคริเลท (polymethacrylate) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ฯลฯ แล้ว คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose, CMC) ยังจัดว่าเป็นพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งที่มีสมบัติเหมาะสมในการใช้ผลิตเป็นแผ่นไฮโดรเจลสำหรับใช้ในทางการแพทย์ เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากวัสดุธรรมชาติ สามารถเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradability) และมีราคาถูก เช่น ใช้เป็นแผ่นปิดแผลไฟไหม้ ซึ่งพบว่าสามารถรักษาบาดแผลได้ดี มีความแข็งแรงและมีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับของเหลวจากบาดแผล (Vloemans และคณะ, 2001)

การเตรียมไฮโดรเจลสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การทำปฏิกิริยาเชื่อมโยงพันธะ (crosslink) ด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารเชื่อมโยงพันธะ (crosslinking agent) เช่น ไดไวนิลซัลโฟน (divinylsulphone) (Anbergen และ Oppermann., 1990) หรือการทำปฏิกิริยาเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีการฉายรังสี (Wach และคณะ, 2003, Liu และคณะ, 2005) เป็นต้น

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัสดุปิดแผลที่ทำจากพอลิเมอร์และมีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ เช่น แผ่นไฮโดรไฟเบอร์ (hydrofibre) ที่มีชื่อทางการค้าว่า AQUACEL<sup>®</sup> (Vloemans และคณะ, 2001) ซึ่งผลิตขึ้นจากโซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่มีระดับขั้นของคาร์บอกซีเมทิลเลชัน (degree of carboxymethylation) ต่ำ พบว่า สามารถนำมาใช้กับบาดแผลไฟไหม้ได้ดี และมีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับของเหลวจากบาดแผล

การพัฒนาแผ่นปิดแผลไฮโดรเจลให้มีสมบัติช่วยลดการติดเชื้อของบาดแผลผู้ป่วยที่มีแผลอักเสบ โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก เป็นอีกสมบัติหนึ่งซึ่งกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจกันมากขึ้น การพัฒนาดังกล่าวสามารถทำได้โดยการใช้ส่วนผสมของสารออกฤทธิ์ที่มีสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสารที่ให้ประสิทธิภาพสูงและได้รับความสนใจในการศึกษามากที่สุดชนิดหนึ่งก็คือ อนุภาคเงิน (silver particles) เนื่องจากอนุภาคนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น *S.aureus*, *E.coli*, *V.cholera*, *P. aeruginosa*, *S. typhus* ฯลฯ (Cho และคณะ, 2005, Sondi และ Salopek-Sondi, 2004, Morones และคณะ, 2005) ทั้งนี้ Feng และคณะ (2000) ได้นำเสนอกลไกการ

ยับยั้งเชื้อ *E.coli* และ *S.aureus* ไว้ว่า ซิลเวอร์ไอออนมีผลทำให้ DNA ของเซลล์ดังกล่าวสูญเสียความสามารถในการแบ่งตัว (replicate) ในขณะที่สาร โปรตีนถูกยับยั้งการทำงาน

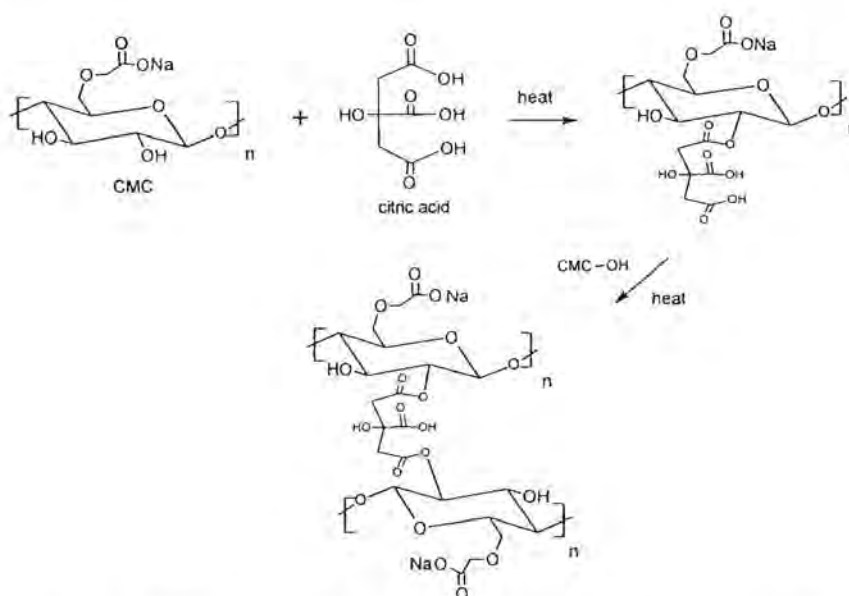
วิธีการเตรียมนูภาคเงินโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเตรียมให้มีขนาดเล็กจนถึงระดับนาโนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางเคมี วิธีทางไฟฟ้าเคมี วิธีใช้รังสี เป็นต้น (Chou และ Ren, 2000, Starowicz และคณะ, 2006, Henglein, 2001) ทั้งนี้การเตรียมด้วยวิธีทางเคมีเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมเนื่องจากสามารถเตรียมนูภาคเงินที่กระจายตัวในสารละลายได้ดี และทำได้ง่าย ซึ่งหลักการของวิธีนี้คือ การทำปฏิกิริยารีดักชันไอออนโลหะที่อยู่ในสารละลาย โดยใช้สารรีดิวซ์ เช่น กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ไฮดราซีน (hydrazine) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) เป็นต้น (Sondi และคณะ, 2003, Zielinska และคณะ, 2009) ทั้งนี้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ซึ่งเป็นสารประเภทพอลิเมอร์เป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เป็นสารรีดิวซ์ อีกทั้งยังเป็นสารที่มีการใช้งานอย่างกว้างขวางในทางการแพทย์และเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังมีการใช้สารพอลิเมอร์บางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวช่วยป้องกันการเกาะรวมตัวกันของอนุภาค เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinylalcohol: PVA) พอลิไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone: PVP) เป็นต้น (Zielinska และคณะ, 2009)

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัสดุปิดแผลที่มีการนำอนุภาคเงินส่วนประกอบซึ่งมีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ แผ่นปิดแผล Acticoat<sup>®</sup> ซึ่งประกอบด้วย Absorbent core ของ rayon-polyester และ Nanocrystalline silver โดยมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ MRSA ได้ตั้งแต่ระยะเวลา 30 นาทีที่สัมผัสเชื้อ (Dunn และคณะ, 2004) วัสดุปิดแผลและวัสดุป้องกันการติดเชื้อในชื่อทางการค้าว่า Silverlon<sup>®</sup> ซึ่งผลิตจากเทคโนโลยีการเคลือบโลหะเงินบนเส้นใยไนลอน (<http://silverlon.com>) และ Askina<sup>®</sup> Calgitrol<sup>®</sup> Ag ซึ่งเป็นวัสดุปิดแผลผลิตจากแคลเซียมอัลจินทและโพลีพอลิยูรีเทนที่มีสมบัติในการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนเพื่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (<http://www.bbraun.com>) เป็นต้น

ด้วยเหตุที่วัสดุปิดแผลชนิดที่มีราคาเงินเป็นองค์ประกอบ สำหรับใช้กับผู้ป่วยแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ตามโรงพยาบาลต่างๆ ในประเทศไทยนั้นล้วนแล้วแต่เป็นผลิตภัณฑ์นำเข้าที่มีราคาสูงมาก ดังนั้นเพื่อนำไปสู่การลดการพึ่งพาเทคโนโลยีดังกล่าวจากต่างประเทศ และเป็นการเสริมสร้างคุณภาพชีวิตให้แก่ผู้ป่วย อีกทั้งยังเป็นการต่อยอดจากผลการดำเนินโครงการวิจัย “การพัฒนาสิ่งทอป้องกันแบคทีเรียด้วยเทคโนโลยีนาโนซิลเวอร์” ของสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาฯ (Saengkiattiyut และคณะ, 2008) ทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาแผ่นปิดแผลที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยการผสมผสานกรรมวิธีการเตรียมนูภาคเงินเข้ากับวัสดุแผ่นปิดแผลที่อยู่ในรูปไฮโดรเจล แทนวัสดุสิ่งทอหรือผ้าก๊อซที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เพื่อให้ได้แผ่นปิดแผลที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับของเหลวจากบาดแผล ในขณะที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอยู่ภายในตัววัสดุเอง ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการติดเชื้อของผู้ป่วย และช่วยลดความเจ็บปวดของผู้ป่วยขณะลอกแผ่นปิดแผลออกจากบาดแผล โดยในการพัฒนาแผ่นปิดแผลดังกล่าวจะเลือกใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสซึ่งเป็นวัสดุจากธรรมชาติสำหรับเป็น

พอลิเมอร์หลักในการเตรียมไฮโดรเจล รวมถึงการเลือกใช้กรดซิตริกเป็นสารเชื่อมโยงพันธะ เนื่องจากเป็นสารที่มีความปลอดภัยต่อการใช้งานและใช้อยู่โดยทั่วไปในอุตสาหกรรมอาหาร

ทั้งนี้จากการศึกษาในโครงการวิจัยปีที่ 1 (กนกวรรณ และคณะ, 2553) คณะผู้วิจัยได้ศึกษาทดลองการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลจาก CMC โดยใช้กรดซิตริกเป็นสารเชื่อมโยงพันธะ ซึ่งพบว่ามีพันธะเอสเทอร์เกิดขึ้นโดยเชื่อมโยงระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ CMC กับหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดซิตริก (รูปที่ 1.1) ส่งผลให้ CMC ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้นั้น เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติกลายเป็นไฮโดรเจลที่มีความสามารถในการดูดซับและกักเก็บน้ำจำนวนมากไว้ภายในโมเลกุล โดยภาวะในการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ให้สมบัติทั้งด้านการดูดซับน้ำ การละลายน้ำ และสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม คือ การเตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักของ CMC และทำการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที ทั้งนี้เมื่อนำไปทำการทดสอบความปลอดภัยในเบื้องต้นพบว่า แผ่นฟิล์มดังกล่าวมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ



รูปที่ 1.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างโมเลกุล CMC และกรดซิตริก

สำหรับการเตรียมอนุภาคเงิน ใช้วิธีการเตรียมด้วยกระบวนการทางเคมี โดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรดเป็นสารตั้งต้น และใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) เป็นสารรีดิวซ์ และใช้พอลิไวนิลไพโรลิโดน (PVP) เป็นสารช่วยกระจายตัว ผลจากการวิเคราะห์สารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคเงินที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี พบว่า มี plasmon band ปรากฏที่บริเวณความยาวคลื่นประมาณ 420 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการยืนยันว่ามีอนุภาคเงินอยู่ในสารละลาย และผลจากการทดสอบได้แสดงให้เห็นว่า สารละลายอนุภาคเงินที่เตรียมได้เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สำหรับโครงการวิจัยในปีที่ 2 นี้ จะเป็นการดำเนินงานต่อเนื่องจากโครงการในปีที่ 1 โดยนำผลการศึกษาทั้งในขั้นตอนการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลและขั้นตอนการเตรียมอนุภาคเงินมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาทดลองกรรมวิธีการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินเป็นองค์ประกอบ โดยทำการวิเคราะห์ทดสอบโครงสร้างทางเคมี สมบัติการดูดซับน้ำ การละลายน้ำ สมบัติเชิงกล ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งทดสอบความปลอดภัยในเบื้องต้นของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลดังกล่าว เพื่อให้ได้แผ่นฟิล์มที่มีสมบัติในการดูดซับน้ำและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สำหรับนำไปพัฒนาสู่การประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดแผลในอนาคต

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1 สารเคมี

- คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โซเดียม (Carboxymethylcellulose, Sodium salt : CMC) Analytical grade ผลิตโดยบริษัท Sigma Aldrich มีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight : MW) ขนาด 250,000 ดาลตัน
- กรดซิตริก (citric acid) Analytical grade ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty.
- พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol : PEG) Analytical grade ผลิตโดยบริษัท Fluka น้ำหนักโมเลกุล 4,000 ดาลตัน
- พอลิไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone K30 : PVP) Analytical grade ผลิตโดย Fluka น้ำหนักโมเลกุล 40,000 ดาลตัน
- ซิลเวอร์ไนเตรต (Silver nitrate : AgNO<sub>3</sub>) Analytical grade ผลิตโดยบริษัท BDH

#### 2.2 วิธีการทดลอง

##### 2.2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล

###### กรณีไฮโดรเจล CMC

- เตรียมสารละลาย CMC ความเข้มข้น 2% (w/w) น้ำหนัก 600 กรัม กวนด้วยเครื่อง mechanical stirrer จนกระทั่งได้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน
- เติมกรดซิตริก 0.60 กรัม (5 % โดยน้ำหนักของ CMC) ลงในสารละลาย CMC ข้างต้น จากนั้นทำการกวนจนกระทั่งกรดซิตริกละลายหมด

###### กรณีไฮโดรเจล CMC-PEG-PVP

- เตรียมสารละลายน้ำหนัก 600 กรัม ที่ประกอบด้วย CMC ความเข้มข้น 2% (w/w) และมีพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) และพอลิไวนิลไพโรลิโดน (PVP) ในปริมาณตามที่กำหนด กวนด้วยเครื่อง mechanical stirrer จนกระทั่งได้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน
- เติมกรดซิตริก 0.60 กรัม (5 % โดยน้ำหนักของ CMC) ลงในสารละลาย CMC ข้างต้น จากนั้นทำการกวนจนกระทั่งกรดซิตริกละลายหมด

กรณีไฮโดรเจล CMC-PEG-PVP ที่มีอนุภาคเงิน ได้ทำการศึกษาทดลอง 2 วิธีการคือ

วิธีที่ 1 การเตรียมอนุภาคเงินแล้วจึงนำมาใช้ในการเตรียมสารละลาย CMC

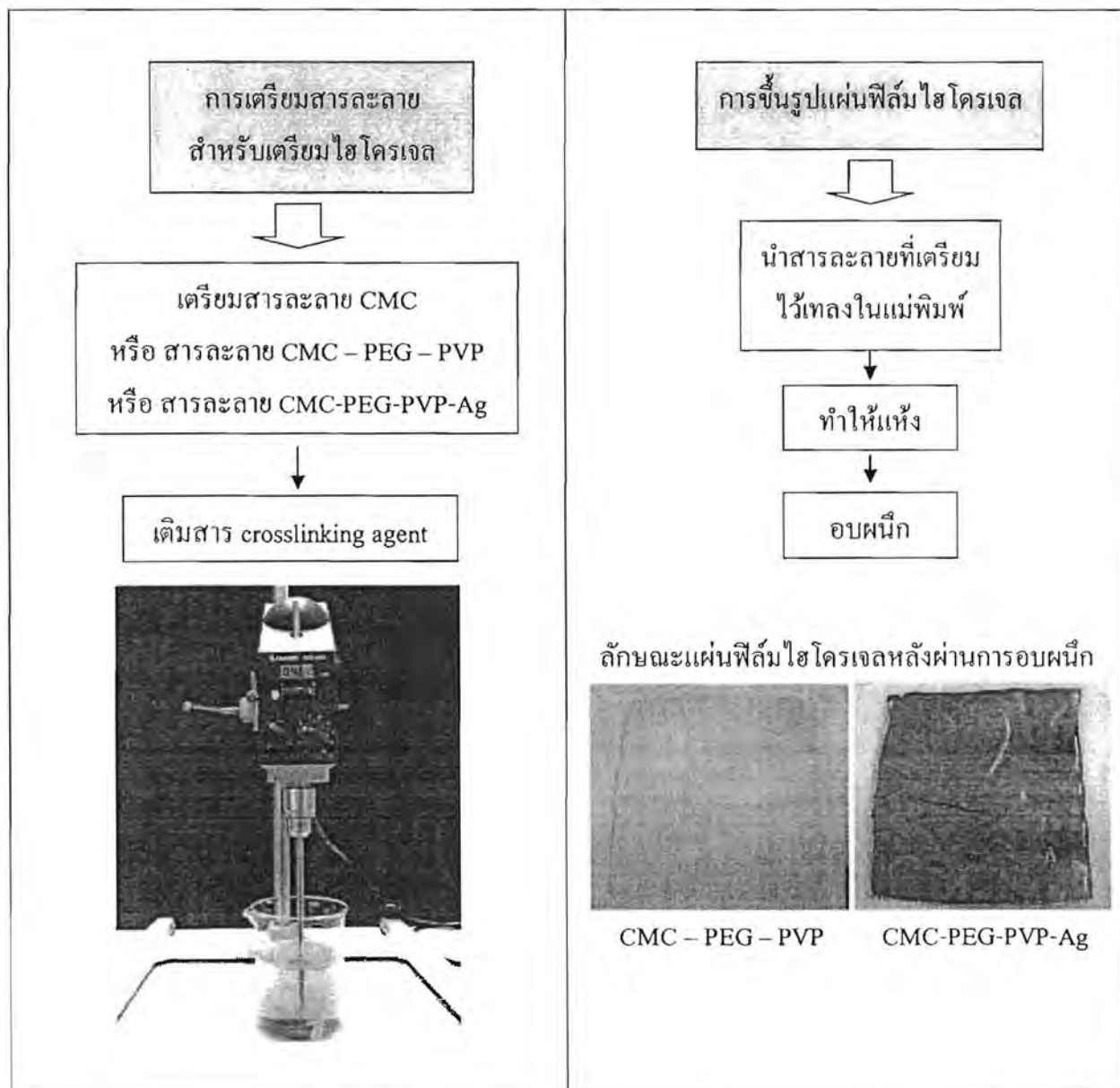
- ชั่ง PEG น้ำหนัก 0.24 กรัม (2% โดยน้ำหนักของ CMC) แล้วเติมน้ำกลั่น 10 กรัมให้ความร้อนแก่สารละลายจนมีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยมีการปั่นกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก อัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ตลอดระยะเวลาการเตรียมสาร
- ค่อยๆ หยดสารละลาย 1%  $AgNO_3$  ปริมาตร 1.89 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาณ Ag ใน CMC เท่ากับ 1000 ppm) ลงในสารละลาย PEG ข้างต้น โดยใช้เวลาประมาณ 30 วินาที
- กวนสารละลายต่อไปอีก 1 นาที แล้วเติมสารละลาย PVP (2% โดยน้ำหนักของ CMC โดยใช้ PVP 0.12 กรัมละลายในน้ำ 5.00 กรัม) แล้วกวนต่อไปอีก 20 นาที จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อนใส
- นำสารละลายข้างต้นผสมกับน้ำกลั่นปริมาณครบ 600 g จากนั้นชั่ง CMC น้ำหนัก 12.00 กรัม เติมหลงไป กวนให้ละลายด้วย mechanical stirrer ด้วยความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เติมกรดซัลฟิวริกน้ำหนัก 0.60 กรัม ลงในสารละลาย กวนให้ละลายด้วย mechanical stirrer ประมาณ 5 นาที หรือจนกระทั่งกรดซัลฟิวริกละลายหมด

วิธีที่ 2 การเตรียมสารละลาย CMC ร่วมกับสารที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคเงิน

- ชั่ง PEG น้ำหนัก 0.24 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 10 กรัม กวนจนกระทั่ง PEG ละลายหมด
- เติมสารละลาย 1%  $AgNO_3$  ปริมาตร 1.89, 3.78, 9.45, 18.9 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาณ Ag ใน CMC เท่ากับ 1000, 2000, 5000, 10000 ppm ตามลำดับ) คนให้สารละลายเข้ากัน
- เติมสารละลาย PVP 0.12 กรัม แล้วกวนจนกระทั่ง PVP ละลายหมด
- นำสารละลายข้างต้นผสมกับน้ำกลั่นปริมาณครบ 600 g จากนั้นชั่ง CMC น้ำหนัก 12.00 กรัม เติมหลงไป กวนให้ละลายด้วย mechanical stirrer ด้วยความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เติมกรดซัลฟิวริกน้ำหนัก 0.60 กรัม ลงในสารละลาย กวนให้ละลายด้วย mechanical stirrer ประมาณ 5 นาที หรือจนกระทั่งกรดซัลฟิวริกละลายหมด

### 2.2.2 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล

- ทำการขึ้นรูปด้วยวิธีการเทแบบ (casting) โดยเทสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2.1 ลงในแม่พิมพ์อะคริลิก ขนาด 25 x 25 เซนติเมตร แล้วตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งได้แผ่นฟิล์มแห้งสนิท
- นำแผ่นฟิล์มไปอบผึ่งที่อุณหภูมิและเวลาตามกำหนด



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล

## 2.3 การวิเคราะห์ทดสอบ

### 2.3.1 การทดสอบค่าการดูดซับน้ำ

#### วิธีการทดสอบ

ตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 4 x 4 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักแผ่นฟิล์ม จากนั้นนำแผ่นฟิล์มจุ่มแช่ในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องตามระยะเวลาที่กำหนด (10 วินาที และ 24 ชั่วโมง)



เมื่อครบกำหนดเวลา นำแผ่นฟิล์มขึ้นจาก น้ำกลั่น ชับน้ำส่วนเกินออก แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำ ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำ} = \frac{(\text{น้ำหนักหลังแช่น้ำ} - \text{น้ำหนักก่อนแช่น้ำ}) \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนแช่น้ำ}}$$

### 2.3.2 การทดสอบค่าการละลายน้ำ

#### วิธีการทดสอบ

ตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 4 x 4 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักแผ่นฟิล์ม จากนั้นนำแผ่นฟิล์มจุ่มแช่ในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำแผ่นฟิล์มขึ้นจากน้ำกลั่น แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแผ่นฟิล์มหลังอบ และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ} = \frac{(\text{น้ำหนักแห้งก่อนแช่น้ำ} - \text{น้ำหนักแห้งหลังแช่น้ำ}) \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งก่อนแช่น้ำ}}$$

### 2.3.3 การทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มด้านความแข็งแรงและการยืดตัว (Tensile strength และ Elongation) โดยใช้วิธีตามมาตรฐาน ASTM D882-02

เครื่องมือที่ใช้ : เครื่อง universal testing machine ยี่ห้อ Hounsfield รุ่น H 10 KM

#### การเตรียมชิ้นทดสอบ

- ตัดชิ้นงานเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 120 x 10 มิลลิเมตร จำนวนตัวอย่างละ 10 ชิ้นงาน (สำหรับใช้ทดสอบชิ้นงานชนิดแห้ง 5 ชิ้นงาน และหลังการดูดซับน้ำ 5 ชิ้นงาน)

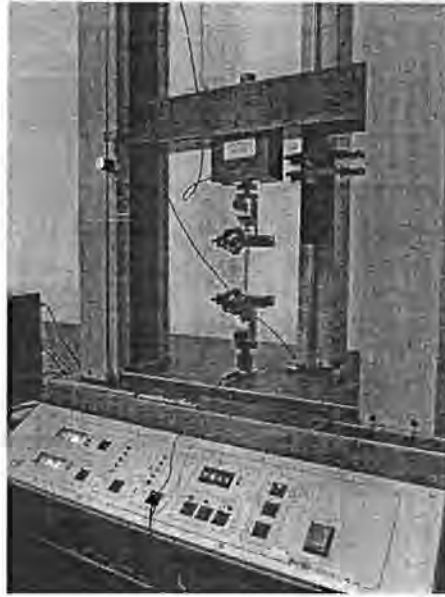
หมายเหตุ การทดสอบชิ้นงานชนิดที่ผ่านการดูดซับน้ำ ทำได้โดยนำชิ้นงานแช่น้ำ 10 วินาที แล้วนำขึ้นชับน้ำส่วนเกินออก จากนั้นส่งชิ้นงานไว้ 15 นาที แล้วจึงทำการทดสอบ

- วัดความหนาของแผ่นฟิล์มก่อนการทดสอบด้วยไมโครมิเตอร์

#### วิธีการทดสอบ

- ใช้ระยะ gauge length 50 มิลลิเมตร อัตราเร็วในการดึงยึด 10 มิลลิเมตรต่อนาที (สำหรับชิ้นงานแบบแห้ง) และ 50 มิลลิเมตรต่อนาที (สำหรับชิ้นงานที่ผ่านการดูดซับน้ำ)

- บันทึกค่า Tensile strength at Max.Load (MPa) และ % Elongation at break ทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ



รูปที่ 2.2 เครื่อง universal testing machine

2.3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลด้วยฟูริเออร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared spectrometer : FT-IR)

เครื่องมือที่ใช้ : FT-IR ยี่ห้อ Perkin – Elmer รุ่น Spectrum One

วิธีการวิเคราะห์ทดสอบ

ทำการวัดอินฟราเรดสเปกตรัม ใน ATR (Attenuated Total Reflectance ) mode โดยตัวอย่างแผ่นฟิล์มจะถูกนำไปวางบน ZnSe flat plate จากนั้นทำการวิเคราะห์ในช่วงความยาวคลื่น  $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$  โดยใช้ scan เท่ากับ 16 และ resolution เท่ากับ  $4.0 \text{ cm}^{-1}$

2.3.5 การวิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสง UV-visible ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer

เครื่องมือที่ใช้ : UV/Vis spectrophotometer ยี่ห้อ Analytic Jena AG รุ่น SPECORD S100

วิธีเตรียมตัวอย่าง : นำแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ยังไม่ผ่านการอบแห้งน้ำหนัก 0.25 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร จนกระทั่งได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

วิธีการวิเคราะห์ทดสอบ

นำสารละลายตัวอย่างบรรจุใน cuvette จากนั้นทำการวิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 300-700 นาโนเมตร โดยใช้ Integration time เท่ากับ 20 ms และ Accumulation time เท่ากับ 10 ms

### 2.3.6 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลด้วยวิธีการทดสอบเชิงคุณภาพ ตามมาตรฐาน AATCC 147 และ วิธีการทดสอบเชิงปริมาณ ตามมาตรฐาน AATCC 100 โดยมีขั้นตอนและวิธีการทดสอบ ดังนี้

#### วิธีทดสอบตามมาตรฐาน AATCC 147

ใช้วิธีการทดสอบตามมาตรฐาน AATCC test method 147 โดยทำการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* มีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

1. ใช้ Loop เขี่ยเชื้อ *S.aureus* หรือ *E.coli* หรือ *P.aeruginosa* จำนวน 1 Loop ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Nutrient broth) แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อ *S.aureus* หรือ *E.coli* หรือ *P.aeruginosa* ที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
3. ใช้ Loop (เพียง Loop เดียว) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร แตะเชื้อ *S.aureus* หรือ *E.coli* หรือ *P.aeruginosa* ที่เตรียมได้ แล้วลากเส้นตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Nutrient Agar) จำนวน 5 เส้น ความยาวเส้นละ 60 มิลลิเมตร โดยให้แต่ละเส้นมีระยะห่างกันประมาณ 10 มิลลิเมตร
4. วางแผ่นแผ่นฟิล์มทดสอบ ขนาด 25 x 50 มิลลิเมตร พาดทับ เชื้อทั้ง 5 เส้นที่ขีดไว้
5. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ประเมินผลโดยการตรวจสอบการเกิดขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์บริเวณใต้แผ่นชั้นงานทดสอบ และวัดความกว้างของ Clean zone โดยคำนวณระยะ Clear zone ได้ดังสมการ

$$W = (T-D)/2$$

โดยที่ W = ระยะ clear zone (มิลลิเมตร)

T = ความกว้างทั้งหมดของชั้นงานและบริเวณ Clear zone (มิลลิเมตร)

D = ความกว้างของชั้นงานทดสอบ (มิลลิเมตร)

### วิธีทดสอบตามมาตรฐาน AATCC 100

1. เลี้ยงเชื้อ *S.aureus* หรือ *E.coli* หรือ *P.aeruginosa* ในอาหาร Nutrient Broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง – 24 ชั่วโมง
2. คูดเชื้อ *S.aureus* หรือ *E.coli* หรือ *P.aeruginosa* ในข้อ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ใน Nutrient Broth 100 มิลลิลิตร (จะได้เชื้อ stock ปริมาณ  $10^5$  CFU/ml) โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จะมีเชื้ออยู่ประมาณ  $10^8$  CFU/ml

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

$$10^8 (V_1) = 10^5 \times 100$$

$$V_1 = (10^5 \times 100) / 10^8 = 0.1 \text{ ml}$$

3. นำแผ่นฟิล์มตัวอย่างเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร (หนามากพอที่จะซับน้ำ 1 มิลลิลิตร ได้พอดี) วางในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ชุด
4. คูดเชื้อ Stock 1 มิลลิลิตร หยดบนแผ่นฟิล์มตัวอย่างทั้ง 2 ชุด
5. นำตัวอย่าง ชุดที่ 1 ชะล้างเชื้อด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร (ด้วยการเขย่า 1 นาที)
6. นำตัวอย่างชุดที่ 1 ทำ serial dilution ถึง  $10^{-1}$  แล้วทำ spread plate method บนจานอาหาร NA plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวน โคโลนีที่เกิดขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
7. นำตัวอย่างชุดที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบในทำนองเดียวกันกับชุดที่ 1
8. คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของจุลินทรีย์ จากสมการ

$$\%R = 100(B-A)/B$$

$$A = \text{จำนวน โคโลนี ที่ 24 ชั่วโมง}$$

$$B = \text{จำนวน โคโลนี ที่ 0 ชั่วโมง}$$

### 2.3.7 การทดสอบความเป็นพิษของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลต่อเซลล์โดยวิธี Test on extraction และวัดปริมาณเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay

วิธีเตรียมตัวอย่างทดสอบ: ตัดตัวอย่างทดสอบ (แผ่นฟิล์มไฮโดรเจล) ให้เป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในการทดสอบนี้จะใช้ Thermanox ® Coverslips lot 582781 เป็นตัวอย่างควบคุม (Control)

เซลล์ที่ใช้ทดสอบ : Human skin fibroblast ATCC CRL 2522 passage 8

#### วิธีการทดสอบ

การทดสอบ Test on extraction

Extraction vehicle : ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's medium – serum free (DMEM)

Extraction period and condition : ทำการแช่ตัวอย่างกับ Extraction vehicle เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์

Exposed period : บ่มเพาะเซลล์กับสาร Extraction vehicle ทั้งที่ไม่ได้เจือจางและที่นำไปเจือจาง 2 เท่า เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบเพื่อวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

โดยใช้สาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) และวัดความเข้มของสีม่วงที่เกิดขึ้น (MTT formazan) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

ทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

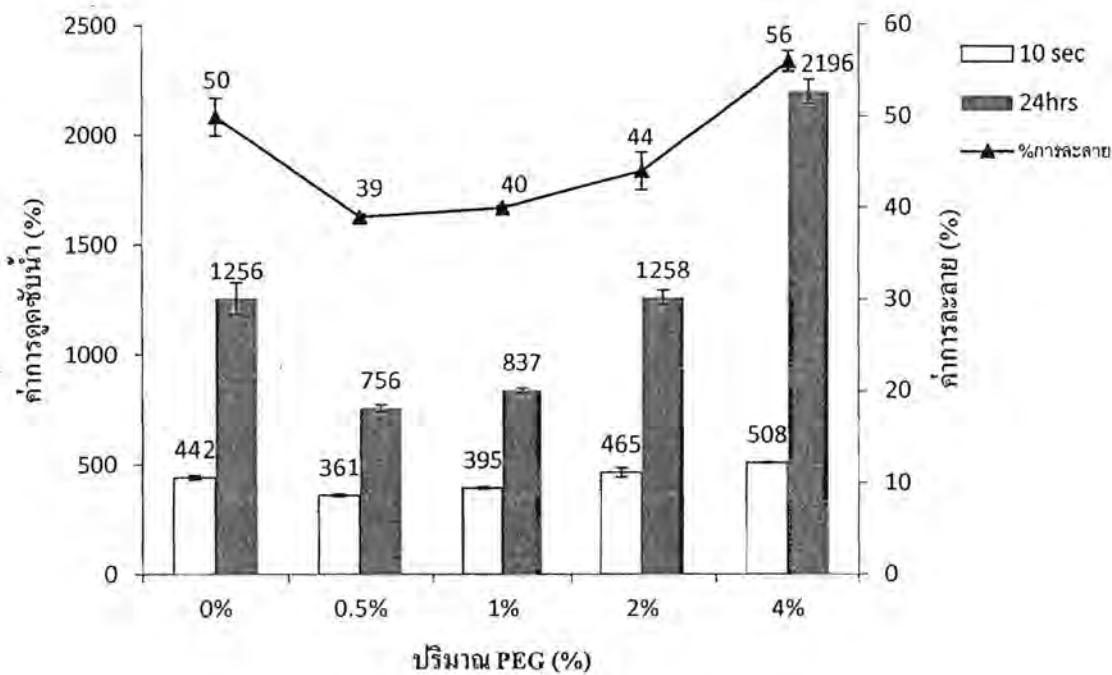
## บทที่ 3

### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 3.1 การศึกษาทดลองเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล

##### 3.1.1 สมบัติการดูดซับน้ำและการละลาย

ในการศึกษาทดลองปัจจัยด้านปริมาณความเข้มข้นของ PEG สำหรับการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลทำได้โดยใช้สารละลาย CMC น้ำหนักโมเลกุล 250,000 ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับ PVP ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักของ CMC และใช้กรดซิตริกความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักของ CMC โดยทำการศึกษาปริมาณการใช้ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4% โดยน้ำหนักของ CMC และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที ซึ่งผลการทดสอบการดูดซับน้ำและการละลายของแผ่นฟิล์มแสดงไว้ดังรูปที่ 3.1 จะเห็นได้ว่า แผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ไม่ได้เติม PEG มีการดูดซับน้ำภายหลังการแช่น้ำเป็นเวลา 10 วินาที และ 24 ชั่วโมง อยู่ที่ 442% และ 1256% ตามลำดับ เมื่อมีการเติม PEG ลงไปผสมรวมในปริมาณเล็กน้อยคือ 0.5% พบว่าแผ่นฟิล์มมีการดูดซับน้ำภายหลังการแช่น้ำเป็นเวลา 10 วินาที และ 24 ชั่วโมง ลดลงเหลือ 361% และ 756% ตามลำดับ แต่เมื่อเติม PEG เพิ่มขึ้นการดูดซับน้ำกลับมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งเมื่อผสม PEG ในปริมาณ 2% จะได้แผ่นฟิล์มที่มีค่าการดูดซับน้ำใกล้เคียงกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ไม่ได้เติม PEG โดยมีค่าการละลายน้ำที่ต่ำกว่า และเมื่อเติม PEG เพิ่มขึ้นจนถึง 4% พบว่าแผ่นฟิล์มมีค่าการดูดซับน้ำภายหลังการแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสูงถึง 2196% แต่มีค่าการละลายสูงถึง 56%



รูปที่ 3.1 ค่าการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วันทันที

ในกรณีที่ไม่ได้เติม PEG นั้นผลการทดสอบสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยในปีที่ 1 ที่พบว่า การใช้สารละลาย CMC ผสมร่วมกับกรดซิตริกสามารถเตรียมแผ่นฟิล์มที่มีสมบัติดูดซับน้ำได้ เนื่องจาก CMC ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับกรดซิตริกเกิดลักษณะของโครงสร้างตาข่ายขึ้นภายในโมเลกุล โดยมีกรดซิตริกทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อม สำหรับผลการทดลองนี้มีการใช้ PEG และ PVP เพิ่มเติมเข้ามาในสารละลาย ซึ่งพบว่าในช่วงที่มีการใช้ PEG ปริมาณไม่เกิน 2% นั้นมีผลทำให้แผ่นฟิล์มไฮโดรเจลมีการดูดซับน้ำและละลายน้ำได้น้อยลง ในเบื้องต้นจึงสันนิษฐานว่า PEG และ/หรือ PVP น่าจะมีอันตรกิริยากับกรดซิตริกที่มีผลทำให้เกิดโครงข่ายร่างแหในโมเลกุลของ CMC มากขึ้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดลองนี้มีปริมาณกรดซิตริกและ PVP คงที่อยู่ที่ 5% และ 1% โดยน้ำหนักของ CMC ตามลำดับ ซึ่งพบว่า การเติม PEG เพิ่มมากขึ้น มีผลทำให้แผ่นฟิล์มดูดซับน้ำและละลายน้ำได้มากขึ้น แสดงว่า PEG ซึ่งมีสมบัติชอบน้ำนั้นน่าจะมีบทบาทในการแทรกตัวอยู่ใน CMC ทำให้มีปริมาณความหนาแน่นของ crosslink ลดลงและมีการดูดซับน้ำ

ได้มากขึ้น มากกว่าที่จะมีสมบัติในการเกิดปฏิกิริยา crosslink กับกรดซัลฟิวริก ดังนั้นจึงคาดว่า นอกจาก CMC แล้ว สารที่มีส่วนร่วมในการทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกด้วยก็คือ PVP

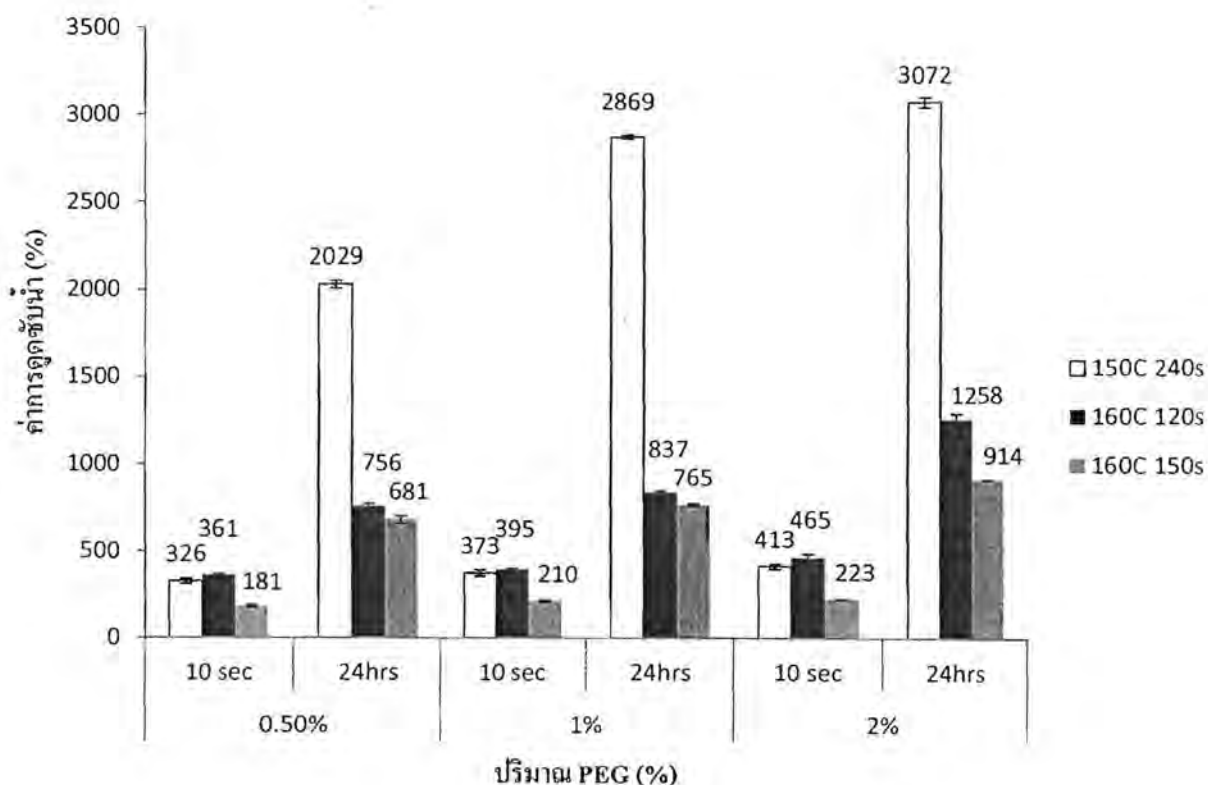
ในการศึกษาทดลองปัจจัยด้านปริมาณความเข้มข้นของ PEG และภาวะในการอบผนึกสำหรับการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลทำได้โดยใช้สารละลาย CMC น้ำหนักโมเลกุล 250,000 ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับ PVP ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักของ CMC และใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักของ CMC โดยทำการศึกษาปริมาณการใช้ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2% โดยน้ำหนักของ CMC และทำการศึกษาภาวะการอบผนึกที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 วินาที, อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที และที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 วินาที

จากกราฟรูปที่ 3.2 และ 3.3 พบว่า การใช้ปริมาณ PEG ที่ระดับความเข้มข้นสูงชันมีผลทำให้แผ่นฟิล์มมีค่าการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อพิจารณาที่แต่ละความเข้มข้นของ PEG จะเห็นได้ว่า กรณีที่ทำการทดสอบโดยแช่แผ่นฟิล์มในน้ำเป็นเวลา 10 วินาที นั้น การเพิ่มอุณหภูมิการอบผนึกจาก 150°C เป็น 160°C แต่ลดระยะเวลาลงครึ่งหนึ่งคือจาก 240 วินาที เป็น 120 วินาที พบว่า แผ่นฟิล์มที่ผ่านการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160°C 120 วินาที ยังคงมีค่าการดูดซับน้ำสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่ผ่านการอบผนึกที่อุณหภูมิ 150°C 240 วินาที อยู่เล็กน้อย โดยมีค่าการดูดซับน้ำอยู่ในช่วง 360 – 470% แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160°C ให้ยาวนานขึ้นอีกเพียง 30 วินาที เป็น 150 วินาที จะมีผลทำให้ค่าการดูดซับน้ำลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง คืออยู่ในช่วง 180 – 220%

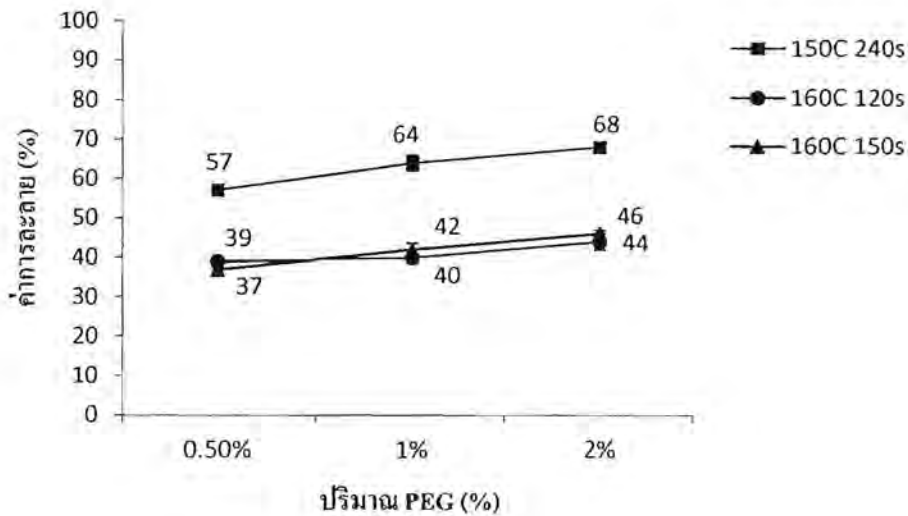
ส่วนผลการทดสอบค่าการดูดซับน้ำภายหลังการแช่แผ่นฟิล์มในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างชัดในกรณีแผ่นฟิล์มที่ผ่านการอบผนึกที่อุณหภูมิ 150°C เป็นเวลา 240 วินาที ซึ่งมีค่าการดูดซับน้ำสูงถึง 2000 – 3100 % โดยที่ค่าการดูดซับน้ำยังคงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ PEG สำหรับแผ่นฟิล์มที่ผ่านการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 120 วินาที และ 150 วินาที นั้นให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 680 – 1260 % โดยการอบผนึกเป็นเวลา 150°C ให้ค่าการดูดซับน้ำต่ำกว่าการอบที่เวลา 120 วินาที เล็กน้อย



จากการทดลองพบว่า แผ่นฟิล์มที่มีค่าการดูดซับน้ำสูงจะมีค่าการละลายสูงตามไปด้วย ซึ่งแม้ว่าแผ่นฟิล์มที่ผ่านการอบผนึกที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 วินาที จะให้ค่าการดูดซับน้ำสูง แต่แผ่นฟิล์มยังคงละลายน้ำได้มากกว่า 50% ที่ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ส่วนการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 และ 150 วินาที มีค่าการละลายใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 37-46%



รูปที่ 3.2 ค่าการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบผนึกที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

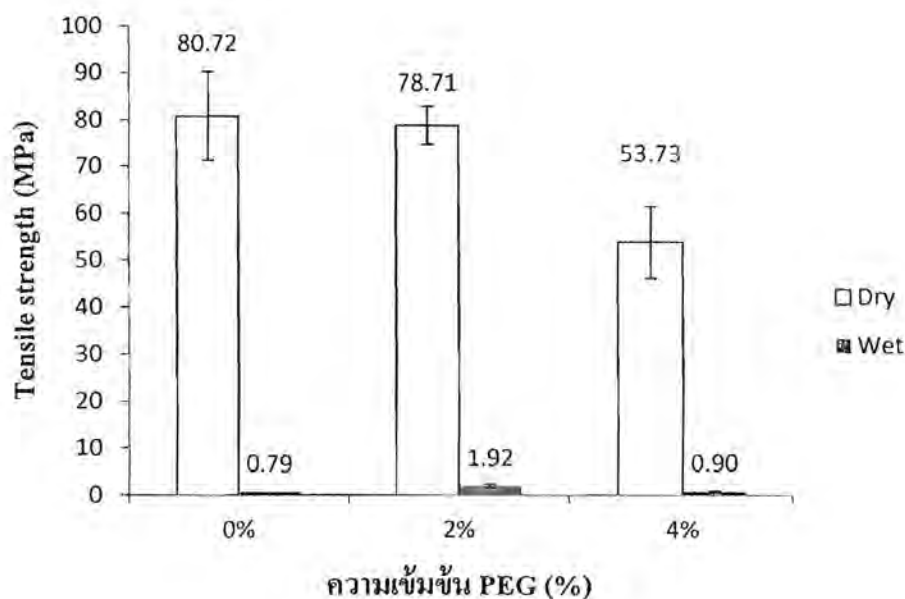


รูปที่ 3.3 ค่าการละลายของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบผนึกที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

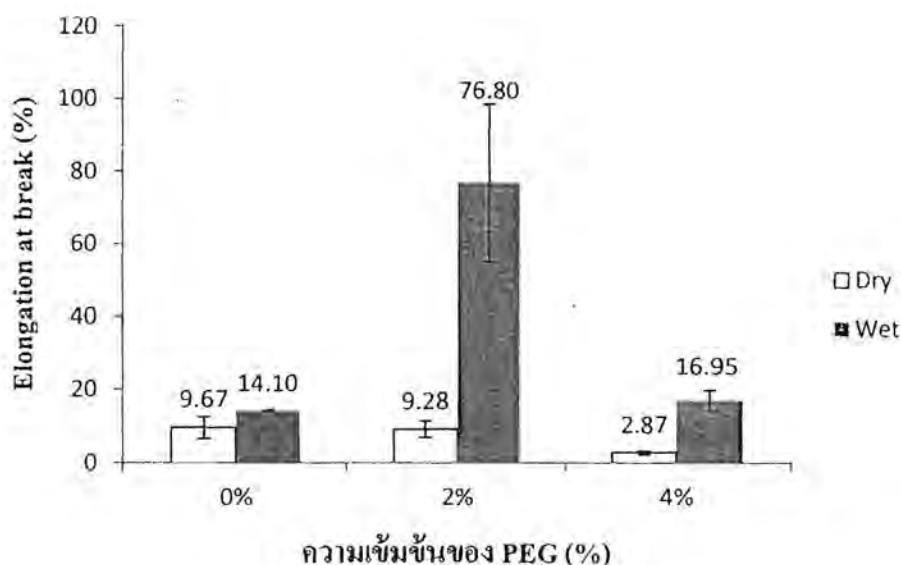
### 3.1.2 สมบัติเชิงกล

ผลการทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ณ จุดขาดของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่เตรียมโดยใช้ PEG และ PVP ผสมร่วมกับ CMC (รูปที่ 3.4 และ รูปที่ 3.5) พบว่า ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงของแผ่นฟิล์มขณะแห้งมีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้ปริมาณ PEG มากขึ้น อย่างไรก็ตามผลการทดสอบแผ่นฟิล์มขณะเปียกพบว่า การเติม PEG ผสมร่วมในปริมาณความเข้มข้น 2% ให้ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงขณะเปียกสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้ผสม PEG และ PVP ประมาณ 2 เท่า แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ PEG เป็น 4% ความแข็งแรงต่อแรงดึงของแผ่นฟิล์มขณะเปียกจะมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ยังคงสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้ผสม PEG และ PVP อยู่เล็กน้อย สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ณ จุดขาดนั้นพบว่า การยืดตัวของแผ่นฟิล์มขณะแห้งมีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้ปริมาณ PEG เพิ่มขึ้น แต่การยืดตัวขณะเปียกนั้นพบว่าการเติม PEG ในปริมาณความเข้มข้น 2% มีผลทำให้แผ่นฟิล์มยืดตัวออกได้มากขึ้นถึง 77% แต่หากเพิ่มปริมาณ PEG ขึ้นเป็น 4% จะมีผลทำให้แผ่นฟิล์มเกิดการขาดได้ง่าย

จะเห็นได้ว่า ผลการทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มขณะเปียกนั้นค่อนข้างสอดคล้องกับสมบัติการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์ม ซึ่งผลดังกล่าวอธิบายได้ว่า PVP ที่เติมเข้าไปนั้นน่าจะมีผลทำให้ปริมาณโครงข่ายร่างแหในโมเลกุลมีมากขึ้นแผ่นฟิล์มจึงมีความแข็งแรงมากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันการมี PEG ที่มีสมบัติชอบน้ำอยู่ในโครงสร้างนั้น PEG จะเข้าไปแทรกตัวอยู่ในโครงข่ายร่างแหของโมเลกุล CMC ในขณะเดียวกันการมี PEG อยู่ในองค์ประกอบจะมีผลทำให้แผ่นฟิล์มมีการดูดซับน้ำได้มากขึ้น แผ่นฟิล์มจึงสามารถขยายตัวออกได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเติม PEG ปริมาณมากเกินไปจะมีผลทำให้แผ่นฟิล์มมีความแข็งแรงต่ำ เกิดการฉีกขาดได้ง่าย



รูปที่ 3.4 ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงขณะแห้งและขณะเปียกของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที



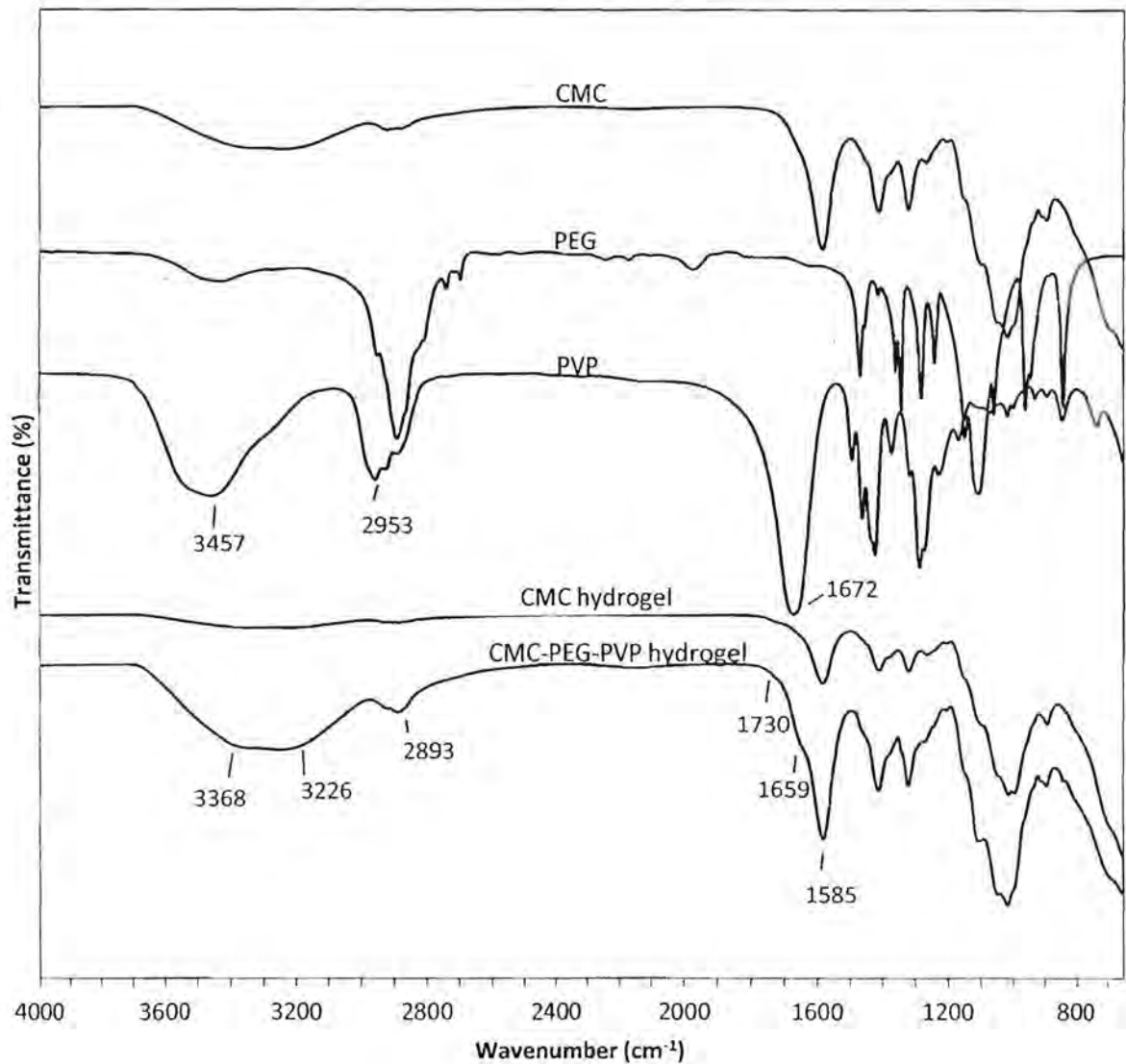
รูปที่ 3.5 ค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ณ จุดขาด ขณะแห้งและขณะเปียกของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที

### 3.1.3 ผลการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วย FT-IR

จากการนำแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่เตรียมโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ผสมร่วมกับ PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ความเข้มข้น 2% และใช้ crosslinking agent คือ กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที ไปทำการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FT-IR เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่เตรียมขึ้นโดยใช้ CMC ผสมกับกรดซัลฟิวริก (รูปที่ 3.6) พบว่า ตำแหน่งพีก (peak) ที่สำคัญซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของโมเลกุล CMC ที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้น ได้แก่ พีกลักษณะกว้างที่ตำแหน่ง 3368 และ 3226  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึง O-H stretching ของหมู่ hydroxyl พีกที่ตำแหน่ง 2893  $\text{cm}^{-1}$  ที่แสดงถึง C-H stretching และพีกที่ตำแหน่ง 1585  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึง stretching ของหมู่ carboxylate ตามลำดับ (Pourjavadi และคณะ, 2004)

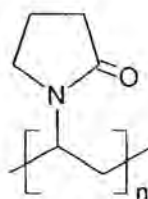
IR สเปกตรัมของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ใช้เฉพาะ CMC ผสมกับ crosslinking agent แสดง absorption peak ตำแหน่งที่สำคัญคือ  $1730\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึง C=O stretching ของหมู่ ester carbonyl (Lin และคณะ, 2005) ซึ่งเป็นการยืนยันว่า ภายในโครงสร้างโมเลกุลของไฮโดรเจล CMC ที่เตรียมขึ้นในการทดลองมีพันธะเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ระหว่าง CMC กับกรดซิทริก ที่ใช้เป็น crosslinking agent

ในขณะที่การเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลโดยใช้ CMC ผสมร่วมกับ PEG , PVP และ crosslinking agent พบว่า OH- stretching band ที่ตำแหน่ง  $3368$  และ  $3226\text{ cm}^{-1}$  มีลักษณะเป็นแถบกว้างมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนหรือการมีน้ำในโมเลกุลของสารที่มากขึ้น และพบ absorption peak ที่ตำแหน่ง  $1730\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึง C=O stretching ของหมู่ ester carbonyl เช่นเดียวกัน



รูปที่ 3.6 IR spectrum ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่เตรียมจาก CMC และที่เตรียมจากการใช้ CMC ผสมร่วมกับ PEG และ PVP ปริมาณ 2% และ 1% โดยน้ำหนักของ CMC ตามลำดับ โดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักของ CMC เป็น crosslinking agent และทำการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที เปรียบเทียบกับ spectrum ของผง CMC, PEG และ PVP ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง

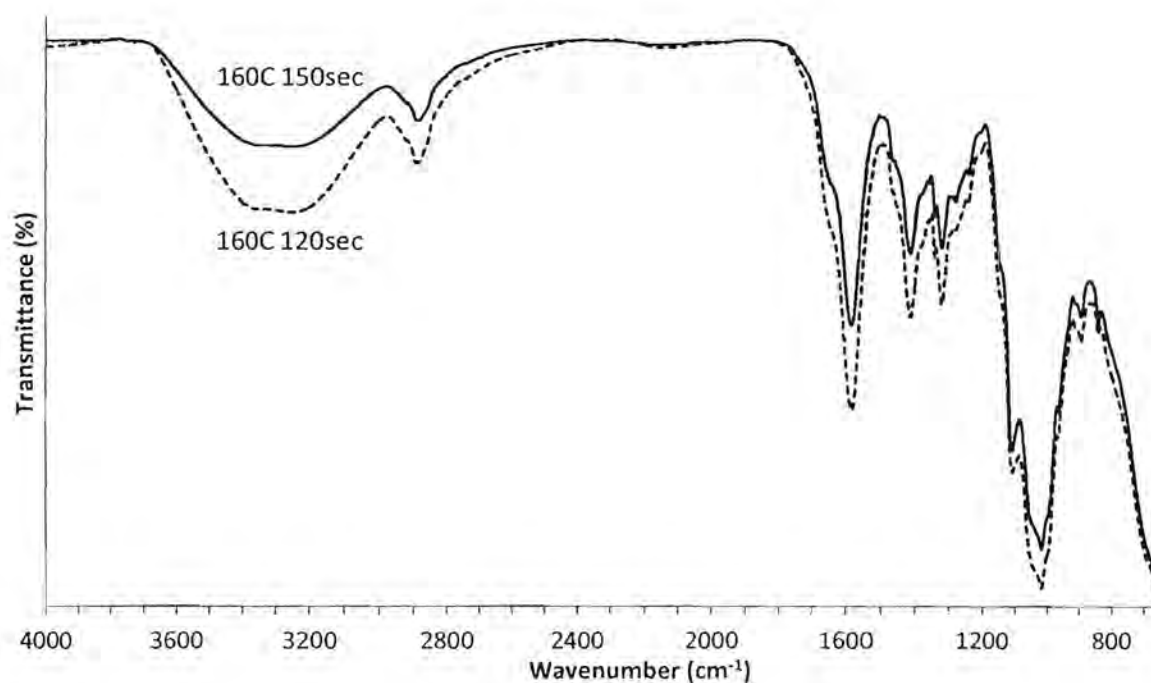
เป็นที่น่าสังเกตว่า กรณีที่มีการใช้ PEG และ PVP ผสมรวมด้วยนั้นจะพบ absorption peak ที่ตำแหน่ง  $1659\text{ cm}^{-1}$  เพิ่มเติมมาด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาจาก IR spectrum ของ PEG และ PVP แล้วพบว่า พีกที่ตำแหน่งดังกล่าวคือ C=O stretching ของ PVP โดยพบว่า พีกดังกล่าวมีการขยับจากตำแหน่ง  $1672\text{ cm}^{-1}$  ไปอยู่ที่  $1659\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งอธิบายได้ว่าเป็นผลจากการที่ C=O stretching ของ pyrrolidone ring (รูปที่ 3.7) เกิดเรโซแนนซ์ (resonance) ภายใน ring ทำให้อะตอมไนโตรเจนมีสภาพเป็นประจุบวกที่สามารถเกิดแรงดึงดูดกับหมู่ COO<sup>-</sup> ของกรดซิทริก หรืออาจมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้นระหว่างหมู่ C=O และ COOH (Kowalonek และ Kaczmarek, 2010, Wang และคณะ 2011)



รูปที่ 3.7 โครงสร้างทางเคมีของ polyvinylpyrrolidone

ซึ่งผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสนับสนุนข้อสันนิษฐานจากผลการทดสอบค่าการดูดซับน้ำและความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่คาดว่า น่าจะมีอันตรกิริยาเกิดขึ้นระหว่าง PVP กับกรดซิทริกด้วย เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาดังกล่าวมีผลให้โครงสร้างโมเลกุล CMC ยึดเหนี่ยวกันไว้ได้มากขึ้น ดังนั้น การใช้ PVP ผสมร่วมกับ CMC โดยเฉพาะในกรณีที่ใช้ PEG ปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ แผ่นฟิล์มจึงมีแนวโน้มให้การดูดซับน้ำต่ำกว่า ในขณะที่มีความแข็งแรงสูงกว่าแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ไม่ได้ผสม PVP และ PEG

สำหรับผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ผ่านการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 และ 150 วินาที (รูปที่ 3.8) จะเห็นได้ว่า OH- stretching band ที่ตำแหน่ง  $3368$  และ  $3226\text{ cm}^{-1}$  ของแผ่นฟิล์มที่ผ่านการอบผนึกเป็นเวลา 150 วินาที มีความเข้มข้นต่ำกว่า ซึ่งบ่งบอกว่าแผ่นฟิล์มมีการดูดซับน้ำไว้ในโมเลกุลได้น้อยกว่าแผ่นฟิล์มที่ผ่านการอบผนึกเป็นเวลา 120 วินาที



รูปที่ 3.8 IR spectrum ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่เตรียมจากการใช้ CMC ผสมร่วมกับ PEG และ PVP ปริมาณ 2% และ 1% โดยน้ำหนักของ CMC ตามลำดับ โดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักของ CMC เป็น crosslinking agent และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 และ 150 วินาที

### 3.2 การศึกษาทดลองเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มี Ag เป็นองค์ประกอบ

ในการศึกษาทดลองการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มี Ag เป็นองค์ประกอบได้เลือกใช้วิธีการเตรียมไฮโดรเจลโดยใช้ CMC ความเข้มข้น 2% ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% ใช้ PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ความเข้มข้น 2% โดยที่การผสมอนุภาคเงินในไฮโดรเจลนั้นในเบื้องต้นได้ทดลองศึกษาใน 2 วิธีการ คือ

#### 1. การเตรียมอนุภาคเงินแล้วจึงนำมาใช้ในการเตรียมสารละลาย CMC

การเตรียมอนุภาคเงินนั้นใช้วิธีการตามที่ระบุไว้ในโครงการปีที่ 1 คือ ใช้สารละลาย  $Ag^+$  ผสมร่วมกับ PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักของ CMC พร้อมทั้งมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้อนุภาค Ag แล้วจึงเติมผง CMC ลงในสารละลายดังกล่าวเพื่อเตรียมสารละลาย CMC






2. การเตรียมสารละลาย CMC ร่วมกับสารที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคเงิน ใช้วิธีการเตรียมสารละลายที่ประกอบด้วย  $Ag^+$  ร่วมกับ PVP ความเข้มข้น 1% และ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักของ CMC โดยทำการผสมที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงเติมผง CMC ลงในสารละลายดังกล่าวเพื่อเตรียมสารละลาย CMC ทันที

ทั้งนี้ ผลการทดลองเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล ที่ประกอบด้วย Ag ความเข้มข้น 1,000 ppm จากทั้ง 2 วิธีการ พบว่า หลังจากผ่านการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที แผ่นฟิล์มมีลักษณะทั่วไปคล้ายคลึงกัน โดยมีสีเหลืองน้ำตาล

ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการตามมาตรฐาน AATCC 147 แสดงในตารางที่ 3.1 พบว่า แผ่นฟิล์มไฮโดรเจลจากทั้ง 2 วิธีการ มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในลักษณะที่ใกล้เคียงกันคือ ไม่พบเชื้อ *S.aureus* ภายใตแผ่นฟิล์ม แต่ที่บริเวณขอบแผ่นฟิล์มยังคงมีเชื้อ *S.aureus* ขึ้นอยู่บ้าง และไม่มี clear zone ส่วนกรณีของแผ่นปิดแผลเกรดการค้าชนิดที่มี Ag เป็นองค์ประกอบ นั้น พบว่า มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดังเห็น ได้จากการเกิด clear zone รอบชิ้นงานอย่างชัดเจน

จากลักษณะของแผ่นฟิล์มและผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเบื้องต้นพบว่า แผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินซึ่งได้จากกรรมวิธีการเตรียมทั้ง 2 วิธีนั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดขั้นตอนในการเตรียมทำให้มีความสะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น จึงเลือกใช้วิธีการเตรียมสารละลาย CMC ร่วมกับสารที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคเงิน สำหรับใช้ในการศึกษาด้านการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีปริมาณอนุภาคเงินในระดับต่างๆ และการเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลเกรดการค้าที่มี Ag เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 3.1 สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินเป็นองค์ประกอบที่เตรียมได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลเกรดการค้า โดยใช้วิธีการทดสอบตามมาตรฐาน AATCC 147

ชนิดแผ่นฟิล์ม	Antimicrobial activity at 24 hrs contact time
เตรียม Ag ก่อนผสมกับสารละลาย CMC	
ใช้ Ag <sup>+</sup> ผสมในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย CMC	
แผ่นปิดแผลเกรดการค้า	

### 3.2.1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

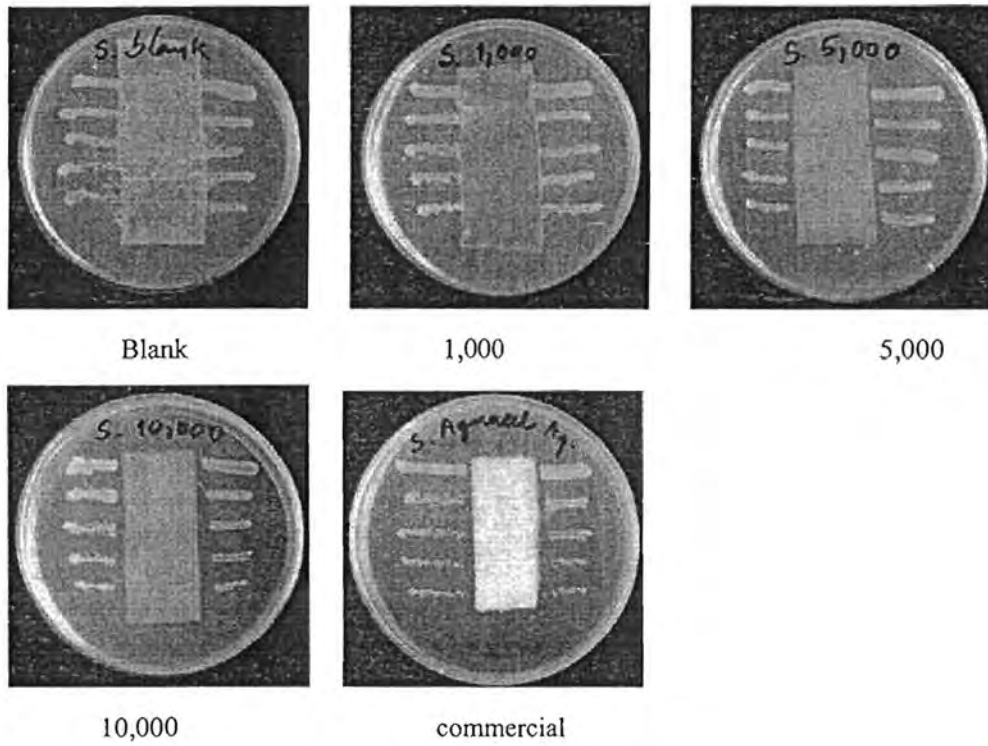
จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด (*S.aureus*, *E.coli* และ *P. Aeruginosa*) ตามมาตรฐาน AATCC 147 แสดงในตารางที่ 3.2 โดยนำแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินระดับความเข้มข้น 1000, 5000 และ 10000 ppm และแผ่นปิดแผลเกรดการก้ำวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า แผ่นฟิล์มที่ไม่มีการผสมอนุภาคเงิน และแผ่นฟิล์มที่มีปริมาณอนุภาคเงิน 1000 ppm ไม่มี clear zone เกิดขึ้น โดยพบเชื้อจุลินทรีย์ *S.aureus*, *E.coli* และ *P. aeruginosa* เกิดขึ้นที่บริเวณขอบด้านข้างและบนพื้นผิวแผ่นฟิล์ม แสดงในรูปที่ 3.9, 3.10 และ 3.11 ตามลำดับ ส่วนแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินที่ระดับ 5000 ppm และ 10000 ppm รวมทั้งแผ่นปิดแผลเกรดการก้ำมี clear zone เกิดขึ้นอย่างชัดเจน โดยแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินที่ระดับ 10000 ppm และแผ่นปิดแผลเกรดการก้ำมีระยะ clear zone มากกว่าแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินที่ระดับ 5000 ppm ประมาณ 2 เท่า

นอกจากนี้ เมื่อทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเชิงปริมาณโดยใช้มาตรฐาน AATCC 100 พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm และแผ่นปิดแผลเกรดการก้ำ แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด มากกว่า 99 % (ตารางที่ 3.3)

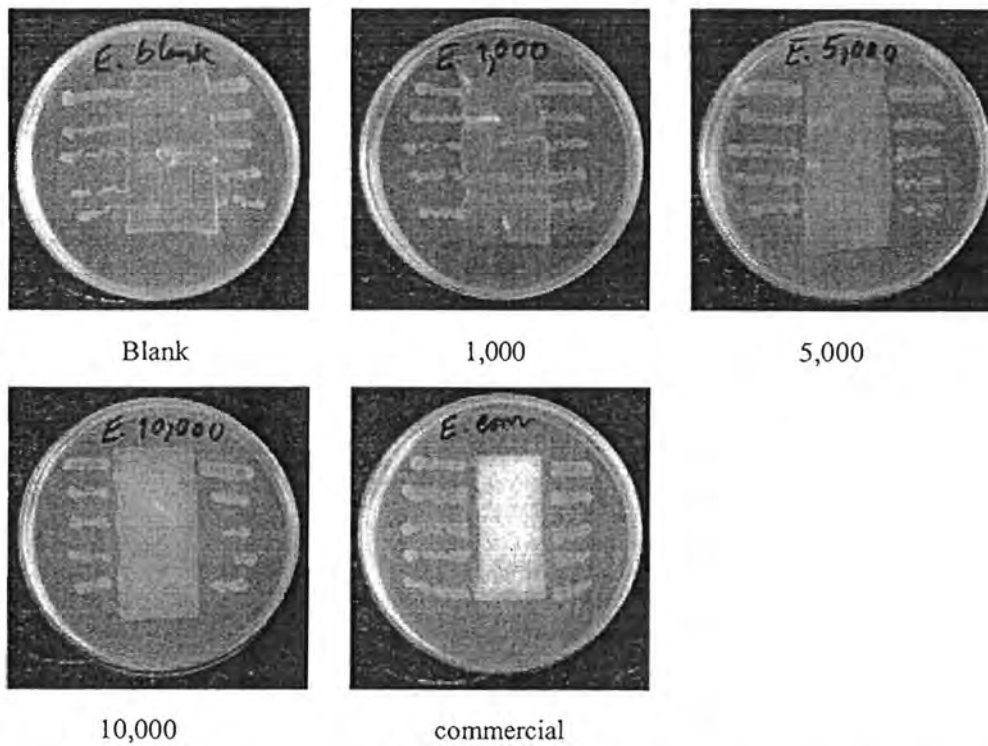
ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S.aureus*, *E.coli* และ *P.aeruginosa* ตามมาตรฐาน AATCC 147 ของแผ่นปิดแผลการค้ำและแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินระดับความเข้มข้น 1000, 5000 และ 10000 ppm

Test	Sample	T	W
Microorganisms		(mm.)	(mm.)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Blank	NZ/NI	0
	1,000	NZ/I	0
	5,000	28.66	1.83
	10,000	31.33	3.16
	commercial	29.33	2.16
<i>Escherichia coli</i>	Blank	NZ/NI	0
	1,000	NZ/I	0
	5,000	29.33	2.16
	10,000	33.66	4.16
	commercial	29.00	2.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Blank	NZ/NI	0
	1,000	NZ/I	0
	5,000	26.66	0.83
	10,000	29.00	2.00
	commercial	29.33	2.16

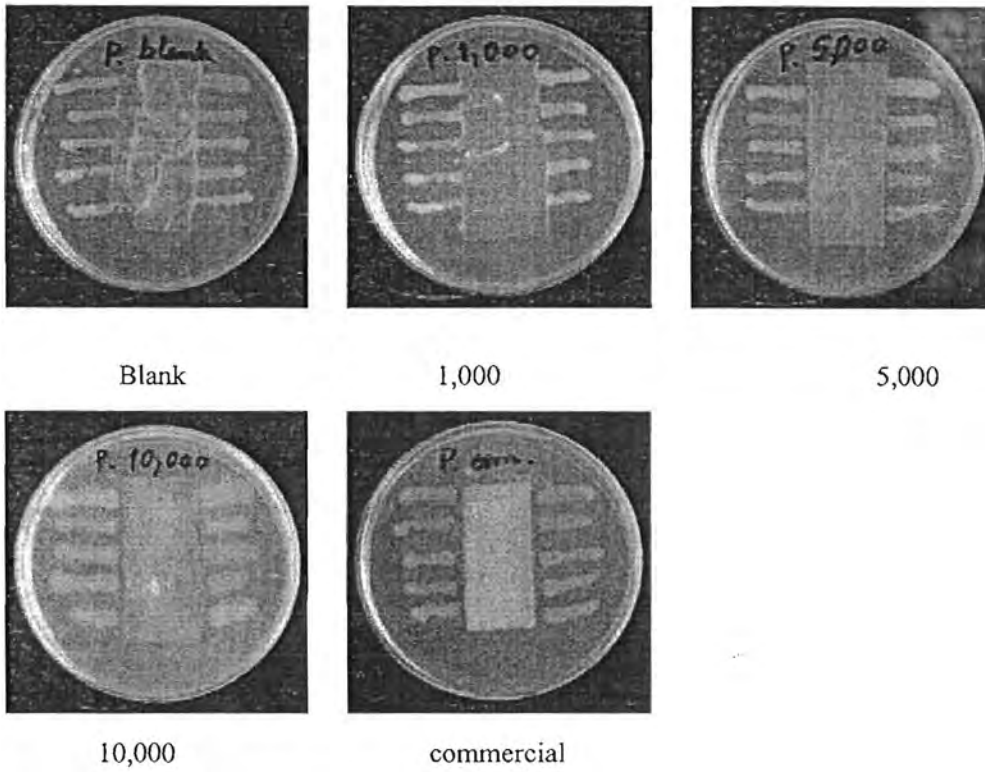
NZ = No clear zone , NI = No inhibition of growth under the sample, I = Inhibition of growth under the sample



รูปที่ 3.9 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ตามมาตรฐาน AATCC 147 ที่เวลา 24 ชั่วโมง



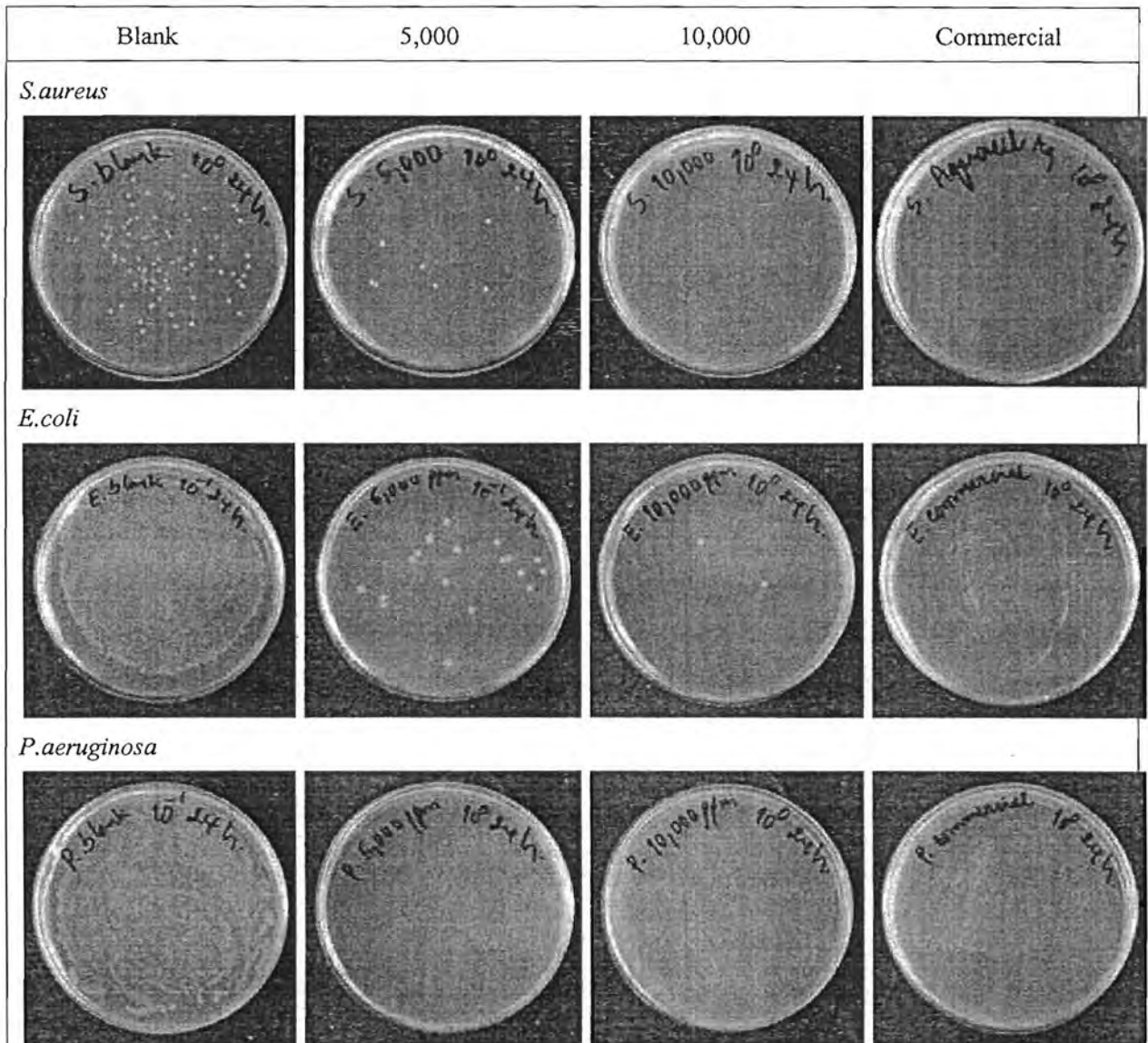
รูปที่ 3.10 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *E.coli* ตามมาตรฐาน AATCC 147 ที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.11 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *P.aeruginosa* ตามมาตรฐาน AATCC 147 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S.aureus*, *E.coli* และ *P.aeruginosa* ของแผ่นปิดแผลกวดการค้ำและแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm โดยใช้มาตรฐาน AATCC 100

Test Microorganisms	Sample	The number of bacteria CFU/ml (0 h.)	The number of bacteria CFU/ml (24 h.)	% Reduction
<i>S.aureus</i>	Blank	$1.6 \times 10^6$	$7.9 \times 10^4$	-
	5,000	-	$6.6 \times 10^3$	99.58
	10,000	-	$<1.0 \times 10^2$	99.99
	Commercial	-	$<1.0 \times 10^2$	99.99
<i>E.coli</i>	Blank	$7.0 \times 10^5$	$>3.0 \times 10^6$	-
	5,000 ppm	-	$1.8 \times 10^5$	74.28
	10,000 ppm	-	$2.0 \times 10^3$	99.71
	commercial	-	$<1.0 \times 10^2$	99.99
<i>P.aeruginosa</i>	Blank	$8.9 \times 10^5$	$>3.0 \times 10^6$	-
	5,000 ppm	-	$<1.0 \times 10^2$	99.99
	10,000 ppm	-	$<1.0 \times 10^2$	99.99
	commercial	-	$<1.0 \times 10^2$	99.99



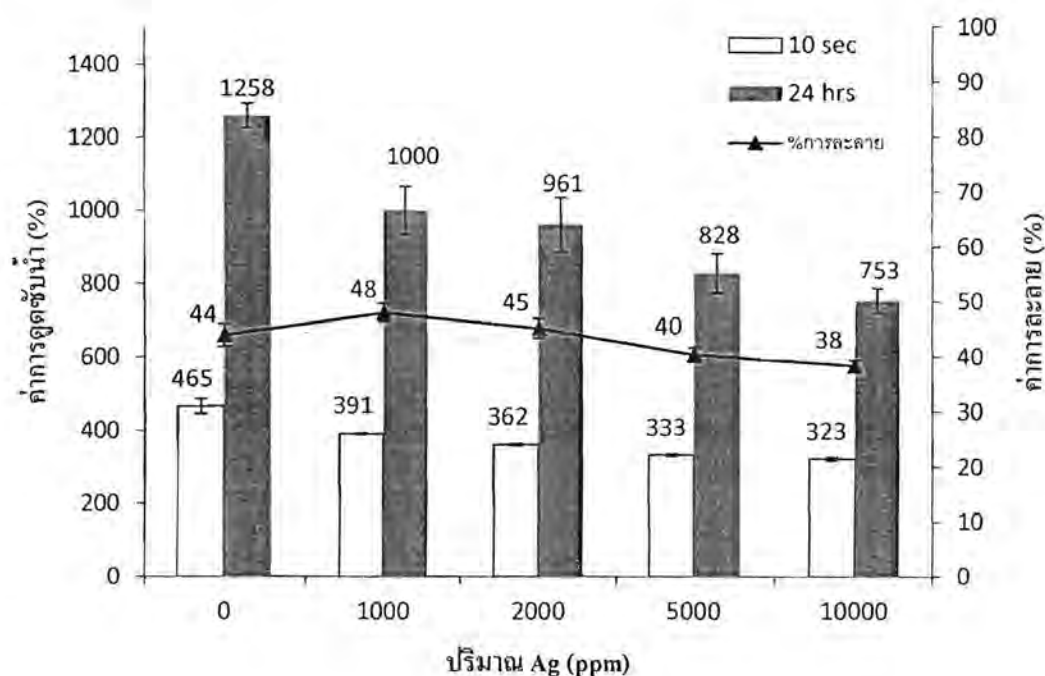
รูปที่ 3.12 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามมาตรฐาน AATCC 100 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของแผ่นปิดแผลเกรดการค้าและแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงินระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm



### 3.2.2 สมบัติการดูดซับน้ำและการละลาย

ในการศึกษาทดลองอิทธิพลด้านปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคเงินในแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล ทำได้ โดยเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 1000, 2000, 5000 และ 10000 ppm ซึ่งผลการทดสอบการดูดซับน้ำและการละลายของแผ่นฟิล์มแสดงไว้ดังรูปที่ 3.13 จะเห็นได้ว่า แผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีการเติมอนุภาคเงินเพิ่มมากขึ้นมีแนวโน้มให้ค่าการดูดซับน้ำและการละลายน้ำลดลง

การที่แผ่นฟิล์มไฮโดรเจลมีการดูดซับน้ำและการละลายน้ำลดลงเมื่อมีปริมาณอนุภาคเงินเพิ่มขึ้นนั้น สันนิษฐานว่า น่าจะเป็นผลจากการเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกของ  $Ag^+$  กับประจุลบของ  $COO^-$  ใน โครงสร้างไฮโดรเจล CMC ซึ่งมีผลทำให้โมเลกุล CMC อยู่ใกล้ชิดกันมากขึ้น จึงดูดซับน้ำได้น้อยลง



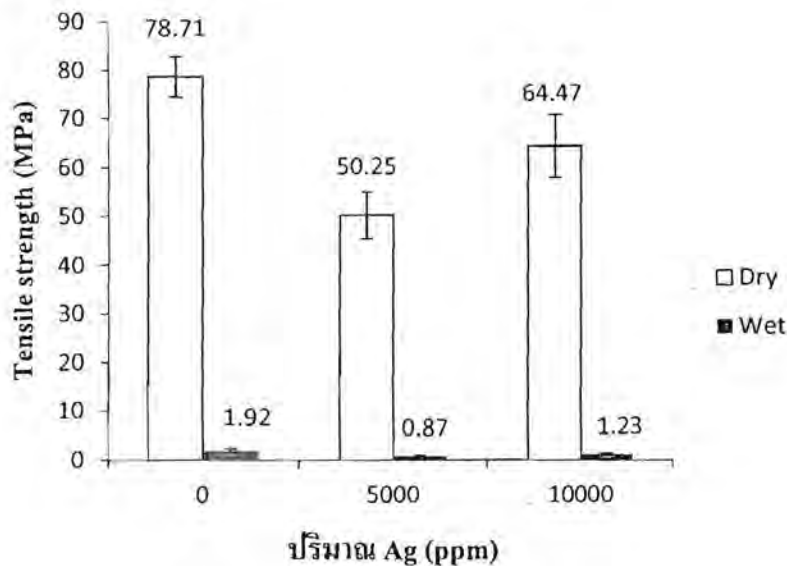
รูปที่ 3.13 ค่าการดูดซับน้ำและค่าการละลายของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 1000, 2000, 5000 และ 10000 ppm เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ไม่มีอนุภาคเงิน

### 3.2.3 สมบัติเชิงกล

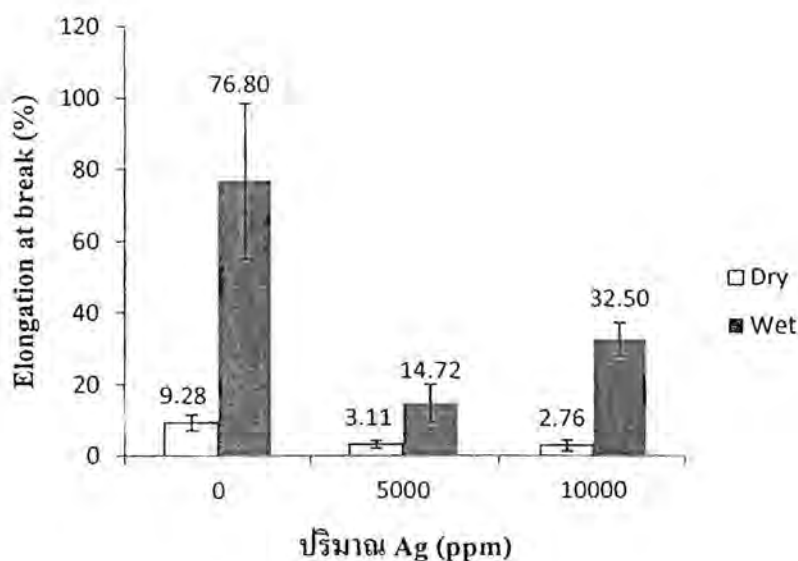
เมื่อนำแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีปริมาณอนุภาคเงินในระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm มาทำการทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึงพบว่า

แผ่นฟิล์มทั้งขณะแห้งและขณะเปียกมีค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงและค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวลดลงจากแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้เติมอนุภาคเงิน ซึ่งสันนิษฐานว่า การมีอนุภาคเงินแทรกตัวอยู่ในโครงสร้างไฮโดรเจล CMC อาจมีผลทำให้ความต่อเนื่องของเนื้อพอลิเมอร์ (matrix) ลดลงจากเดิม แผ่นฟิล์มจึงมีความแข็งแรงลดลง ส่งผลทำให้แผ่นฟิล์มในขณะแห้งมีความเปราะ ส่วนในขณะเปียกก็มีความแข็งแรงน้อยกว่าและเกิดการขาดได้ง่ายกว่าแผ่นฟิล์มที่ไม่มีอนุภาคเงิน

อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่า แผ่นฟิล์มที่มีปริมาณอนุภาคเงินในระดับความเข้มข้น 10000 ppm กลับมีแนวโน้มให้ค่าความแข็งแรงและค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 5000 ppm (รูปที่ 3.14 และ 3.15)



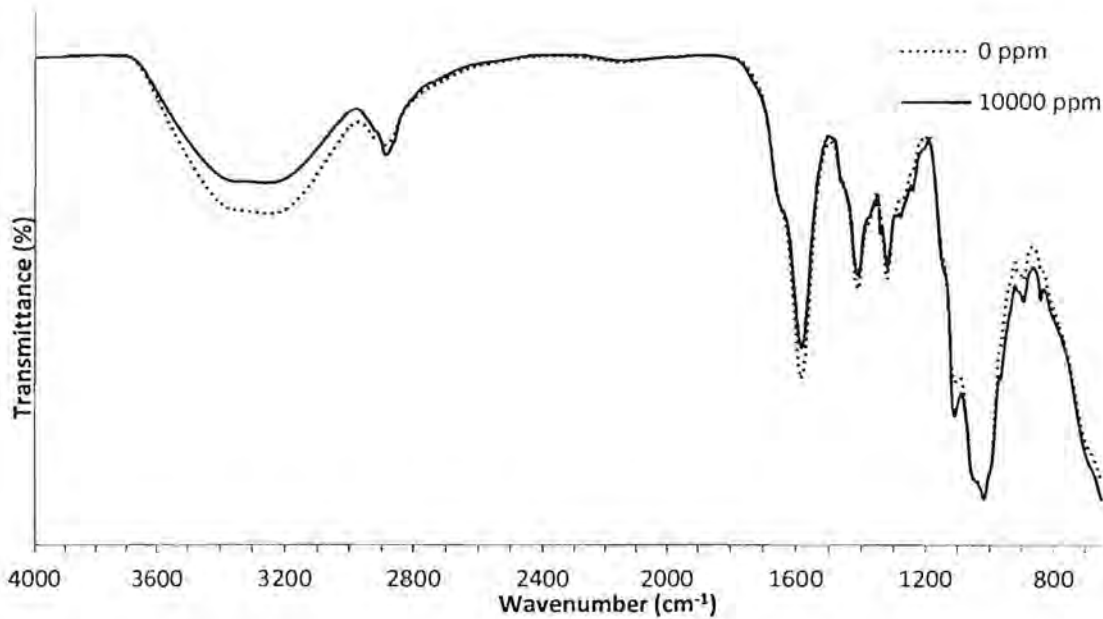
รูปที่ 3.14 ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงขณะแห้งและขณะเปียกของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ไม่มีอนุภาคเงิน



รูปที่ 3.15 ค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ณ จุดขาด ขณะแห้งและขณะเปียกของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ไม่มีอนุภาคเงิน

### 3.2.4 ผลการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วย FT-IR

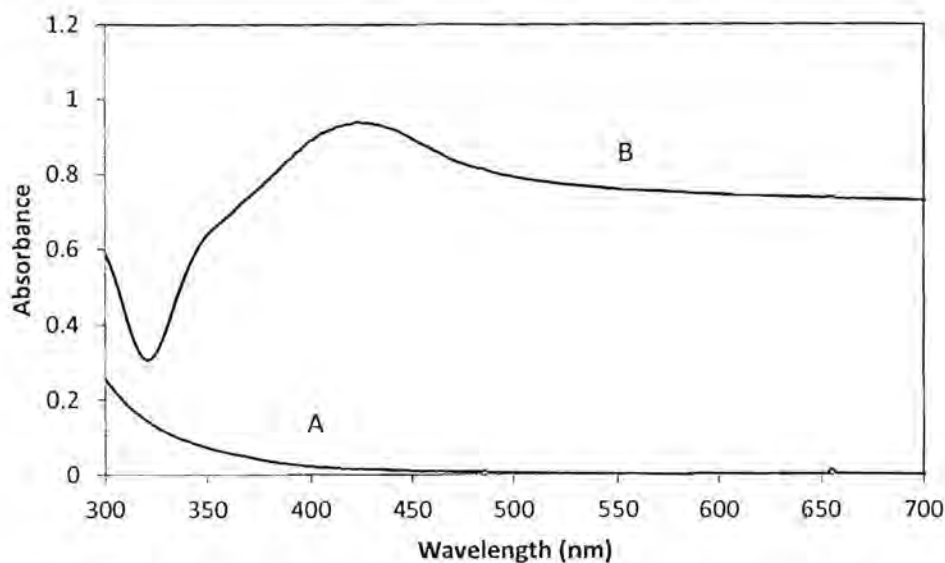
จากการนำแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินปริมาณความเข้มข้น 10000 ppm ไปทำการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FT-IR เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้เติมอนุภาคเงิน (รูปที่ 3.16) พบว่า พิกที่สำคัญต่างๆ ได้แก่ absorption peak ที่ตำแหน่ง  $1730\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึง C=O stretching ของหมู่ ester carbonyl และ absorption peak ที่ตำแหน่ง  $1653\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึง C=O stretching ของ pyrrolidone ring ยังคงปรากฏขึ้นที่ตำแหน่งเดิมไม่ต่างไปจากแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ไม่มีอนุภาคเงิน แต่สังเกตเห็นว่า O-H stretching band ที่ตำแหน่ง  $3368$  และ  $3226\text{ cm}^{-1}$  ของแผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคเงิน 10000 ppm นั้นมีความเข้มข้นน้อยกว่า ซึ่งแสดงถึงการมีน้ำในโมเลกุลของสารหรือการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่น้อยกว่าแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ไม่มีอนุภาคเงิน



รูปที่ 3.16 IR spectrum ของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่มีปริมาณอนุภาคเงินที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ไม่มีอนุภาคเงิน

### 3.2.5 ผลการวิเคราะห์การดูดกลืนแสง UV-Visible

การพิสูจน์ถึงการเกิดอนุภาคเงินขึ้นในแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลทำได้โดยอาศัยการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV/visible spectrophotometer ซึ่งผลจากการนำแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC ที่ผสม PEG, PVP, crosslinking agent และ  $\text{AgNO}_3$  โดยมีปริมาณ Ag ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ซึ่งยังไม่ได้ผ่านการอบแห้งมาทำการละลายน้ำ พบว่า สารละลายดังกล่าวมีตำแหน่งการดูดกลืนแสงสูงสุดที่บริเวณ 423 นาโนเมตร ที่แสดงถึง surface plasmon resonance band ของอนุภาคเงิน นอกจากนี้ยังมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ตำแหน่ง 350 นาโนเมตร (รูปที่ 3.17) ซึ่งเกิดจาก multipole transitions ของ surface plasmon อันเนื่องมาจากอนุภาคเงินที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Bhui และคณะ, 2009) ส่วนในกรณีที่น่าสารละลายหลังการผสมองค์ประกอบข้างต้นมาทำการวิเคราะห์ทันทีจะไม่พบการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งดังกล่าว ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวจึงยืนยันให้เห็นว่า ในสารละลายที่ประกอบด้วย CMC, PEG, PVP และกรดซิตริกนั้น เมื่อมีการเติมซิลเวอร์ไอออนลงไป ซิลเวอร์ไอออน ( $\text{Ag}^+$ ) จะสามารถเกิดการรีดิวซ์กลายเป็นอนุภาคเงิน ( $\text{Ag}^0$ ) ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้อนุภาคเงินอยู่ในแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลตามต้องการ



รูปที่ 3.17 แถบการดูดกลืนแสง UV-visible ของสารละลาย CMC-PEG-PVP ที่ผสม  $\text{AgNO}_3$  ด้วยระดับความเข้มข้น Ag เท่ากับ 5000 ppm ก่อนการนำไปขึ้นรูป (A) และสารละลายของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มี Ag ปริมาณความเข้มข้น 5000 ppm ซึ่งผ่านการขึ้นรูปแล้ว (B)

### 3.2.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษของแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลต่อเซลล์

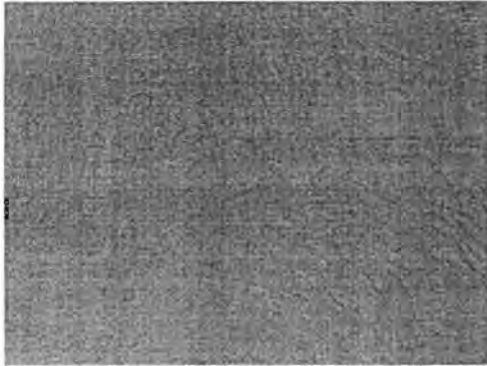
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Human skin fibroblast ATCC CRL 2522 passage โดยใช้วิธี Test on extraction และวัดปริมาณเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay พบว่า แผ่นปิดแผลเกรดการค้ามีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเพียง 5.18% สำหรับแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm นั้น มีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าแผ่นฟิล์มเกรดการค้าคือมีค่าเท่ากับ 49.80% และ 7.36% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า แผ่นฟิล์มที่พัฒนาขึ้นนั้นมีสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าแผ่นปิดแผลเกรดการค้าที่มีโลหะเงินเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีเจือจางสารสกัดจากแผ่นฟิล์มลง 2 เท่า ยังพบว่า แผ่นฟิล์มที่พัฒนาขึ้นมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าแผ่นปิดแผลเกรดการค้าถึง 10 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 3.4

รูปที่ 3.18 แสดงลักษณะเซลล์ Human skin fibroblast ATCC CRL 2522 passage 8 ภายหลังจากบ่มเพาะเซลล์กับสารสกัดจากตัวอย่าง (Extraction vehicle) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะเห็นว่า เซลล์ที่บ่มเพาะด้วยสารสกัดจากตัวอย่างกรณีของตัวอย่างควบคุมและแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ไม่มีอนุภาคเงินจะมีลักษณะเป็น

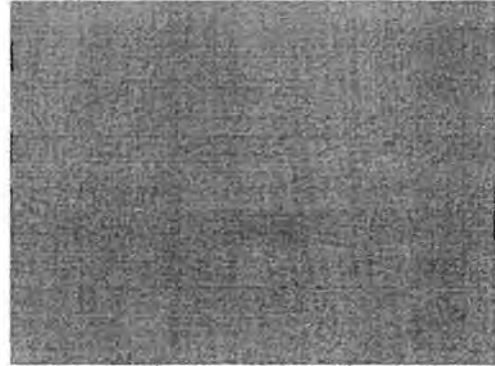
เส้นใยยาวซึ่งแสดงถึงเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนกรณีที่บ่มเพาะด้วยสารสกัดจากตัวอย่างแผ่นฟิล์ม ไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนั้นพบว่า เซลล์ Human skin fibroblast มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากลักษณะเรียวยาวกลายเป็นเม็ดค่อนข้างกลม ซึ่งแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมีปริมาณลดลง ทั้งนี้ ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในกรณีของเซลล์ชุดที่เพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดจากตัวอย่างแผ่นปิดแผลเกรดการต้าและแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินความเข้มข้น 10000 ppm

ตารางที่ 3.4 แสดงค่าร้อยละของเซลล์ human skin fibroblast ATCC CRL 2522 passage 8 ที่มีชีวิต (% viability) ภายหลังเพาะเลี้ยงกับสารสกัดจากตัวอย่าง (Extraction vehicle) และสารสกัดจากตัวอย่างที่ถูกเจือจาง 2 เท่า (2-fold dilution of extraction vehicle) นาน 24 ชั่วโมง

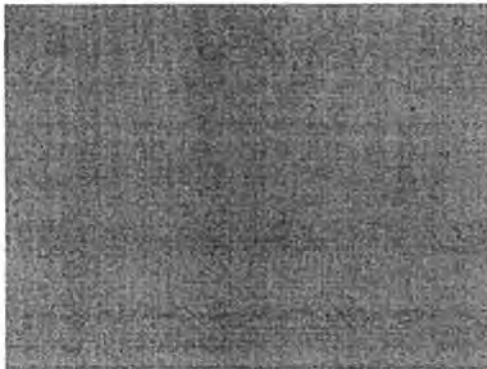
ตัวอย่าง	ค่าร้อยละของเซลล์ human skin fibroblast ที่มีชีวิต (% viability)	
	สารสกัดจากตัวอย่าง	สารสกัดจากตัวอย่างที่ถูกเจือจาง 2 เท่า
Thermanox	102.46	100.30
Blank	41.30	53.98
Hydrogel-Ag 5000 ppm	49.80	64.20
Hydrogel-Ag 10000 ppm	7.36	52.84
Commercial Ag wound dressing	5.18	4.62



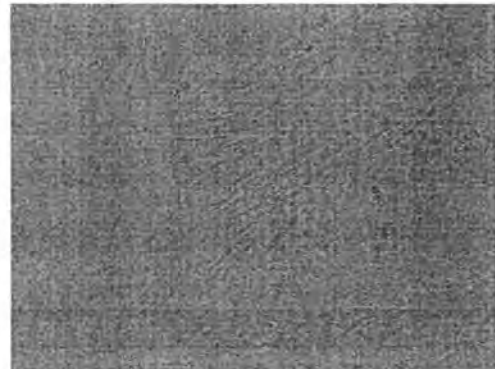
รูปเซลล์ชุดควบคุมที่เลี้ยงกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



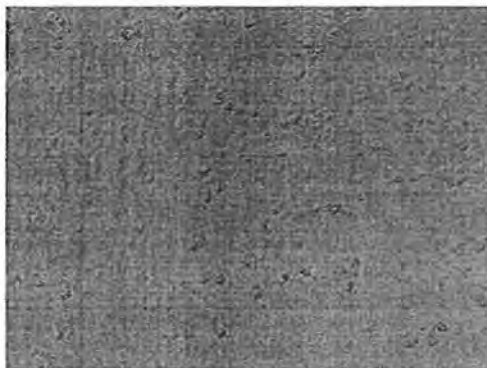
รูปเซลล์ชุดที่เลี้ยงกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ได้แช่ตัวอย่างควบคุม Thermanox<sup>®</sup> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



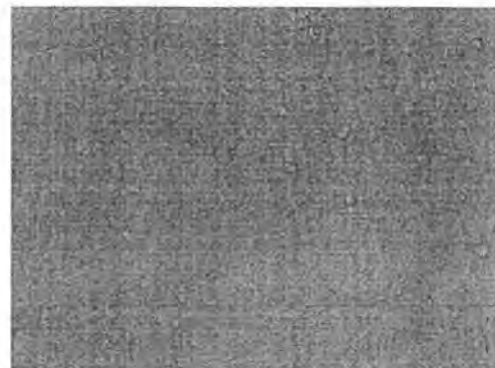
รูปเซลล์ชุดที่เลี้ยงกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ได้แช่ชิ้นงานแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่ไม่มีอนุภาคเงิน (Blank) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปเซลล์ชุดที่เลี้ยงกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ได้แช่ชิ้นงานแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงิน ความเข้มข้น 5000 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปเซลล์ชุดที่เลี้ยงกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ได้แช่ชิ้นงานแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงิน ความเข้มข้น 10000 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปเซลล์ชุดที่เลี้ยงกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ได้แช่ตัวอย่าง Commercial Ag wound dressing เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รูปที่ 3.18 รูปร่างลักษณะของเซลล์ Human skin fibroblast ที่ใช้ทดสอบ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงกับสารสกัดจากตัวอย่าง (อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM) ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

การเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทำได้โดยเตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส พอลิเอธิลีนไกลคอล พอลิไวนิลไพโรลิโดน ซิลเวอร์ไนเตรท และใช้กรดซิทรिकเป็นสารเชื่อมโยงพันธะ จากนั้นจึงทำการขึ้นรูปด้วยวิธีหล่อแบบ ทำให้แห้งและอบผนึก

จากการทดลองพบว่า นอกจากจะมีพันธะเอสเทอร์เกิดขึ้นระหว่างคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสกับกรดซิทรिकแล้ว ยังมีอันตรกิริยาเกิดขึ้นระหว่างพอลิไวนิลไพโรลิโดนกับกรดซิทรिकด้วย ซึ่งมีผลทำให้แผ่นฟิล์มไฮโดรเจลมีการดูดซับน้ำลดลง ในขณะที่มีความแข็งแรงสูงขึ้น ส่วนการเพิ่มปริมาณพอลิเอธิลีนไกลคอลนั้นมีผลทำให้แผ่นฟิล์มมีการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้น

ในกรณีที่ยังไม่มีการเติมอนุภาคนั้นพบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจล CMC คือ การใช้สารละลาย CMC ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมร่วมกับ PVP, PEG และกรดซิทรिकที่ความเข้มข้น 1%, 2% และ 5% โดยน้ำหนักของ CMC ตามลำดับ และใช้วิธีการอบผนึกที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที ซึ่งพบว่า แผ่นฟิล์มดังกล่าวมีค่าการดูดซับน้ำภายหลังการแช่แผ่นฟิล์มในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1258% ค่าการละลาย 44% โดยมีค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงขณะแห้งเท่ากับ 78.71 MPa ขณะเปียกเท่ากับ 1.92 MPa และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยึดตัวขณะแห้งเท่ากับ 9.28% และขณะเปียกเท่ากับ 76.8%

สำหรับการเตรียมไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนั้น สามารถใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปีตรวจสอบยืนยันได้ว่าการเกิดอนุภาคนั้นภายในไฮโดรเจลจากปฏิกิริยารีดักชันของซิลเวอร์ไอออน ทั้งนี้การมีอนุภาคนั้นเป็นองค์ประกอบในแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลมีผลทำให้ค่าการดูดซับน้ำและค่าความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มลดลง อย่างไรก็ตามจากการทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีอนุภาคนั้นเป็นองค์ประกอบที่ระดับความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งมีค่าการดูดซับน้ำภายหลังการแช่แผ่นฟิล์มในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 828% และ 753% ตามลำดับนั้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* เชื้อ *E.coli* และเชื้อ *P.aeruginosa* ได้ดี ในขณะที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าแผ่นปิดแผลเกรดการค้าที่มีโลหะเงินเป็นองค์ประกอบ



### บรรณานุกรม

1. กนกวรรณ แสงเกียรติยุทธ, ปราณีย์ รัตนวลิตโรจน์ และ ธนิต สิงหนุญพงษ์. 2553. การเตรียมแผ่นฟิล์มไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนาโน. รายงานวิจัย. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. Anbergen, U. and Oppermann, W. Elasticity and swelling behaviour of chemically crosslinked cellulose ethers in aqueous systems. Polymer 31 (1990): 1854-1858.
3. Bhui, D.K., Bar, H., Sarkar, P., Sahoo, G.P., De, S.P., Misra, A. Synthesis and UV-vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. Journal of Molecular Liquids 145 (2009): 33-37.
4. Cho, K.H., Park, J.E., Osaka, T. and Park, S.G. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochimica Acta 51 (2005): 956-960.
5. Chou, K.S., and Ren, C.Y. Synthesis of nanosized silver particles by chemical reduction method. Materials Chemistry and Physics 64 (2000): 241-246.
6. Dunn, K., and Edwards-Jones, V. The role of Acticoat<sup>TM</sup> with nanocrystalline silver in the management of burns. Burns 30 (2004): 51-59.
7. Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N. and Kim, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Research 52 (2000): 662-668.
8. Henglein, A. Reduction of  $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$  on silver and platinum colloidal nanoparticles. Langmuir 17 (2001): 2329-2333.
9. Kowalonek, J., Kaczmarek, H. Studies of pectin/polyvinylpyrrolidone blends exposed to ultraviolet radiation. European Polymer Journal 46 (2010): 345-353.
10. Lin, O.H., Kumar, R.N., Rozman, H.D., and Mohd. Noor, M.A. Grafting of sodium carboxymethylcellulose (CMC) with glycidyl methacrylate and development of UV curable coatings from CMC-g-GMA induced by cationic photoinitiators. Carbohydrate Polymers 59 (2005): 57-69.
11. Liu, P., Peng, J., Li, J., and Wu, J. Radiation crosslinking of CMC-Na at low dose and its application as substitute for hydrogel. Radiation Physics and Chemistry 72 (2005): 635-638.

12. Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., and Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16 (2005): 2346-2353.
13. Pourjavadi, A., Harzandi, A.M., and Hosseinzadeh, H. Modified carrageenan 3. Synthesis of a novel polysaccharide-based superabsorbent hydrogel via graft copolymerization of acrylic acid onto kappa-carrageenan in air. European Polymer Journal 20 (2004): 1363-1370.
14. Saengkiattiyut, K., Rattanawaleedirojn, P., and Sangsuk, S. A study on antimicrobial efficacy of nano silver containing textile. CMU. J. Nat. Sci. Special Issue on Nanotechnology 7(1) (2008): 33-36.
15. SonDI, I., Goia, D.V., and Matijević, E. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. Journal of Colloid and Interface Science 260 (2003): 75-81.
16. SonDI, I. and Salopek-SonDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science 275 (2004): 177-182.
17. Starowicz, M., Stypula, B., and Banaś, J. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. Electrochemistry Communications 8 (2006): 227-230.
18. Vloemans, A.F.P.M., Soesman, A.M., Kreis, R.W., and Middelkoop, E. A newly developed hydrofibre dressing, in the treatment of partial-thickness burns. Burns 27 (2001): 167-173.
19. Wach, R.A., Mitomo, H., Nagasawa, N., and Yoshii, F. Radiation crosslinking of carboxymethylcellulose of various degree of substitution at high concentration in aqueous solutions of natural pH. Radiation Physics and Chemistry 68 (2003): 771-779.
20. Wang, W., Wang, Q., Wang, A. pH-responsive carboxymethylcellulose-g-poly(sodium acrylate)/polyvinylpyrrolidone semi-IPN hydrogels with enhanced responsive and swelling properties. Macromolecular Research 19 (2011): 57-65.
21. Zielinska, A., Skwarek, E., Zaleska, A., Gazda, M., and Hupka, J. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. Procedia Chemistry 1 (2009): 1560-1566.
22. <http://silverlon.com>
23. <http://www.bbraun.com>

## ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย)	นางสาวกนกวรรณ แสงเกียรติยุทธ
(ภาษาอังกฤษ)	Miss Kanokwan Saengkiattiyut
เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน	3 6099 00004 81 6
ตำแหน่งปัจจุบัน	นักวิจัย (ชำนาญการ) ระดับ 8

## หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้

สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 ซอยจุฬาลงกรณ์ 12 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่  
 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
 โทร. 0-2218-4233, 0-2218-4209 โทรสาร 0-2611-7586  
 e-mail : kanokwan.s@chula.ac.th

## ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	วัสดุศาสตร์	พ.ศ. 2538
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต	วิศวกรรมโลหการ	พ.ศ. 2542

## สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- การกัดกร่อนและการป้องกันการกัดกร่อนของโลหะ และวิธีการตรวจวิเคราะห์ความต้านทานการกัดกร่อนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี และเครื่องทดสอบการกัดกร่อนแบบตะอองเกลือ
- การเตรียมอนุภาคเงินระดับนาโน

## ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก

## ผลงานวิจัย

- พ.ศ. 2548 “การเตรียมผ้าไหมสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอนุภาคเงินระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2” แหล่งทุน สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาฯ (นักวิจัยร่วม โครงการ)
- พ.ศ. 2549 “การพัฒนาผ้าดักป้องกันแบคทีเรียด้วยนาโนวิศวกรรมนาโนซิลเวอร์” แหล่งทุน สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ ร่วมกับ บริษัทยูไนเต็ด เท็กซ์ไทล์มิลส์ จำกัด (นักวิจัยร่วม โครงการ)

- พ.ศ. 2550 “ผลของการเตรียมผิวต่อความต้านทานการกัดกร่อนของเหล็กกล้าไร้สนิม” แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2549 (หัวหน้าโครงการ)
- พ.ศ. 2551 “การพัฒนากระบวนการชุบสังกะสีแบบจุ่มร้อนปราศจากการใช้ฟลักซ์ด้วยวัสดุเคลือบโลหะโครงสร้างนาโน” แหล่งทุน สถาบันเหล็กและเหล็กกล้าแห่งประเทศไทย (นักวิจัยร่วมโครงการ)
- พ.ศ. 2551 “การเตรียมผ้าพันแผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอนุภาคเงิน” แหล่งทุน สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาฯ (นักวิจัยร่วมโครงการ)
- พ.ศ. 2552 “การพัฒนากระบวนการชุบสังกะสีแบบจุ่มร้อนปราศจากการใช้ฟลักซ์ด้วยวัสดุเคลือบโลหะโครงสร้างนาโน ปีที่ 2” แหล่งทุน สถาบันเหล็กและเหล็กกล้าแห่งประเทศไทย (นักวิจัยร่วมโครงการ)

#### ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่

- **Kanokwan Saengkiattiyut** , Sutthirat Lisnunt and Goboorn Logthongkum, “Effects of Sodium Phosphate and Sodium Sulphate on Corrosion Resistance of AISI 316L Stainless Steel in 3.5 wt% Sodium Chloride Solution” Journal of Metals, Materials and Minerals, 14(1)(2004): 33-38.
- **Kanokwan Saengkiattiyut**, Pranee Rattanawaleedirojn and Supin Sangsuk. A Study on Antimicrobial Efficacy of Nano Silver Containing Textile. CMU. J. Nat. Sci. Special Issue on Nanotechnology 7(1) (2008): 33-36.
- Pranee Rattanawaleedirojn, **Kanokwan Saengkiattiyut** and Supin Sangsuk. Antibacterial Efficacy of Nano Silver Finished Fabric on *Staphylococcus aureus* and Preliminary Test on Its Safety. CMU. J. Nat. Sci. Special Issue on Nanotechnology 7(1) (2008): 75-79.
- Y. Boonyongmaneerat, **K. Saengkiattiyut**, S. Saenapitak, and S. Sangsuk, “Effects of WC addition on structure and hardness of electrodeposited Ni-W,” Surface & Coatings Technology 203(2009): 3590-4.
- Y. Boonyongmaneerat, S. Saenapitak, and **K. Saengkiattiyut**, “Reverse pulse electrodeposition of Zn-Ni alloys from a chloride bath,” Journal of Alloys and Compounds 487(2009): 479-482.

ผลงานวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

- **Kanokwan Saengkiettiyut**, Sutthirat Lisnunt and Weera Chukrachan, "A corrosion inhibition study of stainless steel by chromate or phosphate in sodium chloride solution", 3<sup>rd</sup> Thailand Materials Science and Technology Conference, August 2004, Thailand.
- **Kanokwan Saengkiettiyut** , Pranee Rattanawaleedirojn and Adisak Thueploy "Effect of nitric acid treatment on pitting corrosion resistance of stainless steel" The 1<sup>st</sup> Thailand Metallurgy Conference, October 15-16,2007, Thailand.
- **Kanokwan Saengkiettiyut**, Charttanong Angkaprasert, Pranee Rattanawaleedirojn, Sawalee Saenapitak, Adisak Thueploy,Jumpot Wanichsampan, Sutthirat Lisnunt, Nutthita Chuankrerkkul, Yuttanant Boonyongmaneerat. "Corrosion Resistance of Hot-Dip Galvanized Steels in Saline and Swine Urine Environments" The 2<sup>nd</sup> Thailand Metallurgy Conference, October ,2008, Thailand.
- Yuttanant Boonyongmaneerat, **Kanokwan Saengkiettiyut** Charttanong Angkaprasert, Pranee Rattanawaleedirojn, Nutthita Chuankrerkkul, Jumpot Wanichsampan, Sawalee Saenapitak, Adisak Thueploy, , Run Sa-nguan-moo. "Effects of Surface Pretreatment in Hot-Dip Galvanizing Process" The 2<sup>nd</sup> Thailand Metallurgy Conference, October ,2008, Thailand.
- **Kanokwan Saengkiettiyut** , Pranee Rattanawaleedirojn, Adisak Thueploy and Weera Chukrachan. "Effects of surface finishing methods on corrosion resistance of aluminium alloy" Third International Conference Processing Materials for Properties, August 11, 2009, Thailand.

2. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวปราณี รัตนวลีดิโรจน์  
(ภาษาอังกฤษ) Miss Pranee Rattanawaleedirojn

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 4099 00505 89 2

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย (ชำนาญการ) ระดับ 8

#### หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อกได้

สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ชอยจุฬาลงกรณ์ 12 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่  
เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
โทร. 0-2218-4221, 0-2218-4209 โทรสาร 0-2611-7586  
e-mail : pranee.r@chula.ac.th

#### ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	เคมี	พ.ศ. 2536
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	วิทยาศาสตร်พอลิเมอร์ประยุกต์ และเทคโนโลยีสิ่งทอ	พ.ศ. 2539

#### สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- การตกแต่งสำเร็จสิ่งทอ
- การสังเคราะห์พอลิเมอร์จากวัสดุธรรมชาติ

#### ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก

##### ผลงานวิจัย

- พ.ศ. 2548 “การเตรียมผ้าให้มีสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอนุภาคเงินระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2” แหล่งทุน สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาฯ (หัวหน้าโครงการ)
- พ.ศ. 2549 “การพัฒนาผ้าถักที่มีสมบัติป้องกันแบคทีเรียด้วยนวัตกรรมนาโนซิลเวอร์” แหล่งทุน สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ ร่วมกับ บริษัท ยูไนเต็ทเท็กซ์ไทล์มีลส์ จำกัด (หัวหน้าโครงการ)

- พ.ศ. 2549 “ผลของการเตรียมผิวต่อความต้านทานการกัดกร่อนของเหล็กกล้าไร้สนิม” แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (นักวิจัยร่วมโครงการ)
- พ.ศ. 2551 “การพัฒนากระบวนการชุบสังกะสีแบบจุ่มร้อนปราศจากการใช้ฟลักซ์ด้วยวัสดุเคลือบโลหะโครงสร้างนาโน” แหล่งทุน สถาบันเหล็กและเหล็กกล้าแห่งประเทศไทย (นักวิจัยร่วมโครงการ)
- พ.ศ. 2551 “การเตรียมผ้าพื้นผลยขั้ยงเชื่อมจูลินทรียด์ด้วยอนุภาคเงิน” แหล่งทุน สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาฯ (หัวหน้าโครงการ)
- พ.ศ. 2552 “การพัฒนากระบวนการชุบสังกะสีแบบจุ่มร้อนปราศจากการใช้ฟลักซ์ (ปีที่ 2)” แหล่งทุน สถาบันเหล็กและเหล็กกล้าแห่งประเทศไทย (นักวิจัยร่วมโครงการ)

#### ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

- ปรานี รัตนวดีดิโรจน์. บทบาทของโคติน-ไลโคซานในงานวิจัยสิ่งทอ. *Colourway*. 2547. ปีที่ 9 ฉบับที่ 50 หน้า 43-45.
- Rattanawaleedirojn, P., Saengkiattiyut, K., and Sangsuk, S. (2008). Antibacterial Efficacy of Nano Silver Finished Fabric and Preliminary Test on Its Safety. *CMU. J. Nat. Sci. Special Issue on Nanotechnology* 7(1), pp. 75-79.
- Saengkiattiyut, K., Rattanawaleedirojn, P., and Sangsuk, S. (2008). A Study on Antimicrobial Efficacy of Nano Silver Containing Textile. *CMU. J. Nat. Sci. Special Issue on Nanotechnology* 7(1), pp. 33-36.

#### ผลงานวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

- Rattanawaleedirojn, P., Siraleartmukul, K., Lisnunt, S., and Srikulkit, K. Utilization of citric acid and chitosan as finishing agent for cotton fabric. 28<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, Oct. 24-26, p.642. Thailand, 2002.
- Kanokwan Saengkiattiyut, Charttanong Angkaprasert, Pranee Rattanawaleedirojn, Sawalee Saenapitak, Adisak Thueploy, Jumpot Wanichsampan, Sutthirat Lisnunt, Nutthita Chuankrerkkul, Yuttanant Boonyongmaneerat. “Corrosion

Resistance of Hot-Dip Galvanized Steels in Saline and Swine Urine Environments” The 2<sup>nd</sup> Thailand Metallurgy Conference, October, 2008, Thailand.

- Yuttanant Boonyongmaneerat, Kanokwan Saengkiattiyut Charttanong Angkaprasert, **Pranee Rattanawaleedirojn**, Nutthita Chuankrerkkul, Jumpot Wanichsampan, Sawalee Saenapitak, Adisak Thueploy, , Run Sa-nguan-moo. “Effects of Surface Pretreatment in Hot-Dip Galvanizing Process” The 2<sup>nd</sup> Thailand Metallurgy Conference, October ,2008, Thailand.
- Kanokwan Saengkiattiyut , **Pranee Rattanawaleedirojn**, Adisak Thueploy and Weera Chukrachan. “Effects of surface finishing methods on corrosion resistance of aluminium alloy” Third International Conference Processing Materials for Properties, August 11, 2009, Thailand.



3. ชื่อ (ภาษาไทย) นายธนิต สิงหนุญพงษ์  
(ภาษาอังกฤษ) Mr.Thanit Singhaboonpong

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1002 00159 20 1

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ

ถนนพญาไท แขวงวังใหม่

เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทร. 0-2218-5097 โทรสาร 0-2252-7576

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	ก.ศบ.	เคมี	2522

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคนิคเบื้องต้นทางจุลชีววิทยาและวิธีทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ภาคผนวก

## PREPARATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES STABILIZED BY POLYVINYLPIRROLIDONE

Kanokwan Saengkiettiyut<sup>1,\*</sup>, Pranee Rattanawaleedirojn,<sup>1</sup> Tanit Singhaboonpong<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>2</sup> Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

\*e-mail: kanokwan.s@chula.ac.th

**Abstract:** Silver nanoparticles were synthesized by reduction of silver nitrate with polyethyleneglycol (PEG) as reducing agent. Effects of concentration of stabilizer, polyvinyl pyrrolidone (PVP), were investigated. UV-Vis spectrum for colloidal silver solutions showed a strong plasmon band which confirmed silver nanoparticles in the aqueous phase. The information of silver particles was also provided by electron microscopy technique. The results showed that diameter size of silver particles was in a range of 10-50 nm. Antimicrobial studies indicated that these nanoparticles were very active as antimicrobial agents.

**Introduction:** The area of silver nanoparticles research has tremendous growth during the past few decades. The considerable interests are related to the multifunctional characteristic of silver nanoparticles. It has a broad application in various fields such as catalysts, biosensors, solar cell [1, 2, 3].

There is a wide variety of silver nanoparticles preparation techniques, such as chemical reduction, electrochemical reduction, photochemical reduction, radiation chemical reduction, gas condensation, thermal decomposition, sonochemical deposition and nanostructured templates. One of the popular preparation methods is chemical reduction because of its convenient operation and simple equipments needed. Compared with the major reducing agents reported to date, such as ascorbic acid, citrate, hydrazine and sodium borohydride, ethylene glycol is an environmentally benign material. Ethylene glycol and polyols, including polyethylene glycol, have been widely used by many researchers through the so-called polyol process at high temperature. For example, Luo et al. [4] specified the synthesis of silver nanoparticles with sizes in the range from 5 to 10 nm by reduction of silver nitrate in PEG (MW 2000) at 80°C for 1 hr. The main problem of silver particles preparation process is the stability of the formed nanoparticles. It is possible to manipulate the shape and size of silver nanoparticles by using protecting agents, such as polyvinyl pyrrolidone (PVP), polyvinyl alcohol (PVA), sodium dodecylsulphate (SDS), cetyltrimethyl ammonium chloride (CTAC). Although PVP, as an excellent dispersant, was used in combination with a number of reducing agents, there are few reports about PVP in polyol route. In this work, the synthesis of silver particles using silver nitrate with PEG as a reducing agent and PVP as a stabilizer was studied. The obtained colloidal silver solutions were characterized by UV-visible spectroscopy, zetasizer, TEM and their antimicrobial activities were evaluated.

**Methodology:** The silver colloid was prepared by chemical reduction method. All solutions of reacting materials were prepared in distilled water. PEG solution was prepared by dissolving 4 g of PEG (MW 4000) in 10 ml of distilled water. The solution was heated up to 80 °C with magnetic stirred. Then 10 ml of 1% (w/v) silver nitrate solution was added in the PEG solution. The resulting solution was magnetic stirred at this temperature for 30s. PVP solution which was separately prepared by dissolved 0.4 g or 0.8 g (equal to 1.6% or 3.2% (w/v) of total volume of the mixture) of PVP in 5 ml of distilled water was added into the

solution mixture. The reaction was carried out under continuously magnetic stirring at 80 °C for 20 min. At the end of reaction time, the solution mixture was suddenly cooled to room temperature and distilled water was added to adjust the total volume of solution to 25 ml.

The absorption characteristics of samples in the range of 250-700 nm were studied by using UV-vis spectrophotometer (Analytikjena, specord S100). The average particle sizes of the samples were measured on Malvern Instruments Zetasizer 4. The size and the morphology of the particles were examined by transmission electron microscope (TEM). The antimicrobial properties of silver solutions were quantitatively evaluated against *Staphylococcus aureus* according to AATCC 100 test method. The antimicrobial activity was expressed in term of percentage reduction of the organism after a contact with the test specimen compared to the number of bacterial cells surviving after contact with the control. The percentage reduction was calculated by using the following equation,

$$\% R = [(B-A)/B]*100$$

where R is the percentage reduction of bacteria, B is a number of bacterial colonies from control specimen after 0 hr contact time, and A is a number of bacterial colonies from treated specimen after 24 hrs contact time.

## **Results, Discussion and Conclusion:**

### Effect of PVP concentration

In the system without PVP addition, it was found that the mixture solution of silver nitrate and polyethylene glycol at 80°C appeared yellow color after 5 minute of reduction. After 20 minute the solution turned into grayish brown cloud and finally formed dark grey precipitate.

When PVP was used as stabilizing agent, the solution was stable in clear yellow color without precipitate. It could be observed that the yellow color of the solution with 3.2% PVP was lighter than at 1.6% PVP. This indicated that PEG could gradually reduced silver ion to silver particles. For longer time of reaction, the coalescence of particles was developed and larger particles were formed. Addition of PVP at the very beginning reaction process might provide some barrier to slow down the agglomeration process.

### UV-Vis Spectroscopic study

To characterize the silver colloids, the UV-vis spectra analysis was performed (Figure 1). Compare to the UV-vis curve of silver ion solution, when only PEG was exposed to silver ion, the main peak at 450 which corresponded to the dipole resonance of silver nanoparticles was appeared [4]. However, the shoulder at 527 nm implied the particles agglomeration and/or increase in particle size [5]. In the case of 1.6% PVP addition at the beginning of reduction reaction, a symmetric blue-shifted peak at 424 nm was observed. The change of peak indicated that the finer with rather spherical particles were formed. At higher concentration of PVP, the wide and low intensity band with 435 nm maxima was detected which indicated that a lot of small particles had been fabricated [6]. This was explained to be the stabilizing effect of PVP by generating a covered layer on the silver particles to inhibited agglomerations process [7].

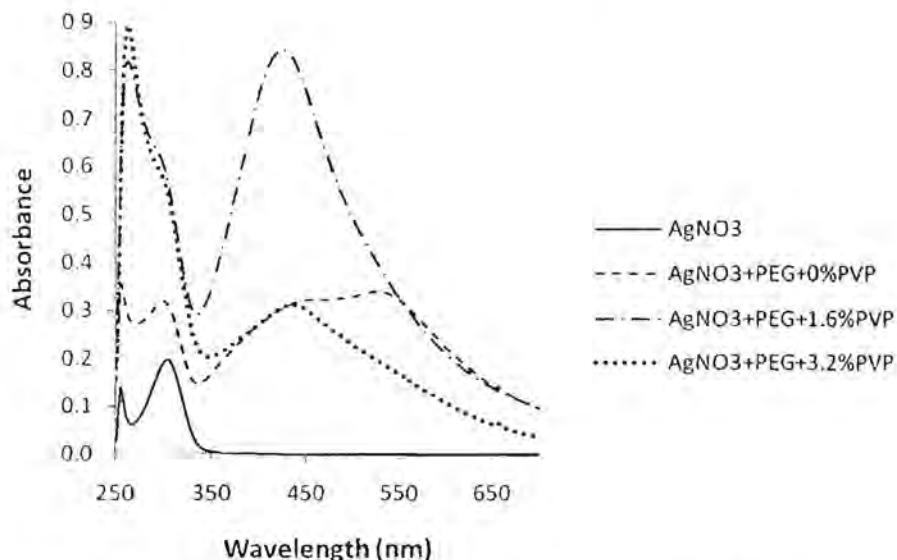


Figure 1. Absorbance spectra of silver colloidal solutions with different PVP concentrations.

#### Particles size analysis

It was found that the as-prepared products were nanoscale particles. With increase in the concentration of PVP, the particles size decreased from 64 to 50 nm. However, larger particles were also detected in the blank solution which contained only PEG and 1.6% PVP. Thus, the particles size of the products should be reconfirmed by other analysis techniques.

Table 1. Average particle size of synthesized silver particles.

Sample	Particle size (nm)					Average particle size (nm)
	1	2	3	4	5	
Blank	463.9	485.8	112.0	159.8	93.4	263.0±195.1
1.6% PVP	83.4	61.8	60.1	58.9	57.2	64.3±10.8
3.2% PVP	66.6	48.5	47.9	43.4	43.7	50.0±9.6

#### Morphology of the particles

TEM micrograph (Figure 2) presented that the silver nanoparticles prepared by reduction of silver nitrate with PEG and using 1.6% PVP as stabilizer were in irregular shapes. The diameter of the particles was in a range of 10-50 nm. The EDS spectrum of the particles showed obvious signals of silver at around 3 keV in addition to the copper signals from the TEM copper grid.

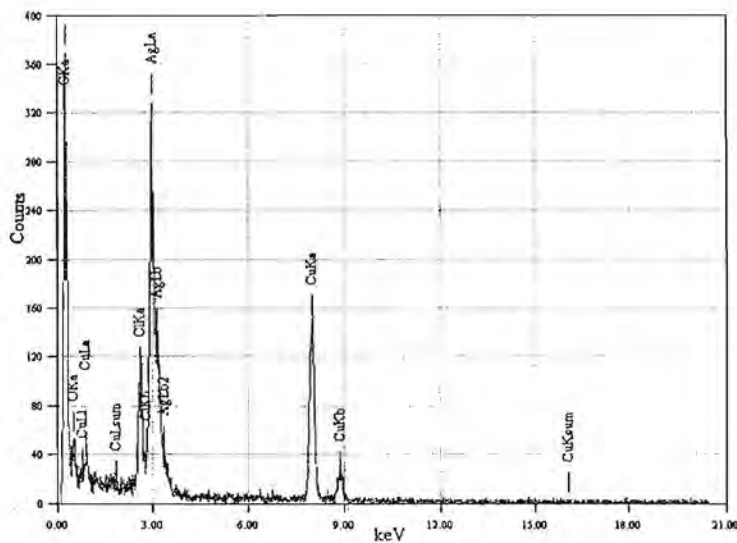
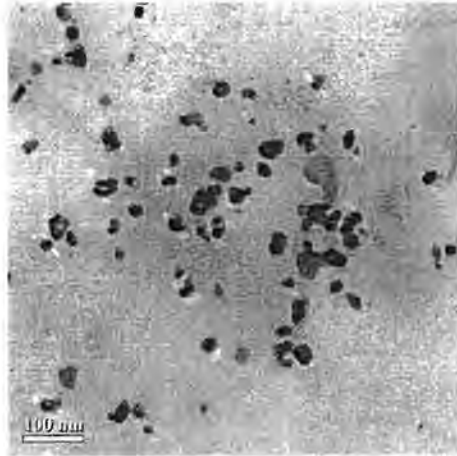


Figure 2. TEM micrograph of silver nanoparticles.

### Antimicrobial activities

The antimicrobial activity tests were performed against *Staphylococcus aureus* at various concentrations of silver. From the results in Table 2, it was evident that the synthesized silver particles, even at low concentration (25 ppm), were capable of inhibiting *S.aureus* with activity as high as 99.99%. The inhibition efficiency results of silver particles obtained by using 1.6% PVP were not different from those of using 3.2% PVP.

Table 2. Antimicrobial activities of silver colloid against *Staphylococcus aureus*.

Concentration of PVP (%)	Concentration of Ag (ppm)	Reduction of bacteria (%)
1.6	25	99.99
	50	100
	100	100
3.2	25	99.99
	50	100
	100	100

In conclusions, silver nanoparticles were prepared by chemical reduction method using polyethyleneglycol (PEG) as a reducing agent and polyvinylpyrrolidone (PVP) as a stabilizer. PVP in colloidal solution leads to protect silver nanoparticles from growth and agglomeration. The size of silver particles was about 10-50 nm. The antimicrobial studies showed that the silver particles were capable of inhibiting *S.aureus* with activity as high as 99.99%.

#### References:

1. Vaškelis, A., Aldona Jagminienė, A., Tamašauskaitė–Tamašiūnaitė, L., and Juškėnas, R. (2005) *Electrochim. Acta* **50**, 4586-4591.
2. Zhu, S., Du, C., and Fu, Y. (2009) *Opt. Mater.* **31**, 769-774.
3. Yiwei, A., Yunxia, Y., Shuanglong, Y., Libua, D., Guorong, C. (2007) *Mater. Chem. Phys.* **104**, 158-161.
4. Luo, C., Zhang, Y., Zeng, X., Zeng, Y., and Wang, Y. (2005) *J. Colloid. Interface Sci.* **288**, 444-448.
5. Popa, M., Pradell, T., Crespo, D., and Calderón-Moreno, J.M. (2007) *Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects* **303**, 184-190.
6. Krylova, G., Eremenko, A., Smirnova, N., Eustis, S. (2005) *Int. J. Photoenergy* **7**, 193-198.
7. Wang, H., Qiao, X., Chen, J., Wang, X., and Ding, S. (2005) *Mater. Chem. Phys.* **94**, 449-453.

#### Acknowledgements:

The authors gratefully acknowledge the financial support of general subsidies from the Thai government.

**Keywords:** silver, nanoparticles, polyvinylpyrrolidone, antimicrobial

## Preparation and Properties of Carboxymethyl Cellulose Hydrogels Chemically Crosslinked by Citric Acid

Pranee Rattanawaleedirojn<sup>1,\*</sup>, Kanokwan Saengkiattiyut<sup>1</sup>, and Tanit Singhaboonpong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok  
10330, Thailand

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok  
10330, Thailand

\*Corresponding author: pranee.r@chula.ac.th

**Abstract:** *In this work, carboxymethyl cellulose hydrogels were prepared by chemical crosslinking method using citric acid. The hydrogel films were cast from aqueous polymer solutions and the influence of the concentration of crosslinking agent and curing condition were studied. The Fourier transform infrared analysis indicated the formation of ester linkage between hydroxyl group of carboxymethyl cellulose and carboxylic group of citric acid. It was found that the hydrogel film having the optimal characteristics of water absorption, water solubility and mechanical properties could be achieved when carboxymethyl cellulose with 5% citric acid was used and cured at 160 °C for 120 seconds.*

**Keywords:** hydrogel, carboxymethyl cellulose, citric acid

### 1. INTRODUCTION

Hydrogels are water swellable, network polymers synthesized from hydrophilic monomer polymerization or crosslinking of the preformed polymers. Because of their tissue-like high water content and elastic properties, hydrogels have received considerable attention to be used in many applications, such as biomedical devices, wound dressing and controlled release of drug. In such applications, the biodegradable and biocompatible polymers are usually desired. Thus, a number of superabsorbent polymers with those properties have been developed. Among them, a water-soluble cellulose derivative, namely carboxymethyl cellulose (CMC), has reported to be one of the ideal materials for hydrogel preparation. Several methods were studied to prepare CMC hydrogels, including metal ion crosslinking <sup>[1]</sup> and radiation method <sup>[2]</sup>. In this work, we focused on hydrogels fabricated from CMC by using citric acid, a non-toxic and low cost chemical, as crosslinking agent and the properties of the formed CMC hydrogels were investigated.

### 2. EXPERIMENTAL

#### 2.1 Materials

Carboxymethyl cellulose (CMC,  $M_w = 250,000$ ) was supplied by Sigma-Aldrich Co. Citric acid monohydrate (CA) was purchased from Ajax Finechem Pty. Ltd. These chemicals were analytical grade and used as received.



## 2.2 Method

The CMC solution was prepared by dissolving 6 g of CMC powder in 300 ml of distilled water and mechanically stirred at speed of 500 rpm for 1 h. Citric acid, as crosslinking agent, was added to the solution (1-7% on weight of CMC). The dissolved solution was then cast onto a levelled acrylic mould (size: 25 x 0.6 x 25 cm). The casting was dried at ambient condition. After peeled off the mould, the film was cured at a specified temperature and time using Labtec laboratory mini-dryer, model M-3.

## 2.3 Characterization

### 2.3.1 Determination of swelling values

The test specimen was cut into 4 x 4 cm sized piece, weighed and then immersed into 50 ml of distilled water at room temperature for 24 h. The excess water on the surface of the specimen was removed by blotting with filter paper. The weight of swollen specimen was measured.

$$\text{Water absorption \%} = [(W2-W1)/W1] \times 100 \quad (1)$$

Where W1 is the initial weight of the specimen, and W2 is the final weight after immersion in water.

### 2.3.2 Water solubility

The test specimen was cut into 4 x 4 cm sized piece and weighed. The specimen was placed in a beaker containing 50 ml of distilled water at room temperature for 24 h. Undissolved dry matter was determined by removing the specimen piece from the beaker and then oven dried at 105°C for 24 h.

$$\text{Water solubility \%} = [(W1-W2)/W1] \times 100 \quad (2)$$

Where W1 is the initial weight of the specimen, and W2 is the weight of the undissolved dried specimen after immersion in water.

### 2.3.3 FT-IR analysis

Infrared spectra of the samples were examined using Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR: Perkin-Elmer, Spectrum One). The films were applied onto the ZnSe flat plate and scanned from 650 to 4000 cm<sup>-1</sup> at 4 cm<sup>-1</sup> resolution.

### 2.3.4 Mechanical properties test

Tensile strength and elongation of the rectangular specimens (12.0 x 1.0 cm) were measured according to ASTM D882-02 using Instron universal tester, model 5583. Initial grip separation was set at 50 mm and cross-head speed was set at 10 mm/min. The properties data were averaged over five specimens.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 FT-IR analysis

FT-IR spectra of the unmodified CMC and the crosslinked CMC are shown in Fig. 1. The CMC exhibited the following characteristic bands: (a) broad band at 3240 cm<sup>-1</sup> due to -OH stretching of anhydroglucose units; (b) C-H stretching absorption band at 2919 cm<sup>-1</sup>; (c)

absorption bands at 1584 and 1411  $\text{cm}^{-1}$  attributed to asymmetric and symmetric stretching of carboxylate group<sup>[3]</sup>. In the case of CMC with CA addition, the appearances of new peak at 1725  $\text{cm}^{-1}$  which increased with CA concentration was observed. This absorption peak was related to C=O stretching band of ester carbonyl group<sup>[4]</sup> and gave supporting evidence for esterification crosslinking between carboxylic group of citric acid and hydroxyl group of CMC (Fig. 2).

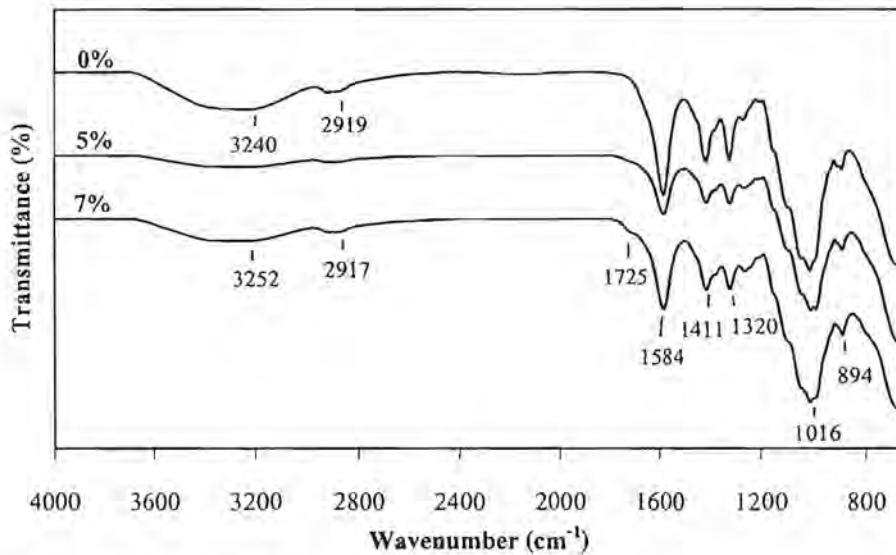


Fig. 1 FT-IR spectra of CMC hydrogels prepared by using various concentrations of CA after cured at 160°C for 90 seconds.

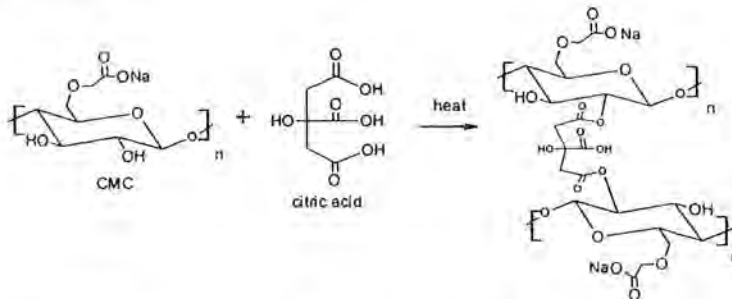


Fig. 2 Esterification reaction between CMC and citric acid.

### 3.2 Water absorption and water solubility

The effect of citric acid concentration on the water absorption and water solubility of hydrogel CMC after curing at 160°C for 90 seconds was summarized in Fig. 3. The data showed that at low concentration of CA ( $\leq 3\%$ ), the CMC films were still highly water soluble. At 5% CA, the transparent, highly swollen hydrogel film was formed. The value of water absorption was 2,600% with 57% solubility after 24 h of water immersion. When the amount of CA was increased to 7%, the water absorption property of the hydrogel was remarkably decreased.

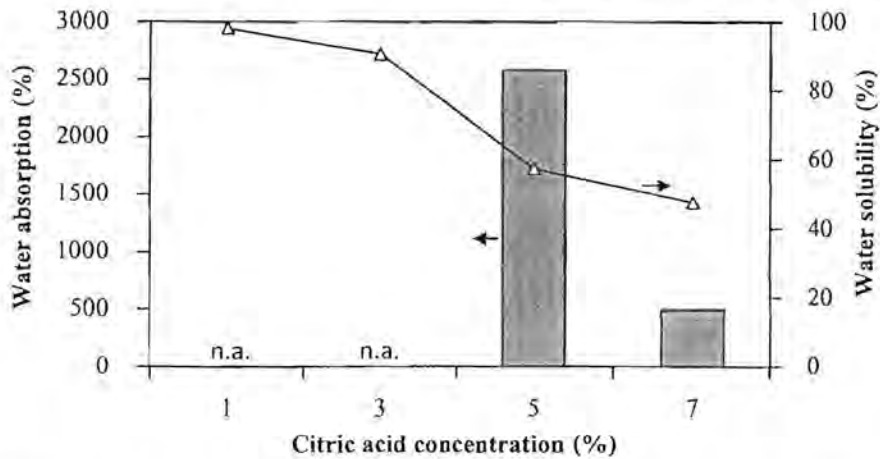


Fig. 3 Effect of citric acid concentration on water absorption and water solubility of CMC hydrogel films after cured at 160°C for 90 seconds.

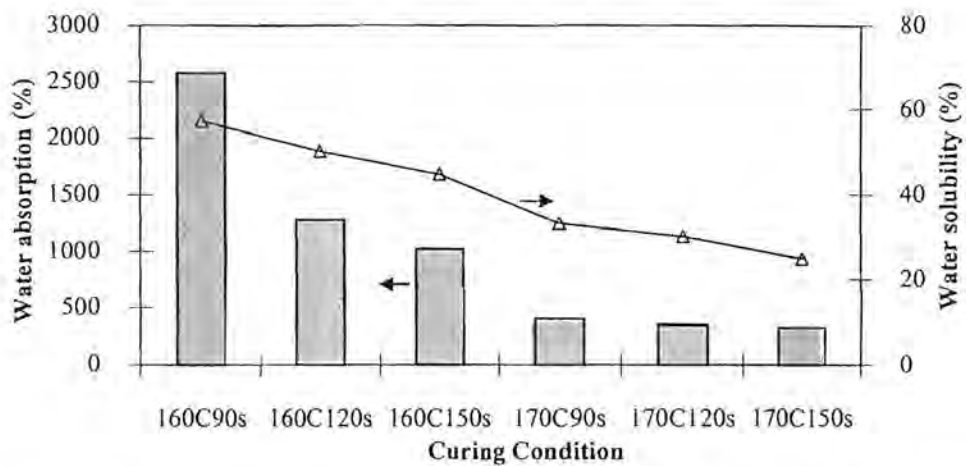


Fig. 4 Effect of curing condition on water absorption and water solubility of CMC hydrogel films prepared by using 5%CA.

The effect of curing condition on the properties of CMC hydrogels with 5%CA was studied. Fig. 4 presented that water absorption property of the films was sensitive to curing temperature. The values decreased rapidly when the curing temperature was changed from 160°C to 170°C. At longer time of curing, the decrease of water absorption values was also observed. From the experiment, the CMC hydrogel with  $\leq 50\%$  water solubility reached the maximum water absorption value at 1,280% when the sample was cured at 160°C for 120 seconds.

The experimental results indicated that CMC could be changed from water soluble polymer to swellable solid polymer after exposure to crosslinker and curing step. At higher crosslinking density, however, caused the lower swellability of the hydrogel.

### 3.3 Mechanical properties

The tensile strength and elongation as a function of curing time for the specimens prepared by using 5% CA and cured at 160°C are represented in Table 1. The results showed that curing process improved the tensile strength of the hydrogel films, while the elongation values tended to decrease. The cured films become rigid and lost its elasticity. This could be due to the increase of crosslinkage in the CMC network structure. Too long curing time may also lead to the decrease of the film strength as a result of polymer degradation. In this experiment, the maximum value of tensile strength was 68 MPa when curing time for 120 seconds was used.

Table 1 The effect of curing condition on mechanical properties of CMC hydrogel films prepared by using 5%CA.

	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)
Blank	49.11	20.47
160C 120s	68.18	17.15
160C 150s	60.78	18.33

## 4. CONCLUSION

CMC hydrogel could be prepared by using citric acid as crosslinking agent. Concentration of crosslinking agent, curing temperature and curing time showed significant effect on water absorption and mechanical properties of the prepared hydrogel. From this experiment, it was found that the hydrogel film having the optimal properties could be achieved when CMC with 5% citric acid was used and cured at 160°C for 120 seconds. FT-IR analysis provided the evidence of ester crosslinkage in CMC molecules and the mechanism of the reaction had been suggested.

## 5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge the financial support general subsidies from the Thai government.

## 6. REFERENCES

1. Nie, H., Liu, M., Zhan, F., Guo, M. (2004). Factors on the preparation of carboxymethyl cellulose hydrogel and its degradation behavior in soil. *Carbohydr. Polym.*, 58, 185-189.
2. Liu, P., Peng, J., Li, J., Wu, J. (2005). Radiation crosslinking of CMC-Na at low dose and its application as substitute for hydrogel. *Radiat. Phys. Chem.*, 72, 635-638.
3. Tong, Q., Xiao, Q., Lim, L.T. (2008). Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. *Food Res. Int.*, 41, 1007-1014.
4. Lin, O.H., Kumar, R.N., Rozman, H.D., and Mohd, Noor, M.A. (2005). Grafting of sodium carboxymethylcellulose (CMC) with glycidyl methacrylate and development of UV curable coatings from CMC-g-GMA induced by cationic photoinitiators. *Carbohydr. Polym.*, 59, 57-69.