

การดัดแปรพลาสมาโนไฟเบอร์ของอีเล็กโทรสปินไลโทซานเพื่อต้านฤทธิ์แบคทีเรีย

นางสาววลัยวัลย์ เตียวตระกูลวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

SURFACE MODIFICATION OF ELECTROSPUN CHITOSAN NANOFIBER FOR
ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Miss Walaiwan Tiawtrakoonwat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Petrochemical and Polymer Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตัดแปรผิวหนังไฟเบอร์ของอเล็กโทรสปีนโคโทซาน เพื่อต้านฤทธิ์แบคทีเรีย
โดย	นางสาววลัยวัลย์ เตียวตระกูลวัฒน์
สาขาวิชา	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.สุดา เกียรติกำจรวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ สุภผล ดร.วิยงค์ กังวานสุขุมงคล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพรธน ประศาสน์สารกิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.สุดา เกียรติกำจรวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ สุภผล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.วิยงค์ กังวานสุขุมงคล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โสเว่น)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.กฤตภาส เลหาสุรโยธิน)

วลัยวัลย์ เตียวตระกูลวัฒน์: การดัดแปรผิวนาโนไฟเบอร์ของอเล็กโทรสป็นไคโทซานเพื่อ
ด้านฤทธิ์แบคทีเรีย (SURFACE MODIFICATION OF ELECTROSPUN CHITOSAN
NANOFIBER FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ.ดร.สุดา เกียรติกำจรวงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม:
ศ.ดร.พิชญ์ ศุภผล, ดร.วิยงค์ กังวานสุขุมงคล, 72 หน้า.

ได้ศึกษาการขึ้นรูปไคโทซานที่มีระดับขั้นการกำจัดหมู่เอซิทิลร้อยละ 84 ผสมกับพอลิเอ
ทิลีนออกไซด์ (พีอีโอ) โดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต พีอีโอช่วยทำให้ขึ้นรูปเส้นใยได้ใน
สารละลายผสมระหว่างไคโทซานร้อยละ 6.7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กับพีอีโอร้อยละ 0.3 โดย
น้ำหนักต่อปริมาตร ละลายในสารละลายผสมของกรดไตรฟลูออโรแอซิดิกและไดคลอโรมีเทน
อัตราส่วน 70 ต่อ 30 โดยปริมาตร เส้นใยไคโทซานที่เตรียมได้มีลักษณะเรียบปราศจากปม มีขนาด
เส้นผ่าศูนย์กลางเส้นใย 272 ± 56 นาโนเมตร เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครส
โกปี เส้นใยไคโทซานที่ดัดแปรผิวของ เอ็น-(2-ไฮดรอกซิล) โพรพิว-3-ไทรเมทิลแอมโมเนียมไคโท
ซานคลอไรด์ และเอ็น-เบนซิล-เอ็น, เอ็น-ไดเมทิลไคโทซานไอโอไดด์ที่เตรียมขึ้น เพื่อให้แผ่นเส้น
ใยนาโนไฟเบอร์ของไคโทซาน/พีอีโอมีหมู่เกลือควอเทอร์นารีแอมโมเนียม ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา
ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ลักษณะการบวมตัวด้วยน้ำ และเอกซ์เรย์
โพโตอิเล็กตรอนสเปกโทรสโกปี เมื่อเวลาสัมผัสเชื้อของแผ่นอเล็กโทรสป็นไคโทซานทั้ง 3 ชนิด
น้อยกว่า 2 ชั่วโมง อเล็กโทรสป็นไคโทซานที่มีควอเทอร์นารีแอมโมเนียมทั้งสองชนิดมีสมบัติการ
ด้านฤทธิ์แบคทีเรียดีกว่าอเล็กโทรสป็นไคโทซาน/พีอีโอต่อแบคทีเรียแกรมบวกสแตปฟีโลคอกคัส
ออเรียสและแบคทีเรียแกรมลบเอสเชอริเชียโคไล เมื่อเวลาสัมผัสเชื้อของแผ่นอเล็กโทรสป็นไคโท
ซานทั้ง 3 ชนิด นานตั้งแต่ 4 ชั่วโมงขึ้นไป ฤทธิ์การด้านแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีค่าเท่ากันคือ ร้อยละ
99.9

สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5172441423: MAJOR Petrochemistry and Polymer Science

KEYWORDS: ELECTROSPUN CHITOSAN NANOFIBER / SURFACE MODIFICATION / ANTIBACTERIAL ACTIVITY

WALAIWAN TIEWTRAKOONWAT: SURFACE MODIFICATION OF ELECTROSPUN CHITOSAN NANOFIBER FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY. ADVISOR: PROF. SUDA KIATKAMJORNWONG, Ph.D., CO-ADVISORS: PROF. PITT SUPAPHOL, Ph.D., WIYONG KANGWANSUPAMONKON, Ph.D., 72 pp.

Chitosan with a degree of deacetylation of 84% blended with poly(ethylene oxide), (PEO), was fabricated into nanofibrous membranes by electrospinning. The introduction of PEO was to facilitate fiber formation. The spinning solution contained 6.7% (w/v) chitosan and 0.3% (w/v) PEO in 70:30 (v/v) trifluoroacetic acid/dichloromethane. The obtained fibers were smooth without the presence of beads, as confirmed by scanning electron microscopy (SEM). The diameters of the individual fibers were 272 ± 56 nm. The surface modified chitosan fibers, *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride (HTACC) and *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl chitosan iodide (QBzCS) were prepared with an aim to incorporate quaternary ammonium salt to the chitosan nanofibrous membranes. The successful reactions were confirmed by Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR), degree of swelling in water, and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). At contact times of less than 2 hours, both the quaternized electrospun chitosan mats exhibited higher antibacterial activity than did the electrospun chitosan/PEO mats against both the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria *Escherichia coli*. At the contact times longer than 4 hours, the reduction of both bacteria *S. aureus* and *E. coli* against chitosan/PEO, HTACC, and QBzCS was equal at 99.9%

Field of Study: Petrochemical and Polymer Science
 Academic Year: 2011

Student's Signature
 Advisor's Signature
 Co-advisor's Signature
 Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.สุดา เกียรติกำจรวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศ.ดร. พิษณุ สุภผล และ ดร.วิยงค์ กังวานสุขุมงคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้คำแนะนำ คำสอน และความเอาใจใส่ ให้ความช่วยเหลือตลอดเวลาการทำงานวิจัย พร้อมทั้งตรวจ แก้ไขเนื้อหา และสาระในวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และยังให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีในการทำงานวิจัยตลอดเวลาการทำงานวิจัยนี้จนเสร็จสมบูรณ์ โดยเฉพาะอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักไม่เพียงแต่ให้คำแนะนำและอบรมสั่งสอนความรู้ด้านวิชาการเท่านั้น ทั้งยังให้ข้อคิดต่าง ๆ ที่นำไปใช้ในการดำรงชีวิตประจำวัน และการทำงานต่อไปในภายภาคหน้า ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร.วรวิรี โสเว่น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำในการหาระดับชั้นการแทนที่ของหมู่ควอเทอร์นารีแอม โมเนียม และแนะนำข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.ภัทรพรหม ประศาสน์สารกิจ ประธานกรรมการสอบ และ ดร.กฤตภาส เลหาสุรโยธิน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำอันมีค่าเพื่อปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบคุณการสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยจากโครงการ RTA5080004 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ขอขอบคุณวิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับทำงานวิจัย ขอขอบคุณนางสาวดวงพร เขี่ยมสวัสดิ์ และนายชูชาติ วารินทร์ สำหรับคำแนะนำการใช้เครื่องมือการทำงานวิจัย และการสนับสนุนด้านการวิเคราะห์ทดสอบแบคทีเรีย ขอขอบคุณนางสาววิไลพร ไกรสุวรรณ นิสิตปริญญาเอก หลักสูตรปิโตรเคมี สำหรับคำแนะนำในการเตรียม HTACC

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงในความรักรักความห่วงใยของบิดา มารดา ผู้เป็นที่รัก ผู้ให้กำลังใจและให้โอกาสทางการศึกษาตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 แนวเหตุผลหรือสมมติฐาน.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวารสารปริทรรศน์.....	4
2.1 การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต.....	4
2.1.1 หลักการของกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต.....	5
2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต.....	5
2.1.3 ข้อดีของกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต.....	5
2.1.4 เส้นใยจากพอลิเมอร์.....	6
2.2 ไคติน-ไคโทซาน.....	6
2.2.1 ไคติน-ไคโทซาน.....	6
2.2.2 การประยุกต์ไคติน-ไคโทซาน.....	7
2.2.3 การขึ้นรูปไคโทซานโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต.....	8

2.3	อนุพันธ์ของไคโทซาน.....	14
2.3.1	<i>N</i> -(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride และ การใช้งาน.....	14
2.3.2	quaternized <i>N</i> -alkyl chitosan และการใช้งาน.....	16
2.3.3	<i>N</i> -carboxyethylchitosan (CECh) และการใช้งาน.....	18
2.3.4	การขึ้นรูปอนุพันธ์ของไคโทซานโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้า สถิต.....	19
2.4	แบคทีเรีย.....	21
2.4.1	ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย.....	21
2.4.2	การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย.....	22
2.4.3	การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	24
2.4.4	กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์.....	26
2.4.5	กลไกการต้านจุลินทรีย์ของไคโทซานและอนุพันธ์ของไคโทซาน.....	29
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
3.1	สารเคมี.....	30
3.2	อุปกรณ์.....	30
3.2.1	สแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโกปี.....	30
3.2.2	อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	30
3.2.3	นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี.....	30
3.2.4	เอกซเรย์โฟโตอิเล็กตรอนสเปกโทรสโกปี.....	31
3.2.5	เอกซเรย์ดิฟแฟรกชันสเปกโทรสโกปี.....	31
3.3	วิธีการทดลอง.....	31
3.3.1	การเตรียมแผ่นเส้นใยไคโทซานโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้า สถิต.....	31
3.3.2	สัณฐานวิทยาของแผ่นเส้นใย.....	32

3.3.3 การเชื่อมขวางแผ่นเส้นใย.....	32
3.3.4 การสะเทินแผ่นเส้นใยไคโทซาน.....	32
3.3.5 การเตรียม HTACC.....	32
3.3.6 การตรวจสอบคุณลักษณะ.....	33
3.3.7 ระดับขึ้นการบวมตัว (degree of swelling) ของ HTACC.....	33
3.3.8 การเตรียม <i>N</i> -benzyl chitosan fiber.....	34
3.3.9 การเตรียม <i>N</i> -Benzyl- <i>N,N</i> -dimethyl chitosan fiber.....	34
3.3.10 วิจัยการต้านฤทธิ์จุลินทรีย์.....	34
3.3.11 สันฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย	35
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	36
4.1 % degree of deacetylation (%DD) ของไคโทซาน.....	36
4.2 การเตรียมแผ่นเส้นใยไคโทซานโดยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิง.....	37
4.2.1 เอกลักษณะทางเคมีของแผ่นเส้นใยไคโทซานด้วย FT-IR.....	42
4.3 การเตรียม HTACC โดยกราฟต์ GTMAC บนไคโทซาน.....	33
4.3.1 การเชื่อมขวางแผ่นเส้นใยด้วยไอของกลูตารัลดีไฮด์.....	43
4.3.2 เอกลักษณะทางเคมีของ <i>N</i> -(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride (HTACC)	44
4.3.3 ผลของเวลาทำปฏิกิริยาต่อระดับขึ้นการบวมตัว.....	47
4.3.4 ผลของการสะเทินต่อความเป็นผลึกในไคโทซาน.....	48
4.3.5 เอกลักษณะทางเคมีของ HTACC โดยเทคนิค XPS.....	49
4.4 การเตรียมแผ่นเส้นใย <i>N</i> -benzyl- <i>N,N</i> -dimethyl-chitosan iodide/Poly(ethylene oxide) (QBzCS/PEO).....	52
4.4.1 สันฐานวิทยาของ QBzCS/PEO ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชัน....	52
4.4.2 เอกลักษณะทางเคมีของ QBzCS/PEO โดยเทคนิค FTIR.....	53
4.4.3 เอกลักษณะทางเคมีของ QBzCS/PEO โดยเทคนิค XPS.....	55

4.5 การด้านฤทธิ์ของแผ่นเส้นใย CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO.....	57
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	62
ข้อเสนอแนะ.....	63
รายการอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก.....	69
ภาคผนวก ก.....	70
ภาคผนวก ข.....	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	โคโทซานและระบบสารละลายที่สามารถขึ้นรูปได้ด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต.....	9
2.2	อนุพันธ์ของโคโทซานและระบบตัวทำละลายที่สามารถขึ้นรูปได้โดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต.....	20
2.3	สารเคมีที่ใช้ควบคุมจุลินทรีย์.....	28
4.1	Intrgral intensity ของโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ บนโคโทซาน.....	36
4.2	ร้อยละของหมู่เอมิโนและร้อยละของหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมใน HTACC/PEO.....	51
4.3	ร้อยละของหมู่เอมิโนและร้อยละของหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมใน QBzCS/PEO.....	57
ก-1	เส้นผ่านศูนย์กลางกลางของเส้นใย CS/PEO ที่อัตราส่วนต่าง ๆ.....	70
ก-2	การบวมน้ำ.....	70
ข-1	%reduction ของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> เมื่อสัมผัสกับ CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO	71
ข-2	%reduction ของแบคทีเรีย <i>E. coli</i> เมื่อสัมผัสกับ CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO	71

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การปั่นเส้นใยโดยไฟฟ้าสถิต.....	4
2.2 การเตรียมไคโทซานจากไคทิน.....	7
2.3 คำสารละลายพอลิเมอร์เบลนด์ CS/PEO ที่ออกมาจากปลายเข็ม.....	13
2.4 อุปกรณ์การปั่นเส้นใยแบบ (ก) core sheath electrospinning, และ (ข) ลักษณะเส้นใยที่ได้.....	14
2.5 การสังเคราะห์ <i>N</i> -(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride...	15
2.6 การสังเคราะห์ quaternized <i>N</i> -alkyl chitosan.....	17
2.7 การสังเคราะห์ <i>N</i> -carboxyethylchitosan.....	18
2.8 โครงสร้างพื้นฐานของเซลล์แบคทีเรีย.....	21
2.9 โครงสร้างของผนังหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ.....	23
2.10 กราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์แบคทีเรีย.....	25
3.1 อุปกรณ์การขึ้นรูปเส้นใยโดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต.....	31
4.1 สเปกตรัม H^1 NMR ของไคโทซาน.....	37
4.2 การละลายไคโทซานด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก.....	38
4.3 ภาพ SEM ของเส้นใยได้จากอัตราส่วนระหว่าง CS/PEO ในสารละลายซึ่งส่งผลต่อสถานะวิทยาของเส้นใย.....	39
4.4 การกระจายตัวของเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใย CS/PEO.....	41
4.5 สเปกตรัม FT-IR ของ CS และเส้นใย CS/PEO อัตราส่วน 6.7/0.3	42
4.6 กลไกการเชื่อมขวางไคโทซานด้วยกลูตารัลดีไฮด์.....	43
4.7 สเปกตรัม FT-IR ของ (a) เส้นใย CS/PEO, (b) เส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางด้วย GT, (c) ผลิตภัณฑ์จาก b มาทำปฏิกิริยากับ GTMAC เป็นเวลา 8 ชั่วโมง, (d) ผลิตภัณฑ์จาก b ที่สะเทินด้วยด่าง และ (e) ผลิตภัณฑ์จาก d มาทำปฏิกิริยากับ GTMAC เป็นเวลา 8 ชั่วโมง.....	44

ภาพที่	หน้า
4.8	สเปกตรัม FT-IR ของ (a) เส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางด้วย GT, (b)-(g) ผลิตกัณฑ์ ที่ได้หลังจากนำแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางด้วย GT มาทำปฏิกิริยากับ GTMAC เป็นเวลา 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ 45
4.9	กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไคโทซานกับ GTMAC ในภาวะ (ก) กรด และ (ข) ด่าง..... 46
4.10	ผลของเวลาการทำกราฟต์ GTMAC บนแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่ไม่ได้รับการสะเทิน และแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการสะเทิน ต่อระดับขึ้นการบวมตัว..... 47
4.11	การสะเทินแผ่นเส้นใยด้วย Na ₂ CO ₃ 48
4.12	XRD patterns ของไคโทซาน, เส้นใย CS/PEO, เส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการเชื่อม ขวาง และ เส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการเชื่อมขวางแล้วนำไปสะเทิน..... 49
4.13	XPS spectra ของ (a-b) แผ่นเส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางแล้ว และ (c-d) HTACC/PEO..... 50
4.14	สัณฐานวิทยาของ (a) CS/PEO fiber, (b) neutralized CS/PEO fiber, และ (c-f) QBzCS/PEO ที่เวลาทำปฏิกิริยามาทีเลข 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ..... 52
4.15	FT-IR spectra ของ (a) chitosan, (b) เส้นใย CS/PEO, (c) เส้นใย CS/PEO ที่ผ่าน การสะเทิน และ(d) QBzCS..... 54
4.16	การเตรียม <i>N</i> -benzyl- <i>N,N</i> -dimethyl chitosan iodide (QBzCS)..... 55
4.17	XPS spectra ของ (a,c) แผ่นเส้นใย CS/PEO ที่สะเทินแล้ว และ (b,d) QBzCS/PEO 56
4.18	%reduction ของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ที่เวลาสัมผัสสาร 0.5, 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง.. 58
4.19	% reduction ของแบคทีเรีย <i>E. coli</i> ที่เวลาสัมผัสสาร 0.5, 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง..... 59
4.20	สัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย (a) <i>S. aureus</i> , (b) <i>E.coli</i> , (c) <i>S. aureus</i> บนแผ่นเส้นใย HTACC/PEO, (d) <i>E. coli</i> บนแผ่นเส้นใย HTACC/PEO, (e) <i>S. aureus</i> บนแผ่นเส้น ใย QBzCS/PEO และ (d) <i>E. coli</i> บนแผ่นเส้นใย QBzCS/PEO ให้ (c-d) ใช้เวลา สัมผัสสาร 24 ชั่วโมง..... 60

บทที่ 1

บทนำ

1.1 แนวเหตุผลหรือสมมติฐาน

กระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (electrospinning process) เป็นกระบวนการเตรียมเส้นใยที่มีการวิจัยและพัฒนาอย่างมากในปัจจุบัน หลักการของการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต คือ การเตรียมเส้นใยขนาดเล็ก โดยการดึงยืดสารละลายพอลิเมอร์ด้วยแรงทางไฟฟ้าจากแหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง เส้นใยที่เตรียมได้จากกระบวนการนี้มีขนาดเส้นใยอยู่ในระดับไมโครเมตรจนถึงนาโนเมตร เรียกว่า เส้นใยนาโน (nanofiber) (Ramakrishna *et al.*, 2005) ข้อได้เปรียบของกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตคือ เส้นใยนาโนมีขนาดใกล้เคียงกับเส้นใยที่ใช้เป็นส่วนยึดเกาะของเซลล์ภายในร่างกาย (extra cellular matrix, ECM) และมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมาก ทำให้สามารถดัดแปรหมู่ฟังก์ชันที่พื้นผิวของพอลิเมอร์ที่ใช้เตรียมเส้นใยได้หลากหลายเหมาะสมกับการใช้งาน อีกทั้งการซ้อนทับของเส้นใยขนาดเล็กทำให้ได้แผ่นเส้นใยที่มีรูพรุนมาก ของเหลวและแก๊สสามารถถ่ายเทได้สะดวก จึงได้มีการศึกษาเทคนิคนี้ในการขึ้นรูปเส้นใยโคโทซาน

โคโทซานเป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติได้จากการกำจัดหมู่เอซีทิล (deacetylation) ของไคทินซึ่งได้จากโครงสร้างภายนอกของสัตว์จำพวก ปู กุ้ง และแกนปลาหมึกด้วยด่างเข้มข้น (NaOH) ไคโทซานมีสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ อีกทั้งยังมีสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรีย (Kim *et al.*, 1996) จึงมีการศึกษาพัฒนาโคโทซานมาเพื่อใช้ในการแพทย์ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ ทำแผ่นปิดแผล (Zhou *et al.*, 2008) ใช้เป็นตัวปล่อยยาและเอนไซม์ (Sill and Recum, 2008) ใช้ผลิตวัสดุโครงข่ายรูพรุนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Sangsanoh *et al.*, 2008) ใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรม เช่น ใช้ดักจับโลหะหนัก (Spinelli *et al.*, 2004) ปัจจุบันมีการพัฒนาขึ้นรูปเส้นใยโคโทซานโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตเพื่อใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์ ซึ่งเป็นอันสงส์จากสมบัติที่ดีของโคโทซานและข้อได้เปรียบของกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตดังกล่าวมาแล้ว

สมบัติที่คืออย่างหนึ่งของโคโทซานคือ สมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรีย โคโทซานสามารถต้านฤทธิ์แบคทีเรียได้เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นกรด (Cho *et al.*, 2006) เพื่อปรับปรุงสมบัตินี้ให้ดีขึ้นได้มีการวิจัยและพัฒนาการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันของโคโทซานให้มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม เพื่อให้ผิว

ของไคโทซานเป็นประจุบวกมากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านฤทธิ์แบคทีเรีย เช่น *N,N,N*-trimethyl chitosan iodide (Kim *et al.*, 1996), *N*-butyl-*N,N*-dimethyl chitosan iodide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl chitosan iodide (Vallapa *et al.*, 2011) และ *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride (HTACC) (Seong *et al.*, 1999)

ทั้งไคโทซานและอนุพันธ์ของไคโทซานที่กล่าวมานี้ ไม่สามารถขึ้นรูปเป็นเส้นใยได้ เนื่องจากเมื่อเตรียมเป็นสารละลายพอลิเมอร์ มีประจุบวกในสายโซ่มาก ทำให้ต้องเติมพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่ไม่แตกตัวเป็นประจุ (non-ionic polymer) และสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นเส้นใยได้ง่าย เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) (Ignatova *et al.*, 2006) พอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (PVP) (Ignatova *et al.*, 2007) หรือ พอลิเอทิลีนออกไซด์ (Bhattarai *et al.*, 2006) เพื่อเพิ่มความสามารถในการขึ้นรูปเส้นใย

ปัจจุบัน มีการศึกษาสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียไคโทซานและอนุพันธ์ของไคโทซานในรูปของแผ่นฟิล์ม หรือขึ้นรูปเส้นใยจากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตโดยผสมกับพอลิเมอร์อื่น จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเส้นใยไคโทซานนาโนมาดัดแปรผิวให้มีประจุมากขึ้นมาก่อน งานวิจัยนี้จึงศึกษาการขึ้นรูปไคโทซานโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต แล้วจึงดัดแปรหมู่ฟังก์ชันที่ผิวของเส้นใยไคโทซานให้ประจุบวกมากขึ้นด้วยปฏิกิริยา 2 วิธี วิธีแรกทำปฏิกิริยากับ glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) และวิธีที่สองทำปฏิกิริยากับ aldehyde แล้วตามด้วยทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันกับ methyl iodide เพื่อศึกษาสมบัติในการต้านฤทธิ์แบคทีเรีย และทดลองความเป็นวัสดุต้นแบบของแผ่นปิดแผลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เตรียมแผ่นเส้นใยไคโทซาน/พอลิเอทิลีนออกไซด์ (CS/PEO) จากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต
- 1.2.2 เตรียม *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride/poly(ethylene oxide) (HTACC/PEO) และศึกษาสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรีย
- 1.2.3 เตรียม *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl chitosan iodide/poly(ethylene oxide) (QBzCS/PEO) และศึกษาสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตการทำงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการขึ้นรูปเส้นใยไคโทซาน/พอลิเอทิลีนออกไซด์ (CS/PEO) โดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต
- 1.3.2 เตรียมแผ่นเส้นใยไคโทซานที่มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม 2 ชนิดคือ *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride/poly(ethylene oxide) และ *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl chitosan iodide/poly(ethylene oxide)
- 1.3.3 วิเคราะห์เอกลักษณ์ทางเคมีและสัณฐานวิทยาของแผ่นเส้นใย CS/PEO และแผ่นเส้นใยไคโทซานที่กราฟต์ด้วยหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม 2 ชนิด
- 1.3.4 ศึกษาสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียของแผ่นเส้นใยไคโทซานที่มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม
- 1.3.5 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

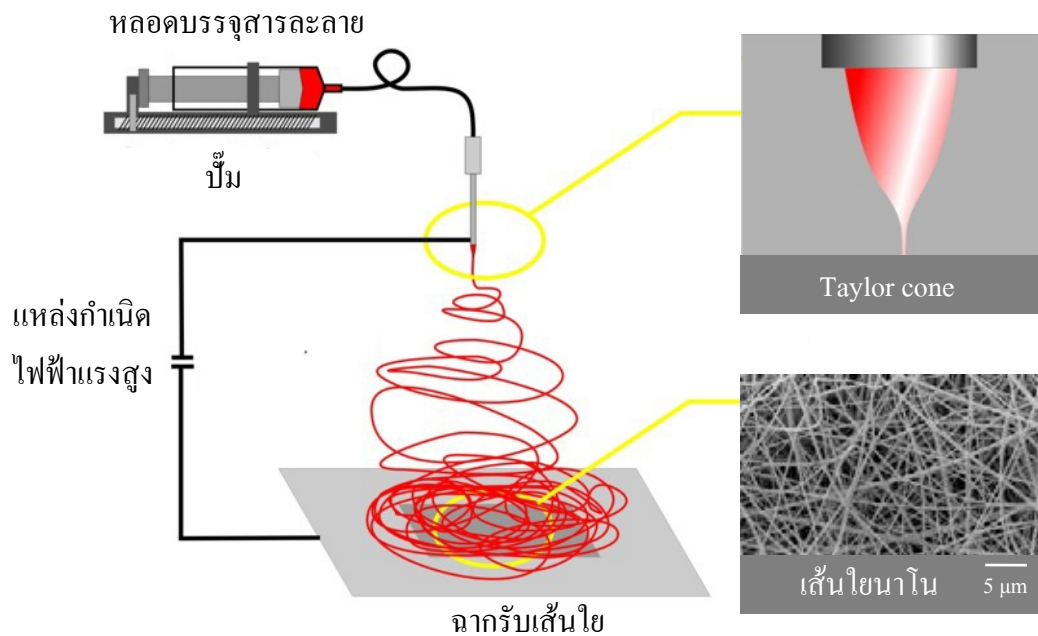
ได้แผ่นเส้นใยไคโทซานและไคโทซานดัดแปรที่มีสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรีย

บทที่ 2

ทฤษฎีและวารสารปริทรรศน์

2.1 การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (electrospinning หรือ electrostatic spinning) เป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยมสำหรับผลิตเส้นใยที่ได้รับการพัฒนามากว่า 70 ปี เนื่องจากเป็นวิธีที่มีหลักการไม่ซับซ้อน ใช้อุปกรณ์ราคาไม่แพง ผลิตเส้นใยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระดับระดับนาโนเมตรถึง 100 นาโนเมตร หรือเรียกว่า “เส้นใยนาโน” (Ramakrishna *et al.*, 2005)



รูปที่ 2.1 การปั่นเส้นใยโดยไฟฟ้าสถิต

การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตมีอุปกรณ์ที่สำคัญ คือ แหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้าแรงสูง (high voltage power supply), ปั๊ม (pump), กระบอกฉีดสารละลายพร้อมเข็มฉีดยา (syringe with needle) และฉากรับเส้นใย (collector) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

2.1.1 หลักการของกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

หลักการของกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต คือ การให้แรงทางไฟฟ้าดึงยึดสารละลายพอลิเมอร์ หรือพอลิเมอร์หลอมเหลวได้เป็นเส้นใยขนาดเล็ก เมื่อเริ่มให้ประจุไฟฟ้าแก่สารละลายพอลิเมอร์ ประจุจะเคลื่อนไปบริเวณพื้นผิวของของเหลว นั้น เนื่องจากประจุที่เกิดขึ้นมีขั้วเหมือนกันจึงมีแรงผลักระหว่างประจุเกิดขึ้น แรงผลักนี้เรียกว่า repulsive coulombic force เมื่อแรงของสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้นหยดของเหลวที่ปลายรูขนาดเล็กจะเปลี่ยนรูปร่างจากครึ่งวงกลมเป็นทรงกรวย หรือเรียกว่า Taylor cone เมื่อเพิ่มความแรงของสนามไฟฟ้ามากขึ้น แรงผลัก repulsive coulombic force มีมากพอถึงค่าหนึ่งซึ่งมากกว่าแรงตึงผิวของพอลิเมอร์เหลว ทำให้เส้นของเหลวพุ่งออกมาจากปลาย Taylor cone พอลิเมอร์เหลวที่พุ่งออกมาจะเกิดจากความไม่เสถียร และเกิดการยืดตัวทำให้ลำของเหลวให้ยาวขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของลำของเหลวจะเล็กลงแรงผลักของประจุบนของเหลวส่งผลให้เกิดการตีเกลียว (bending instability หรือ whipping) พร้อมกับการเปลี่ยนเป็นเส้นใยตกลงที่ฉากโลหะรองรับโดยการระเหยออกของตัวทำละลาย หรือโดยการถ่ายเทความร้อนให้กับสิ่งแวดล้อม

2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (พิชญ์ ศุภผล และคณะ, 2552)

- 1) สารละลายพอลิเมอร์ ได้แก่ ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์ แรงตึงผิว และความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลาย
- 2) กระบวนการฉีดเส้นใย ได้แก่ ความต่างศักย์ไฟฟ้า อัตราการป้อน อุณหภูมิ ขนาดของเข็ม และระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรับ
- 3) สภาพแวดล้อมของสถานที่ตั้งเครื่องปั่นเส้นใย ได้แก่ ความชื้นในอากาศ และชนิดของบรรยากาศ

2.1.3 ข้อดีของกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

- 1) มีขนาดใกล้เคียงกับเส้นใยที่ใช้เป็นส่วนยึดเกาะของเซลล์ภายในร่างกาย (extra cellular matrix, ECM)

- 2) การซ้อนทับของเส้นใยขนาดเล็กทำให้ได้แผ่นเส้นใยที่มีรูพรุนสูง ของเหลวและแก๊สสามารถถ่ายเทได้สะดวก
- 3) มีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมาก ทำให้สามารถดัดแปรหมู่ฟังก์ชันที่ผิวได้หลากหลายให้เหมาะสมกับการใช้งาน

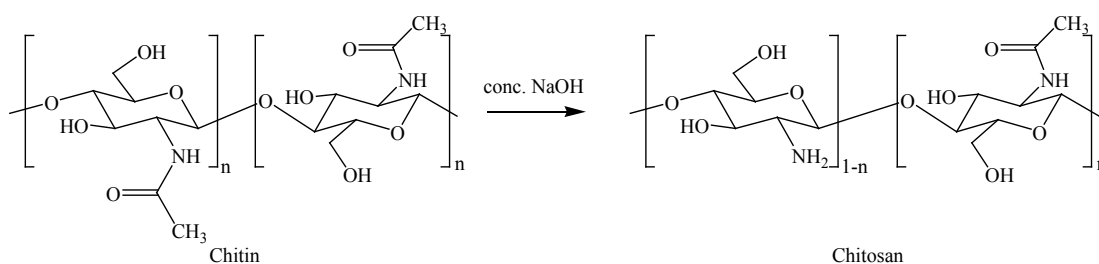
2.1.4 เส้นใยจากพอลิเมอร์

เนื่องจากข้อดีของเส้นใยนาโนดังที่กล่าวมาแล้วทำให้มีการพัฒนาเส้นใยนาโนจากพอลิเมอร์กว่า 50 ชนิด (Schiffman *et al.*, 2008) เพื่อประยุกต์ในด้านต่างๆ อาทิ วัสดุปล่อย itraconazole หรือ ketanserin จากเส้นใยพอลิยูรีเทน (Verreck *et al.*, 2003) วัสดุปล่อย plasmid DNA จากเส้นใยพอลิเมอร์เบลนด์ของพอลิแลกติกแอซิด/พอลิเอทิลีนไกลคอล/ พอลิแลกติก-โค-ไกลโคลิกแอซิด (PLA/PEG/PLGA) (Luu *et al.*, 2003) วัสดุปล่อยวิตามินเอและวิตามินอีจากเส้นใยเซลลูโลสแอซิเตด (Taepaiboon *et al.*, 2007) วัสดุโครงข่ายรูพรุนสำหรับฟื้นฟูเส้นเลือดจากเส้นใยเส้นใยพอลิคาโพรแลคโตน (PCL) กราฟต์ด้วย gelatin (Ma *et al.*, 2005) วัสดุโครงข่ายรูพรุนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์ประสาทจากเส้นใยไคโทซาน (Sangsanoh *et al.*, 2007) แผ่นกรองโลหะหนักจากเส้นใยพอลิอะคริลาไมด์ (Kampalanonwat *et al.*, 2007) แผ่นกรองโลหะหนักจาก wool keratose/silk fibroin (Ki *et al.*, 2007) แผ่นกรอง reactive dye จากเส้นใยไคโทซานเบลนด์กับพอลิเอทิลีนออกไซด์ (CS/PEO) (Rosa *et al.*, 2008) แผ่นกรองจากพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์สามารถกรองอนุภาคขนาดเล็กที่สุด 1 ไมโครเมตร ประยุกต์ใช้กรองอนุภาคในน้ำก่อนนำเข้าสู่กระบวนการรีเวิร์สออสโมซิส (Gopal *et al.*, 2006) แผ่นกรองอนุภาคจากพอลิซัลโฟนสามารถกรองอนุภาคขนาดเล็กที่สุด 7 ไมโครเมตร (Gopal *et al.*, 2007)

2.2 ไคทิน-ไคโทซาน

ไคโทซาน หรือ 2-amino-2-deoxy-D-glucose (รูปที่ 2.2) เป็นอนุพันธ์ของไคทินที่ได้จากการเปลี่ยน *N*-acetyl-D-glucosamine เป็น D-glucosamine ผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อกำจัดหมู่ acetyl ออกจากไคทิน ระดับการกำจัดหมู่ acetyl เรียกว่า degree of deacetylation (%DD) หมู่ acetyl เปลี่ยนเป็นหมู่เอมิโน ไคทินที่มี %DD มากกว่า 50% เรียกว่า ไคโทซาน

ไคติน-ไคโทซานเป็นวัสดุชีวภาพที่มีสมบัติเด่นหลายประการ เช่น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ความเป็นประจุบวกของไคโทซานมีสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรีย แต่ไคโทซานมีสมบัติหนึ่งแตกต่างจากไคติน คือ สมบัติการละลาย ไคโทซานสามารถละลายในกรดอ่อน เช่น กรดฟอร์มิก หรือกรดแอสซิติค เนื่องจากหมู่เอมิโนในไคโทซานมีค่า pKa ประมาณ 6.5 มีผลให้ไคโทซานมีประจุเป็นบวกในสารละลายที่เป็นกลางและเป็นกรด (Cho *et al.*, 2006)



รูปที่ 2.2 การเตรียมไคโทซานจากไคติน

2.2.1 การประยุกต์ไคติน-ไคโทซาน (ประภัสสร สุรวฒนาวรรณ, 2554)

ไคโทซานสามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ดังนี้

1) ด้านอาหาร ไคโทซานมีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิด โดยประจุบวกบนหมู่เอมิโนของไคโทซาน สามารถจับกับเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบได้ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและสารอื่น ๆ ของเซลล์ หลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคตินและไคโทซานให้เป็นสารที่ใส่เติมในอาหารได้ นำไปใช้เป็นสารกันเสีย สารช่วยรักษากลิ่น รส และสารให้ความข้น ใช้เป็นสารเคลือบอาหาร ผัก และผลไม้ เพื่อรักษาความสดหรือผลิตในรูปแบบฟิล์มที่รับประทานได้ (edible film) สำหรับบรรจุอาหาร

2) ด้านอาหารเสริม ไคโทซานช่วยลดคอเลสเตอรอล และไขมันในเส้นเลือด ไคโทซานไปจับกับคอเลสเตอรอล ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมไปใช้หรือดูดซึมได้น้อยลง จึงมีการโฆษณาเป็นผลิตภัณฑ์ลดน้ำหนัก ทั้งนี้ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากไคโทซานสามารถจับวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน (วิตามินเอ ดี อี เค) อาจทำให้ขาดวิตามินเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ทางการแพทย์ มีรายงานการนำ *N-acetyl-D-glucosamine* ไปใช้รักษาไขข้อเสื่อม กล่าวคือ ข้อเสื่อมเกิด

เนื่องจากการสึกกร่อนของเนื้อเยื่ออ่อนที่เคลือบอยู่ระหว่างข้อกระดูก ซึ่ง glucosamine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ proteoglycan และ matrix ของกระดูกอ่อน จึงช่วยทำให้เยื่อหุ้มกระดูกอ่อนหนาขึ้น

3) ด้านการแพทย์ มีการวิจัยนำแผ่นไคโทซานมาใช้เป็นวัสดุตกแต่งแผลหรือใช้เป็นปิดแผล ช่วยทำให้ไม่เป็นแผลเป็น โดยไคโทซานช่วยลดการหดตัวของเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้แผลเรียบ กระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมบาดแผลให้หายเร็วขึ้น ใช้ผลิตภัณฑ์โครงข่ายรูพรุนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4) ด้านเภสัชกรรม ใช้ไคโทซานเพื่อควบคุมการปล่อยยา หรือด้วยยา และเอนไซม์

5) ด้านการเกษตร เนื่องจากไคติน-ไคโทซานมีไนโตรเจนองค์ประกอบ ในโตรเจนจะถูกปล่อยออกจากโมเลกุลอย่างช้า ๆ รวมทั้งช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศและดิน จึงใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช และกระตุ้นการนำแร่ธาตุไปใช้ ผลคือสามารถเพิ่มผลผลิตและคุณภาพการผลิตได้ ทำให้การเกษตรมีต้นทุนต่ำลง เนื่องจากลดการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลง

6) ด้านการปศุสัตว์ ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดการติดเชื้อ ทำให้น้ำหนักตัวของสัตว์เพิ่มขึ้น

7) ด้านการบำบัดน้ำเสีย ทั่วไปน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมีสารแขวนลอยปริมาณมาก ไคโทซานมีประจุบวกสามารถจับกับโปรตีนและไขมันได้ดี ซึ่งโปรตีนที่ได้สามารถแยกนำไปใช้ป้อนอาหารสัตว์ต่อไป นอกจากนี้ ไคโทซานยังสามารถดูดซับไอออนของโลหะหนัก และจับสีย้อม (dye) ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย

8) ด้านสิ่งทอ นำมาขึ้นรูปเป็นเส้นใยและใช้ในการทอร่วมหรือเคลือบกับเส้นใยอื่น ๆ เพื่อให้ได้สมบัติการต้านจุลชีพ ลดการเกิดกลิ่นอับชื้น

2.2.2 การขึ้นรูปไคโทซานโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

เนื่องจากสมบัติที่ดีหลายประการของไคโทซานผนวกกับข้อดีของกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต ทำให้นักวิจัยให้ความสนใจศึกษาและพัฒนาหาภาวะที่เหมาะสมในการปั่นเส้นใยไคโทซานและนำไปใช้งานในด้านต่าง ๆ ต่อไป สรุปงานวิจัยการฉีดเส้นใยอิเล็กโตรสปินไคโทซาน และระบบตัวทำละลาย สรุปได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ไคโทซานและระบบสารละลายที่สามารถขึ้นรูปได้ด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

พอลิเมอร์		สมบัติของไคโทซาน		ตัวทำละลาย	แหล่งอ้างอิง
ชนิดพอลิเมอร์	อัตราส่วน	%DD	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)		
CS	-	78	210	TFA/DCM	Ohkawa <i>et al.</i> , 2004
CS	-	-	210-1800	TFA/DCM	Ohkawa <i>et al.</i> , 2006
CS	-	95	70	TFA/DCM	Sangsanoh <i>et al.</i> , 2006
CS	-	54	106	90 % Aq AA	Geng <i>et al.</i> , 2005
CS/PVA	17/83	82.5	1600	2% Aq AA	Li <i>et al.</i> , 2005
CS/PVA/PVP	40/30/30	88	200	50% Aq AA	Guiping <i>et al.</i> , 2007
CS/PVA	30/70	78	-	2% Aq AA	Jai <i>et al.</i> , 2006
CS/UHMWPEO	90/10	85	190	3% Aq AA/DMF/Triton X-100 TM	Bhattarai <i>et al.</i> , 2006
CS/UHMWPEO	95/5	85	190	3% Aq AA/DMSO	Zhang <i>et al.</i> , 2008
CS/PEO	95/5	80	140	3% Aq AA	Desai <i>et al.</i> , 2008

Geng และคณะ (2005) ศึกษาการเตรียมเส้นใยไคโทซานนาโน โดยใช้สารละลายกรดแอสซิติคเข้มข้น 90% เป็นตัวทำละลายและพบว่า ไคโทซานน้ำหนักโมเลกุล 106 kDa เท่านั้นที่สามารถเตรียมเป็นเส้นใยที่เรียบ ปราศจากปม ส่วนไคโทซานน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa และ 398 kDa ไม่สามารถปั่นเป็นเส้นใยได้

Ohkawa และคณะ (2004) ประสบความสำเร็จในการปั่นเส้นใยไคโทซานความเข้มข้น 8 % โดยใช้ไคโทซาน น้ำหนักโมเลกุล 210 kDa และสารละลายผสมระหว่างกรดไตรฟลูออโรแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) กับไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) อัตราส่วน 70 ต่อ 30 เป็นตัวทำละลายและไม่จำเป็นต้องเติมพอลิเมอร์ชนิดอื่นลงไปเพื่อเพิ่มความสามารถในการปั่นเป็นเส้นใย เส้นใยที่ได้มีลักษณะเรียบ ปราศจากปม มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 330 นาโนเมตร ในการศึกษาต่อมาของ Ohkawa และคณะ (2006) ยืนยันว่า ระบบตัวทำละลาย TFA/DCM อัตราส่วน 70 ต่อ 30 นี้สามารถเตรียมเส้นใยไคโทซาน ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 210 kDa ถึง 1800 kDa ซึ่งกว้างกว่าระบบที่ใช้กรดแอสซิติคเข้มข้นเป็นตัวทำละลาย Sangsanoh และ Supaphol (2006) ขึ้นรูปเส้นใยไคโทซานด้วยระบบตัวทำละลายเดียวกัน มีภาวะการฉีดเส้นใยดังนี้ ศักย์ไฟฟ้า 25 kV ระยะทางระหว่างปลายเข็มถึงฉากรับ 20 เซนติเมตร ปล่อยสารละลายพอลิเมอร์ให้ไหลด้วยแรงโน้มถ่วง ให้ระนาบของเข็มฉีดยาที่บรรจุสารละลายพอลิเมอร์ทำมุม 45 องศากับแนวตั้ง แผ่นเส้นใยไคโทซานที่เตรียมได้อยู่ในรูปของเกลียวไทรฟลูออโรแอซิดเทต ทำให้ไวต่อความชื้น ละลายในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) และ 70% ethanol จึงสะเทินแผ่นเส้นใยให้เป็นกลางด้วยเบสคือ โซเดียมคาร์บอเนต แผ่นเส้นใยที่ถูกสะเทินไม่เสียรูปเมื่อแช่ในสารละลาย PBS และเนื้อเยื่อ Schwann cell สามารถเจริญเติบโตบนแผ่นเส้นใยได้

การเพิ่มความสามารถในการปั่นเส้นใยของไคโทซานนั้น สามารถทำได้โดยเบลนด์ไคโทซานกับพอลิเมอร์ที่สามารถขึ้นรูปเป็นเส้นใยด้วยเทคนิคการปั่นเส้นใยโดยไฟฟ้าสถิตย์ได้ง่าย เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) พอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (PVP) และ พอลิเอทิลีนออกไซด์ (PEO)

มีนักวิจัยหลายคณะได้ศึกษาการเบลนด์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับไคโทซาน Li และคณะ (2005) ได้ศึกษาการขึ้นรูปเส้นใยโดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตโดยนำไคโทซาน น้ำหนักโมเลกุล 1600 kDa มาละลายในสารละลายกรดแอสซิติคเข้มข้น 2, 20 และ 90% (ปริมาตร/

ปริมาณ) พบว่าไม่สามารถขึ้นรูปเส้นใยโคโทซานได้ จึงเลือกพอลิไวนิลแอลกอฮอล์มาใช้เพื่อเพิ่มความสามารถในการขึ้นรูปเส้นใย จากการศึกษาสามารถขึ้นรูปเส้นใย CS/PVA ซึ่งมีอัตราส่วนระหว่าง CS และ PVA เป็น 17/83 สารละลายพอลิเมอร์มีความเข้มข้นรวม 6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เส้นใยที่ได้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 นาโนเมตร พบมีเม็ดบีดเล็กน้อยกระจายตัวบนเส้นใย เพื่อเพิ่มความสามารถในการขึ้นรูปเส้นใย โคโทซานถูกนำไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับด่างเข้มข้น NaOH เพื่อลดน้ำหนักโมเลกุลให้เหลือเพียง 800 kDa สามารถขึ้นรูปเส้นใยจากสารละลาย CS/PVA ความเข้มข้น 5% มีอัตราส่วนระหว่าง CS ต่อ PVA 50/50 ได้

ปี 2007 Jai และคณะ ขึ้นรูปเส้นใย CS/PVA จากสารละลายพอลิเมอร์เบลดเข้มข้น 7.4% โดยน้ำหนัก พบว่า สามารถขึ้นรูปเส้นใยได้ที่อัตราส่วน PVA ร้อยละ 70 ขึ้นไป และศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโดยให้อัตราส่วนระหว่าง CS/PVA เป็น 20/80 และเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เบลด 3, 4.5, 6, 7.4 และ 9% โดยน้ำหนัก พบว่า สารละลายพอลิเมอร์เบลดเข้มข้น 7.4 และ 9% โดยน้ำหนัก ให้เส้นใยเรียบปราศจากปม เมื่อลดความเข้มข้นของพอลิเมอร์เบลดลงเป็น 6% โดยน้ำหนัก พบปมเกิดขึ้นเล็กน้อย และเมื่อลดความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เป็น 4.5 และ 3% โดยน้ำหนัก พบปริมาณปมมากขึ้น ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2007 Guiping และคณะ ได้ศึกษาการขึ้นรูปสารละลายพอลิเมอร์เบลดของโคโทซาน พอลิเอทิลีนออกไซด์ กับ พอลิไวนิลไพร์โรลิโดน พบว่า การเพิ่มปริมาณของ PVA ทำให้เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเพิ่มขึ้น ส่วน PVP ไม่ทำให้ขนาดของเส้นใยเพิ่มขึ้น Guiping และคณะ ทำการสกัด PVP ออกจากเส้นใยด้วยคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) พบว่า เส้นใยที่มีปริมาณ PVP 30% โดยน้ำหนัก เส้นใยมีลักษณะผิวที่ขรุขระ เส้นใยที่มีปริมาณ PVP 40 และ 50% โดยน้ำหนัก เส้นใยที่ได้หลังจากการสกัด PVP ออก มีผิวขรุขระและพบรอยแตกเล็ก ๆ ยาวตามแนวเส้นใย และเมื่อปริมาณ PVP เป็น 60% โดยน้ำหนัก พบว่าเกิดร่องขนาดใหญ่ยาวตามแนวของเส้นใย

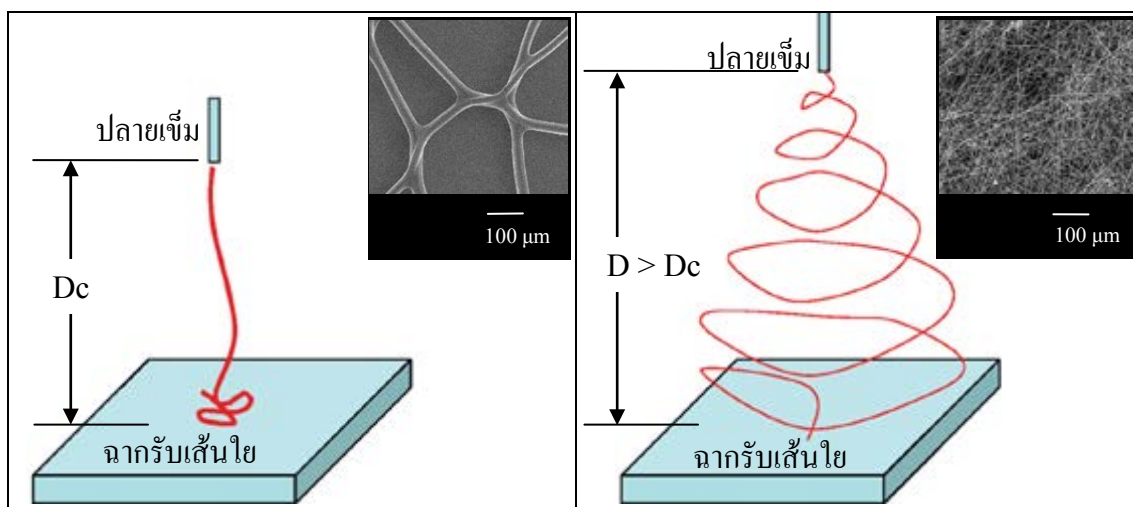
พอลิเอทิลีนออกไซด์ (PEO) เป็นพอลิเมอร์ที่ไม่มีประจุซึ่งสามารถเพิ่มความสามารถการฉีดเส้นใยโคโทซาน ปี 2008 Bhattarai และคณะ สามารถเตรียมเส้นใย CS/PEO จากสารละลายพอลิเมอร์เบลดอัตราส่วนของ CS/PEO คือ 90/10 ในระบบสารละลายกรดแอสซิดิกเข้มข้น 2% Triton X-100TM และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) ในอัตราส่วน 89.7/0.3/10 พบว่า อัตราการหมุน

ของฉากรับแบบลูกกลิ้งที่สูงทำให้เส้นใยมีระดับการจัดเรียงตัวมากขึ้น (degree of the fiber alignment) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการหมุนต่ำ ๆ เส้นใยที่ Bhattarai และคณะ เตรียมได้มีความสามารถยึดติดเซลล์ chondrocyte (HTB-94) ได้ดีกว่าฟิล์ม CS/PEO และ เซลล์นี้และเซลล์ osteoblast (MG-63) สามารถเจริญเติบโตบนแผ่นเส้นใยได้ สามารถใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อสำหรับเพาะเลี้ยงกระดูก

ในปี ค.ศ. 2008 Zhang และคณะ ได้เตรียมสารละลายไคโทซานเบลนด์กับพอลิเอทิลีนออกไซด์น้ำหนักโมเลกุลมาก (UHMWPEO) สารละลายพอลิเมอร์มีความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก โดยใช้สารละลายผสมของกรดแอสซิดิกเข้มข้น 3% กับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) อัตราส่วน 10 ต่อ 1 พบว่า พอลิเอทิลีนออกไซด์ช่วยเพิ่มความสามารถในการขึ้นรูปเส้นใยแม้จะใส่ในปริมาณน้อยก็ตาม สามารถขึ้นรูปเส้นใยได้เมื่อใส่ PEO เพียง 5% ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อลักษณะของเส้นใยคือ ระยะห่างระหว่างฉากรับกับปลายหัวเข็มที่ใช้ฉีดสารละลายพอลิเมอร์ รูปที่ 2.3 แสดงถ้าสารละลายพอลิเมอร์เบลนด์ CS/PEO ที่ออกมาจากปลายเข็ม พบว่า การตีเกลียวของเส้นใยพอลิเมอร์เกิดได้เมื่อระยะห่างระหว่างฉากรับกับปลายหัวเข็มมีค่ามากกว่าระยะวิกฤต (critical distance, D_c) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยจะอยู่ในช่วงนาโนเมตร (รูป 2.3 ขวา) แต่หากระยะห่างระหว่างฉากรับกับปลายหัวเข็มมีค่าไม่มากกว่าระยะวิกฤตแล้วเส้นใยไม่เกิดการตีเกลียว และไม่ถูกดึงยึด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยจะอยู่ในช่วงไมโครเมตร (รูป 2.3 ซ้าย) สำหรับสารละลายพอลิเมอร์เบลนด์เข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก มีอัตราส่วนของ CS/PEO เป็น 95/5 มีระยะวิกฤต 16 เซนติเมตร ดังนั้นการขึ้นรูปเส้นใย CS/PEO ที่มีห่างระหว่างฉากรับกับหัวเข็มมากกว่า 16 เซนติเมตร สามารถฉีดเส้นใยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วงนาโนเมตรได้

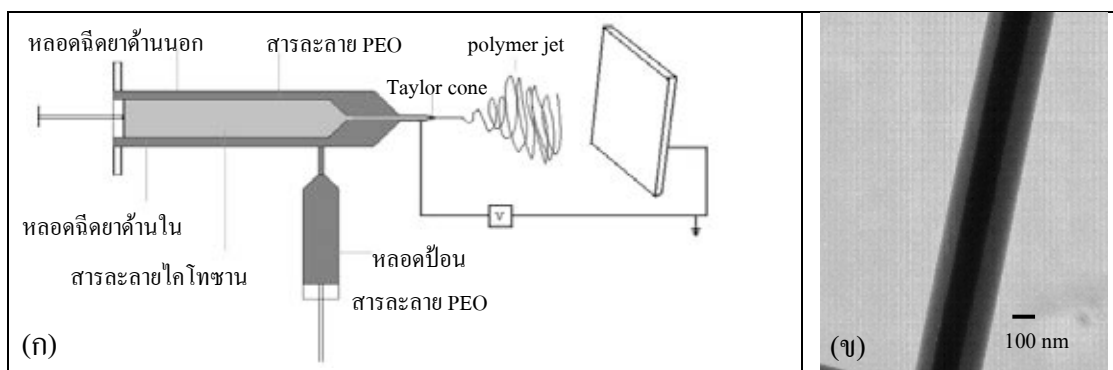
ในปี ค.ศ. 2008 Desai และคณะ ได้ขึ้นรูปเส้นใย CS/PEO จากสารละลายพอลิเมอร์เบลนด์อัตราส่วนระหว่าง CS/PEO คือ 95/10 ในระบบสารละลายกรดแอสซิดิกเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก และศึกษาผลของ degree of deacetylation ที่ส่งผลต่อความสามารถในการปั่นเส้นใยไคโทซาน พบว่า การขึ้นรูปเส้นใยของสารละลาย CS/PEO อัตราส่วน 90/10 จากสารละลายพอลิเมอร์เบลนด์ 1.33% โดยน้ำหนัก ในกรดแอสซิดิกเข้มข้น 75% โดยน้ำหนัก ใช้ไคโทซานที่มีค่า DD 67%, 70% และ 80% ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า หากใช้ไคโทซานที่มีค่า DD 67% เตรียมสารละลาย

ไคโทซาน พบปมในเส้นใยที่ได้จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป เมื่อใช้ไคโทซานที่มีค่า DD 70% และ 80% ปริมาณปมที่พบลดลงตามลำดับ และเส้นใยจากไคโทซานที่มีค่า DD 80% สามารถจับกับโลหะโครเมียมได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับไคโทซานที่มีค่า DD น้อยกว่า สามารถจับกับโลหะโครเมียมได้ 16 มิลลิกรัมต่อไคโทซาน 1 กรัม แผ่นเส้นใย CS/PEO ที่เตรียมได้สามารถนำไปใช้เป็นตัวกรองโลหะหนักจากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม



รูปที่ 2.3 ลำสารละลายพอลิเมอร์เบลนด์ CS/PEO ที่ออกมาจากปลายเข็ม

นอกจากจะใช้พอลิเมอร์เบลนด์ในการขึ้นรูปเส้นใยไคโทซานแล้ว อีกวิธีหนึ่งที่สามารถขึ้นรูปเส้นใยได้ คือ core sheath electrospinning เป็นกระบวนการฉีดเส้นใยซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (ก) วิธีนี้มีหลอดบรรจุสารละลายพอลิเมอร์ 2 ชนิด คือ สารละลายไคโทซานอยู่ชั้นใน และสารละลาย PEO อยู่ชั้นนอก สารละลายพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด จะไหลไปรวมกันที่ปลายเข็ม ทำให้ได้เส้นใยที่ได้มีลักษณะภายนอกเหมือนเส้นใยทั่วไป แต่ภายในเส้นใยจะมีชั้นของไคโทซานอยู่ด้านใน มี PEO ห่อหุ้มอยู่เปลือกนอก ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (ข) การล้าง PEO ออกด้วยน้ำ ก็จะได้เส้นใยไคโทซาน (Ojha *et al.*, 2008)



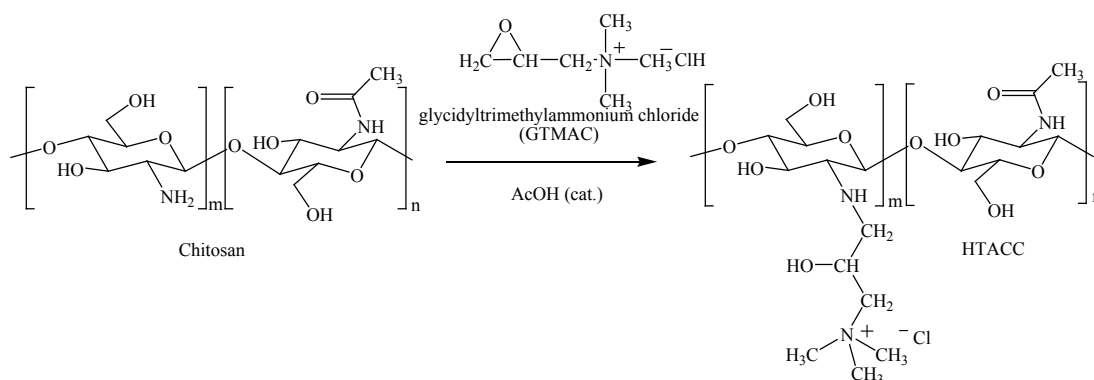
รูปที่ 2.4 การจัดอุปกรณ์สำหรับปั่นเส้นใย (ก) แบบ core sheath electrospinning, และ (ข) ลักษณะเส้นใยที่ได้

2.3 อนุพันธ์ของไคโทซาน

การใช้งานของไคโทซาน ถูกจำกัดด้วยสมบัติด้านการละลายของไคโทซาน เนื่องจากไคโทซานสามารถละลายและนำมาขึ้นรูปได้ในภาวะที่เป็นกรดเท่านั้น นักวิจัยจึงได้ศึกษาและพัฒนาอนุพันธ์ของไคโทซานให้มีสมบัติในการละลายที่ดีขึ้น ให้สามารถละลายได้ในสารละลายที่ช่วงความเป็นกรด-เบสที่กว้าง และเพื่อสะดวกต่อการขึ้นรูป รวมถึงการใช้งานของอนุพันธ์ของไคโทซานที่มากขึ้น

2.3.1 *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride และการใช้งาน

Seong และคณะ (2000) ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไคโทซานให้มีหมู่หมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม คือ *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride (HTACC) นำไคโทซานทำปฏิกิริยากับ glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) และหาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา พบว่าภาวะที่เหมาะสม คือ อัตราส่วนของไคโทซานต่อ GTMAG มีค่า 1:4 มีกรดแอสติกเจือจาง 1% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้อุณหภูมิ 60-80 °C ใช้เวลาทำปฏิกิริยา 18 ชั่วโมง ปฏิกิริยาแสดงในรูปที่ 2.5 พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มีหมู่ฟังก์ชันเป็นเกลือควอเทอร์นารีแอมโมเนียม มีสมบัติด้านฤทธิ์แบคทีเรีย *S. aureus*



รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride

จากการศึกษาของ Seong และคณะ (2000) พบว่าหากไคโทซานทำปฏิกิริยากับ GTMAC ในระบบที่มีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา GTMAC จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีโน แต่หากทำปฏิกิริยาในระบบสารละลายที่เป็นเบสนั้น GTMAC จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซี ในปี 2006 Cho และคณะได้ศึกษาอัตราส่วนของไคโทซานและ GTMAC ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ HTACC โดยศึกษาอัตราส่วน CS:GTMAC เป็น 1:3 - 1:6 ทำให้ degree of substitution (DS) เพิ่มขึ้นจาก 56% เป็น 74% HTACC ที่สังเคราะห์ได้ใช้ในงานด้าน delivery systems ในยา, DNA หรือโมเลกุลโปรตีนที่มีประจุลบ เช่น อินซูลิน

Kiatkamjornwong และคณะ (2010) ได้สังเคราะห์ HTACC และนำไปจุ่มอัดบนผ้าพอลิเอสเตอร์ ผลการทดสอบพบว่า ผ้าที่ผ่านการจุ่มอัด มีค่าความเข้มของสี (K/S) เพิ่มขึ้น มีอาณาบริเวณของสี (color gamut) ที่กว้างและมีปริมาตรมาก (gamut volume) การผลิตน้ำหนักรสี (tone reproduction) ดี สีบนผ้าพิมพ์คมชัด มีความเปรียบต่างของสี (contrast) ชัดเจน เนื่องจากพอลิเอสเตอร์เป็นผ้าที่ไม่ชอบน้ำ อีกทั้งผิวผ้ายังมีความเป็นประจุลบ การจุ่มอัด ผ้าด้วยอนุภาคที่เป็นไอออนบวกคือ HTACC จะทำให้ผ้าเกิดปฏิสัมพันธ์ด้านไอออนระหว่างประจุบวกและประจุลบของหมึกพิมพ์ซึ่งมีอนุภาคของสารสีมีประจุลบได้ดีขึ้น ทำให้สมบัติของงานพิมพ์ดีขึ้นทุกด้าน

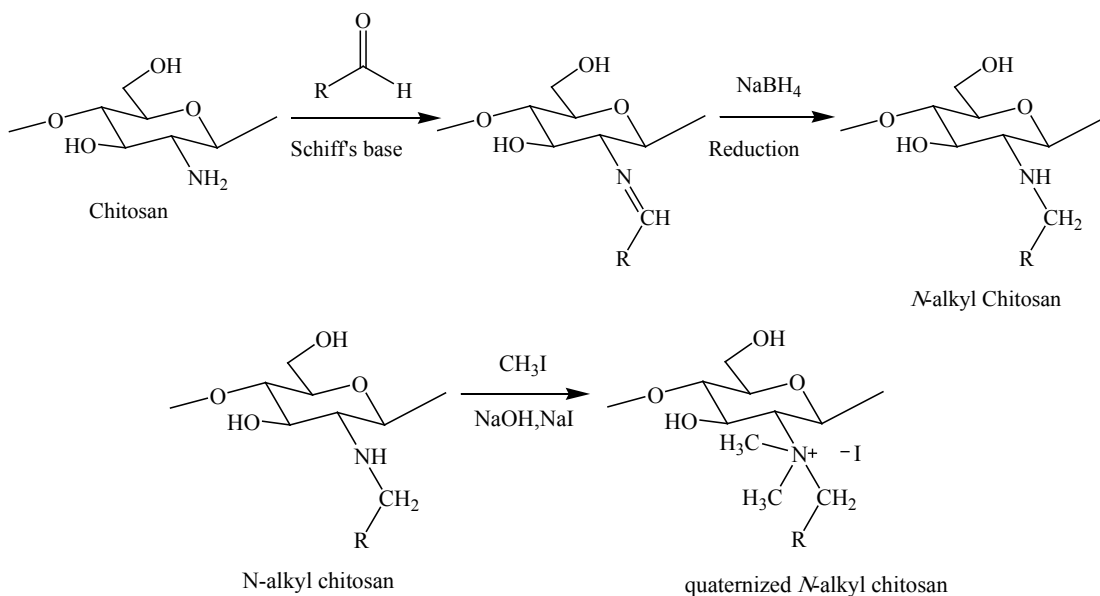
2.3.2 quaternized *N*-alkyl chitosan และการใช้งาน

Kim และคณะ (1996) ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ *N*-alkyl chitosan ได้เป็น quaternized *N*-alkyl chitosan และศึกษาความสามารถในการต้านฤทธิ์เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่า อนุพันธ์ของไคโทซานที่มีสภาพเป็นประจุบวกมากมีสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียดีกว่าไคโทซาน ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียคือ ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ซึ่งเพิ่มตามความยาวสายโซ่ของหมู่แอลคิลที่เพิ่มขึ้น สามารถเรียงลำดับสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรียจากน้อยไปมากได้ดังนี้ chitosan, *N,N,N*-trimethyl chitosan, *N,N*-dibutyl-*N*-methyl chitosan, *N*-octyl-*N,N*-dimethyl chitosan และ *N*-dodecyl-*N,N*-dimethyl chitosan

Vallapa (2007) สังเคราะห์ quaternized *N*-alkyl chitosan (รูปที่ 2.6) ด้วยกรรมวิธีเตรียมผิวไคโทซานให้มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมโดยการทำปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลชันของหมู่เอมีโนของไคโทซานด้วย formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde หรือ benzaldehyde ตามด้วยการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันกับ methyl iodide, ethyl iodide, butyl iodide หรือ octyl iodide ในภาวะต่างวิญภาค พบว่า ไคโทซานที่ตัดแปรผิวแล้วมีสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ดีกว่าฟิล์มไคโทซาน ผลเกิดจากความเป็นประจุบวกและความไม่ชอบน้ำที่เพิ่มขึ้นหลังจากตัดแปรผิวของไคโทซาน ทำให้ผิวไคโทซานเกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์ที่เป็นประจุลบของแบคทีเรียได้ดีขึ้น ในปี 2011 Vallapa และคณะ ศึกษาสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ของไคโทซานตัดแปรที่กล่าวมาข้างต้น พบว่า ไคโทซานตัดแปรมีสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด เหนือกว่าฟิล์มไคโทซาน และศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้วยเทคนิค SEM เมื่อสัมผัสกับฟิล์มไคโทซาน และฟิล์มไคโทซานตัดแปร พบว่าผนังเซลล์แบคทีเรียได้รับความเสียหายเป็นสาเหตุให้เซลล์แบคทีเรียตาย

Wiarachai (2008) เตรียมอนุภาคไคโทซานให้มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม ด้วยกรรมวิธีสองขั้นตอน ขั้นตอนหนึ่งเป็นการเชื่อมขวางอนุภาคไคโทซานแบบไอออนิก ตามด้วยการตัดแปรผิวของอนุภาคให้มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมโดยการทำปฏิกิริยากับแอลดีไฮด์ชนิดต่าง ๆ เช่น formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde หรือ benzaldehyde ขั้นตอนที่สองทำ

ปฏิกิริยาเมทิลเลชันกับ alkyl iodide หรือเมทิลเลชัน โดยตรงกับ methyl iodide เป็นการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรีย

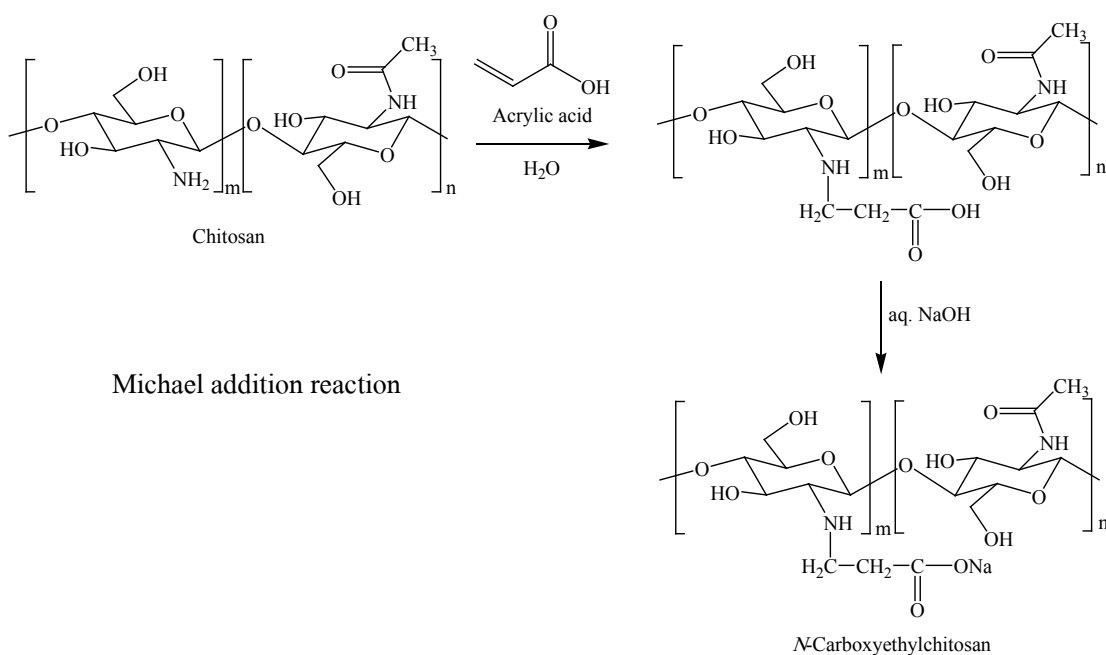


รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์ quaternized N-alkyl chitosan

นอกจากการใช้งานของ quaternized N-alkyl chitosan ในด้านต้านฤทธิ์แบคทีเรียแล้วยังสามารถประยุกต์ใช้งานในด้านการควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญ จากการศึกษาของ Hamman และคณะ (2001) ได้สังเคราะห์ $\text{N,N,N-trimethyl chitosan chloride}$ โดยนำไคโทซานมาทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันกับ เมทิลไอโอไดด์ ได้เป็น $\text{N,N,N-trimethyl chitosan iodide}$ แล้วทำการแลกเปลี่ยนไอออนจากไอโอไดด์เป็นคลอไรด์ การศึกษาพบว่าสารที่สังเคราะห์ได้สามารถดูดซับสารประกอบที่มีขี้ (Wiarachai and Kanchanasuwan, 2005)

2.3.3 *N*-carboxyethylchitosan (CECh) และการใช้งาน

N-carboxyethylchitosan (CECh) เป็นอนุพันธ์ของไคโทซานที่ได้รับการพัฒนาโดย Sashiwa และคณะ (2003) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีโนของไคโทซานกับกรดอะคริลิกในน้ำ ปฏิกิริยาเกิดผ่านกลไกแบบ Michael addition reaction จากนั้นเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลิกให้เป็นเกลือโซเดียมคาร์บอกซิเลตในส่วนของอะคริเลตด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 จากการศึกษาของ Sashiwa และคณะ พบว่า ไคโทซานที่มี %DD มากเกิดปฏิกิริยาได้ดี อีกทั้ง CECh ที่เตรียมได้สามารถละลายได้ในน้ำ และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ CECh ทางด้านการแพทย์ เช่น แผ่นโครงข่ายรูพรุนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



รูปที่ 2.7 การสังเคราะห์ *N*-carboxyethylchitosan

2.3.4 การขึ้นรูปอนุพันธ์ของไคโทซานโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

จากสมบัติที่ดีกว่าไคโทซานในด้านการละลายน้ำ ทำให้มีการขึ้นรูปอนุพันธ์ของไคโทซาน โดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตทำได้ด้วยการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

ในปี 2006 Ignatova และคณะนำไคโทซานไปทำปฏิกิริยากับ butyraldehyde ตามด้วยปฏิกิริยามethyl iodide สังกะหรณ์เป็น *N*-butyl-*N,N*-dimethyl chitosan (QCh) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคโทซานที่สามารถละลายน้ำได้ จากการศึกษาพบว่า สารละลาย QCh ไม่สามารถขึ้นรูปได้โดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถขึ้นรูปได้ง่าย จึงได้รับการเลือกมาเพื่อเพิ่มสมบัติด้านการขึ้นรูปโดยเทคนิคการปั่นเส้นใย โดยไฟฟ้าสถิต เบลนด์ QCh กับ PVA ในอัตราส่วนต่าง ๆ วัดค่าความหนืดและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ PVA ทำให้ความหนืดของสารละลายผสมเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความนำไฟฟ้าก็ลดลงด้วย อัตราส่วนที่สามารถขึ้นรูปเส้นใยจากพอลิเมอร์เบลนด์ได้คือ QCh/PVA เป็น 20/80 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาด 145 นาโนเมตร วัสดุที่ได้มีสมบัติในการต้านฤทธิ์แบคทีเรียทั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* เมื่อเทียบกับแผ่นเส้นใย PVA และในปีถัดมา Ignatova และคณะ ได้ศึกษาการขึ้นรูป QCh โดยเปลี่ยนชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มความสามารถในการสปินจาก PVA เป็นพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (PVP) ทดสอบหาภาวะและอัตราส่วนที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเส้นใย พบว่า อัตราส่วน QCh:PVP ที่เหมาะสมกับการขึ้นรูปเส้นใยคือ 80:20 ทำให้ได้เส้นใยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1500 นาโนเมตร วัสดุที่ได้มีสมบัติในการต้านฤทธิ์แบคทีเรียทั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* เมื่อเทียบกับแผ่นเส้นใย PVP

Mincheva และคณะ (2007) สังเคราะห์ *N*-carboxyethylchitosan (CECh) โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างไคโทซานกับ acrylic acid และศึกษาการขึ้นรูปเส้นใยโดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต ได้ขึ้นรูปเส้นใย CECh/PVA จากสารละลายพอลิเมอร์เบลนด์อัตราส่วนระหว่าง CECh/PVA คือ 1/75, 1/8 และ 20/80 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มปริมาณของ CECh ทำให้การนำไฟฟ้า (electrical conductivity), แรงตึงผิว (surface tension) ของสารละลายมีค่ามากขึ้น และความหนาแน่นของประจุมากขึ้น ส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดเล็กลงจาก 420 นาโนเมตร เป็น 100 นาโนเมตร Zhou และคณะ (2007) นั้นได้ศึกษาการขึ้นรูปของ CECh/PVA เพื่อเป็นวัสดุ

โครงข่ายรูพรุนสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้อัตราส่วน 50:50 จากนั้นนำเส้นใยมาเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ผลการศึกษาพบว่า แผ่นเส้นใยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค MTT Cytotoxicity assay และเซลล์ mouse fibroblasts (L929) ยังสามารถเจริญเติบโตได้บนแผ่นเส้นใย อนึ่ง MTT คือ สาร 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide MTT Cytotoxicity assay เป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหา cell viability โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase ใน mitochondria ทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น formazan product ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน หลังจากละลายสีภายในเซลล์ด้วย DMSO จึงทำการวัดหาปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

สรุปงานวิจัยการฉีดเส้นใยอนุพันธ์ของไคโทซาน และระบบตัวทำละลายที่สามารถขึ้นรูปได้โดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตสรุปได้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 อนุพันธ์ของไคโทซานและระบบตัวทำละลายที่สามารถขึ้นรูปได้โดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

พอลิเมอร์		สมบัติของไคโทซาน		ตัวทำละลาย	แหล่งอ้างอิง
ชนิดพอลิเมอร์	%DD	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	อัตราส่วน		
QCS/PVA	82	400	20/80	H ₂ O	Ignatova <i>et al.</i> , 2006
CECh/PVA	86-88	390	20/80	H ₂ O	Mincheva <i>et al.</i> , 2007
CECh/PVA	82.5	120	50/50	H ₂ O	Zhou <i>et al.</i> , 2007
QCS/PVP	82	390	80/20	H ₂ O	Ignatova <i>et al.</i> , 2007

หน่วยย่อยของไรโบโซมประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญ 2 ส่วนคือ ribosomal ribonucleic acid (rRNA) และ ribosomal protein

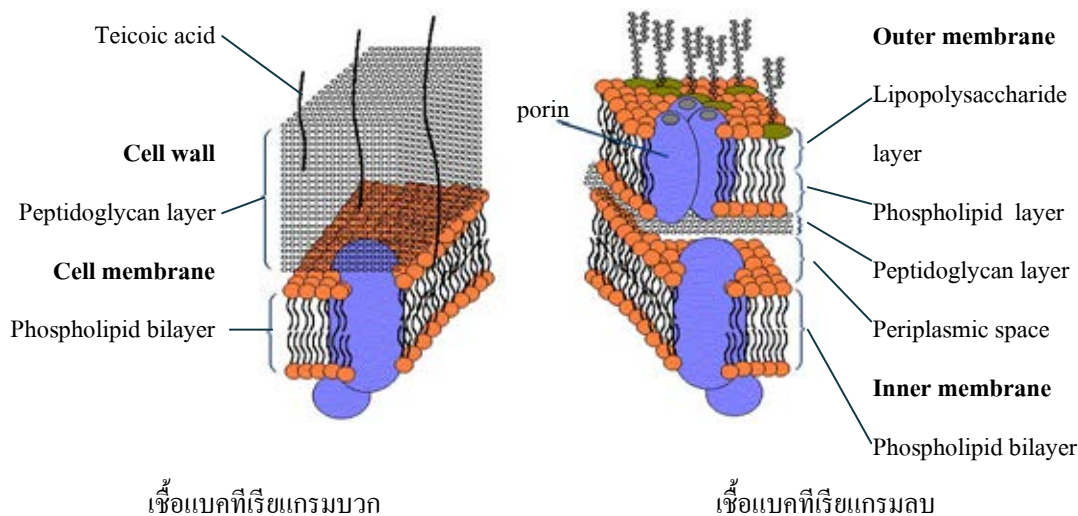
3) ระวังค์ (appendage) แบคทีเรียบางชนิดมีส่วนที่ยื่นออกจากผนังหุ้มเซลล์ ได้แก่ ฟลาเจลลา (flagella) และไพไล (pili) ฟลาเจลลาเป็นระวังค์ที่ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ พบได้ทั้งในเชื้อแกรมลบและแกรมบวกแต่ส่วนใหญ่จะพบในเซลล์รูปแท่ง ส่วนไพไลเป็นระวังค์ขนาดสั้นที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดพื้นผิวและถ่ายทอดสารพันธุกรรม จึงมีบทบาทในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากทำให้เชื้อสามารถเกาะกลุ่มกันบนผิวเซลล์หรืออวัยวะต่าง ๆ และก่อโรคต่อไปได้ ส่วนใหญ่พบในเชื้อแกรมลบ

4) ผนังหุ้มเซลล์ ประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ล้อมรอบส่วนไซโทพลาสซึม และผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งอยู่ชั้นนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ เชื้อบางชนิดอาจพบชั้นของแคปซูล (capsule) ล้อมรอบด้านนอกของผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่ง เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแกรมลบและแกรมบวกมีหน้าที่คล้ายคลึงกัน ในขณะที่ผนังเซลล์มีโครงสร้างแตกต่างกันหลายประการ ซึ่งมีผลให้แบคทีเรียย้อมติดสีแกรมที่ต่างกัน และเป็นพื้นฐานในการจำแนกเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ

2.4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียจำแนกออกเป็น 2 ประเภทโดยลักษณะทางจุลภาค คือ การติดสีแกรม หรือการย้อมสีแกรม (Gram's stain) ซึ่งจัดเป็นวิธีมาตรฐานในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย สามารถใช้ศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิดคือ แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) เป็นเชื้อที่สามารถคงสี crystal violet ไว้ภายในเซลล์โดยไม่ถูกล้างออกในขั้นตอนการล้างสี ทำให้เซลล์ติดสีม่วงน้ำเงิน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) เป็นเชื้อที่ไม่สามารถคงสี crystal violet ไว้ภายในเซลล์ ที่ให้สีถูกล้างออกในขั้นตอนการล้างสีเซลล์จึงแต่สีแดงของสี safranin

สมบัติของเชื้อแบคทีเรียในการติดสีแกรมบวก และแกรมลบเป็นผลมาจากความแตกต่างของโครงสร้างในชั้นผนังเซลล์ รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างของผนังหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของผนังหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

1) โครงสร้างในชั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก

ผนังเซลล์ของเชื้อแกรมบวกประกอบด้วยชั้นของสารเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycal) หรือชั้นมิวรีน (murein) ที่หนาและเรียงตัวซ้อนกันหลายชั้น ร่วมกับมีสารประกอบโปรตีนและไขมันแทรกอยู่ระหว่างชั้นเพปทิโดไกลแคนถึง 40-80% พบชั้นเพปทิโดไกลแคนสานกันเป็นร่างแหมากกว่า 40 ชั้น แต่ละสายของเพปทิโดไกลแคนเชื่อมกันเป็นร่างแหด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bridge) ทางด้านข้าง ส่วนประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ กรดไทโคอิก (teichoic acid) มีโครงสร้างเป็นสายพอลิเมอร์ของกรดฟอสเฟต มีหน้าที่เชื่อมต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ มีส่วนช่วยเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์ พบว่า กรดไทโคอิกมีสมบัติเป็นแอนติเจน สามารถกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันและใช้ในการจำแนกกลุ่มของเชื้อ โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยชั้นของฟอสโฟลิพิดซ้อนกัน 2 ชั้น เรียกว่า phospholipid bilayer มีโมเลกุลโปรตีนแทรกอยู่ทั่วไป

2) โครงสร้างในชั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

ผนังเซลล์ของเชื้อแกรมลบบางกว่าเชื้อแกรมบวกแต่มีความซับซ้อนมากกว่า ส่วนของผนังเซลล์เรียกว่า เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์เรียกว่า เยื่อหุ้มเซลล์

ชั้นใน (inner membrane) รวมถึงมีช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้ม 2 ชั้นเรียกว่า periplasmic space ซึ่งมีชั้นเพปติโดไกลแคนบาง ๆ 1-2 ชั้น หรือประมาณ 5-10% และสารประกอบโปรตีน รวมถึงเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารให้มีขนาดเล็กหรือทำหน้าที่สร้างส่วนประกอบของโครงสร้างเซลล์ โครงสร้างเพปติโดไกลแคนไม่แข็งแรงเหมือนเชื้อแกรมบวก เนื่องจากพันธะเพปไทด์มีจำนวนน้อย เยื่อหุ้มชั้นนอกประกอบด้วยโครงสร้างที่มีโมเลกุลเรียงซ้อนตัวเป็น 2 ชั้นเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ต่างที่เยื่อหุ้มเซลล์มีโครงสร้างที่สมมาตร ส่วนเยื่อหุ้มชั้นนอกมีโครงสร้างที่ไม่สมมาตร โดยชั้นในเป็นสายฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ในขณะที่ชั้นนอกประกอบด้วยสายไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lypopolysaccharide หรือ LPS) โครงสร้างที่ไม่สมมาตรทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีสมบัติแตกต่างจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีสมบัติป้องกันสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic molecule) และสารไขมันในเยื่อหุ้มชั้นนอกยังมีสมบัติป้องกันสารที่ชอบน้ำ (hydrophilic molecule) ผ่านเข้าสู่เซลล์ เช่น เชื้อแกรมลบในทางเดินอาหารสามารถป้องกันอันตรายต่อเซลล์จากเกลือน้ำดี แต่เนื่องจากโมเลกุลของสารอาหารหลายชนิด เช่น กรดแอมิโน น้ำตาล แร่ธาตุ เป็นสารที่มีสมบัติเข้ากับน้ำได้ดี แบคทีเรียจึงมีการสร้างกลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่าโพริน (porin) เป็นช่องทางให้สารดังกล่าวแพร่เข้าสู่เซลล์อย่างอิสระตามแรงดันและความเข้มข้น

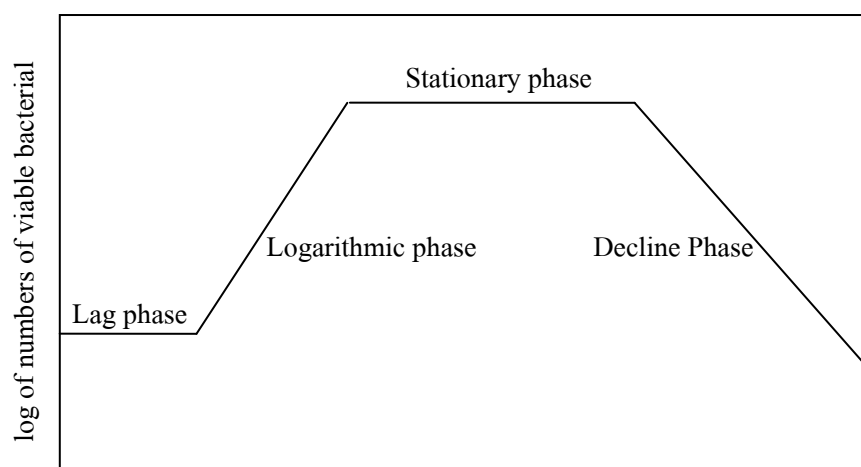
โมเลกุล LPS เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของคาร์โบไฮเดรตและไขมัน เป็นส่วนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอนโดทอกซิน (endotoxin) ในเชื้อแกรมลบ เอนโดทอกซินเป็นส่วนประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ และสารนี้ถูกปล่อยเมื่อผนังเซลล์แตกหรือสลายตัว โมเลกุล LPS มีประจุลบ ซึ่งมีอะตอมที่มีประจุบวก เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่าง LPS

2.4.3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียอาศัยการทำงานของระบบสรีรวิทยาภายในเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการเมแทบอลิซึม ประกอบด้วยกระบวนการ 2 แบบคือการย่อยสลายสารอาหารเพื่อทำให้เกิดพลังงาน และนำพลังงานที่เกิดขึ้นไปใช้ในการสร้างสารชีวภาพเพื่อนำไปสู่กระบวนการสร้างและทำงานของส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์

เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญ ขยายขนาดของเซลล์จนถึงระดับหนึ่ง จึงเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยแบ่งเซลล์จากเซลล์แม่ 1 เซลล์ เป็นเซลล์ลูก 2 เซลล์ เรียกว่า binary fission เซลล์ลูกทั้ง 2 ตัวประกอบด้วยโครงสร้างทางพันธุกรรมและส่วนประกอบของเซลล์เหมือนกันทุกประการ และสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป ระยะเวลาในวงจรชีวิตการเจริญของเซลล์แบคทีเรียตั้งแต่กำเนิดขึ้นจากการแบ่งตัวของเซลล์แม่จนกระทั่งแบ่งตัวได้เซลล์ลูก เรียกว่าระยะแบ่งตัว (generation time หรือ doubling time) ซึ่งอาจแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับสมบัติพื้นฐานของเชื้อแต่ละชนิดและสิ่งแวดล้อม เชื้อที่มีระยะแบ่งตัวสั้นจึงมีอัตราการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว

ลักษณะแบบแผนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็นระยะได้ 4 ระยะ ดังแสดงในกราฟการเจริญ (growth curve) ของรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 กราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์แบคทีเรีย

1) **Lag phase** เป็นระยะปรับตัวของเซลล์เพื่อเตรียมตัวสำหรับการเจริญและการแบ่งตัวเมื่อเซลล์เข้าสู่สภาพที่เหมาะสมแก่การเจริญ โดยเฉพาะภายหลังจากที่กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์หยุดลงเนื่องจากเซลล์อยู่ในภาวะไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ เช่น ภาวะขาดแคลนอาหาร แต่เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เซลล์จะเริ่มสร้างเอนไซม์และปัจจัยที่สำคัญที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมอีกครั้ง การเปลี่ยนแปลงเซลล์ในระยะนี้จะเป็นไปอย่างช้า ๆ และไม่พบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างชัดเจน ที่ปลายของระยะนี้หลังจากเซลล์สะสมอาหารและ

ปัจจัยอื่นที่จำเป็นต่อการเจริญอย่างเพียงพอ ร่วมกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ได้รับการกระตุ้นให้ทำงานในระดับที่เหมาะสมเซลล์จะเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวน

2) **Logarithmic phase (exponential phase)** เซลล์เพิ่มจำนวนด้วยอัตราเร่งสูงสุดอย่างต่อเนื่อง และการเพิ่มจำนวนแปรผันตรงตามเวลา ระยะแบ่งตัวของเชื้อ และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ สารอาหาร ส่วนประกอบของแก๊ส ระยะนี้อัตราการเจริญมากที่สุด เซลล์ว่องไวที่สุด ใช้สารอาหารอย่างรวดเร็ว จึงมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อสิ่งแวดล้อม และอาจเกิดสภาพไม่เหมาะสมในการเจริญ เช่น ปริมาณสารอาหารต่ำลง แก๊สออกซิเจนลดลง ความเป็นกรด-เบสเปลี่ยนแปลง และการสะสมของสารพิษหรือของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อลดลงในระยะต่อไป

3) **Stationary phase** เมื่อเซลล์เข้าสู่สภาพที่ไม่เหมาะต่อการเจริญ อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์จะลดลงจนสมดุลกับอัตราการตายของเซลล์ ทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตอยู่ในระดับคงตัว และอาจมีการจับสารพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

4) **Phase of decline (death phase)** ระยะสุดท้าย อัตราการตายของเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นจนมากกว่าอัตราการแบ่งตัว เป็นผลให้จำนวนเซลล์ลดต่ำลง เซลล์บางส่วนที่ยังมีชีวิตอาจเข้าสู่ภาวะหยุดนิ่งที่เรียกว่า สภาพพักตัว (dormancy) ซึ่งเซลล์มีเมแทบอลิซึมต่ำเพื่ออนุรักษ์พลังงานไว้ จนกว่าเซลล์จะเข้าสู่ภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอีกครั้ง

2.4.4 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ (Mode of action of antibacterial agent)

(นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2550)

1) การทำลายที่ผนังเซลล์ หรือการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ไลโซโซม (lysozyme) ที่พบในน้ำตา เม็ดเลือดขาว เอนไซม์นี้ย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์ให้เซลล์แตก สารเคมีบางชนิดไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโต มีผลทำให้เกิดเซลล์ไม่มีผนังเซลล์ มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (protoplast) ซึ่งถ้าไม่เลี้ยงไว้ในสภาพที่เหมาะสม เซลล์จะแตกได้ หรือการใช้ยาเพนิซิลลินมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

2) เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยอมให้สารผ่าน (cell permeability)

เยื่อหุ้มเซลล์มีสมบัติที่ยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่เซลล์ ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์นี้ถูกทำลายก็มีผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์หยุดชะงัก และทำให้เซลล์ตาย สารเคมีบางอย่าง เช่น ฟีนอล หรือ สบู่ สามารถไปเปลี่ยนสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออกมา

3) การเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพโปรตีนและกรดนิวคลีอิก

เซลล์ที่มีชีวิตต้องมีโปรตีนและกรดนิวคลีอิกอยู่ในเซลล์ในสภาพปกติ ถ้ามีสารเคมีหรือสภาพใด ๆ ที่มีผลมาทำให้โปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไปจากสภาพปกติ มีผลให้เซลล์ตาย เช่น อุณหภูมิสูง สารเคมีเข้มข้นมากจะทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนแข็ง และไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้

4) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ต่าง ๆ จำเป็นในปฏิกิริยาเคมีของกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ สารประเภทไซยาไนด์ยับยั้งไซโตโครมออกซิเดส ฟลูออไรด์ยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการไกลโคไลซิส ธาตุแฮโลเจน ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และโลหะหนัก เช่น เงิน ทองแดง พรอทรวมตัวกับ sulfhydryl group ของเอนไซม์ในเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปและไม่สามารถทำงานได้

5) การป้องกันการสร้างเมทาบอลิต์ (antimetabolites)

เมทาบอลิต์เป็นสารที่จำเป็นในกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่น ในการสังเคราะห์กรดโฟลิก จูลินทรีย์จำเป็นต้องใช้ p-aminobenzoic acid ซึ่งสารนี้มีโครงสร้างคล้าย sulfanilamide ดังนั้นการใช้ sulfanilamide เข้าแข่งทำปฏิกิริยาแทน p-aminobenzoic acid การสังเคราะห์โฟลิกจะหยุดชะงัก

6) การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

สารบางประเภทยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ไปขัดขวางการสร้างพิวรีน และไพริมิดีน ซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของกรดนิวคลีอิก และขัดขวางการรวมตัวของนิวคลีโอไทด์เข้าเป็น

กรดนิวคลีอิก ส่งผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติไป และเซลล์ตายในที่สุด

สารเคมีที่ใช้ควบคุมจุลินทรีย์และกลไกการออกฤทธิ์ สรุปดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารเคมีที่ใช้ควบคุมจุลินทรีย์

สาร	การออกฤทธิ์
1. ฟีนอล	ทำให้เซลล์แตกและทำให้โปรตีนตกตะกอน ขยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้กรดแอมิโนรั่วออกจากเซลล์
2. แอลกอฮอล์	ทำให้โปรตีนและเอนไซม์เสียสภาพ และละลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ดึงน้ำออกจากเซลล์
3. แอลกอฮอล์ เช่น ไอโอดีน คลอรีน	ทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดส์ รวมตัวกับ sulfhydryl group ของเอนไซม์ในเซลล์
4. โลหะหนัก	รวมตัวกับโปรตีนภายในเซลล์และขยับยั้งการทำงานของโปรตีนตกตะกอน
5. ลิ	รวมตัวกับองค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิก
6. สบู่และผงซักฟอก	ลดแรงตึงผิวของน้ำ ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้โปรตีนในเซลล์เสียสภาพ
7. สารประกอบควอเตอร์นารี แอมโมเนียม	ทำให้โปรตีนเสียสภาพเกิดการขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิส ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์
8. แก๊ส เช่น ฟอรัมาลดีไฮด์ เอทิลีนออกไซด์	รวมตัวกับ โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ขยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
9. กรด-เบส	ทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สมบัติการยอมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น

2.4.5 กลไกการต้านจุลินทรีย์ของไคโทซานและอนุพันธ์ของไคโทซาน

เชื่อว่าไคโทซานถูกสามารถต้านฤทธิ์แบคทีเรียได้ เนื่องจากหมู่เอมีโนที่ถูกโปรโตเนต ในภาวะที่ $\text{pH} < 6.5$ นักวิจัยหลายได้ศึกษากลไกการต้านฤทธิ์แบคทีเรียและเชื่อว่า การที่ไคโทซาน ทำอันตรกิริยากับผนังเซลล์แบคทีเรียเป็นเหตุให้เซลล์แบคทีเรียตาย ในปี ค.ศ. 1999 Shahidi และคณะ รายงานกลไกการต้านฤทธิ์แบคทีเรียเมื่อใช้ด้านอาหารในหลายลักษณะ คือ ปฏิกริยาระหว่าง ประจุบวกบนไคโทซานกับประจุลบบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและ แบคทีเรียตาย ไคโทซานสามารถรวมตัวกับโลหะหนักเกิดสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งยับยั้งการสร้าง สารพิษ (toxin) และยับยั้งการเติบโตของจุลชีพ ไคโทซานกระตุ้นการป้องกันตัวของสิ่งมีชีวิตที่จุล ชีพอาศัยอยู่และยังการทำงานของเอนไซม์ สามารถจับตัวกับ DNA ยับยั้งการสร้าง mRNA

จากการศึกษาของ Lui และคณะ (2004) พบว่า สารละลายไคโทซานแอซิเตตสามารถ นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* โดยศึกษาพื้นฐานวิทยาของเส้นใยด้วยเทคนิค transmission electron microscope (TEM) พบว่า เซลล์แตก การทดสอบความเป็นปึกแผ่น (integrity) ของผนัง แบคทีเรีย พบว่า มีองค์ประกอบจากเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจพบ แสดงว่าผนังเซลล์แบคทีเรียถูก ทำลาย Lui และคณะ รายงานว่า ไคโทซานเกิดอันตรกิริยากับผนังฟอสโฟไลพิดที่สังเคราะห์ขึ้น เนื่องจากหมู่แอมโมเนียมในไคโทซานแอซิเตตเกิดอันตรกิริยากับหมู่ฟอสฟอริลในฟอสโฟลิพิด สังเคราะห์ การเพิ่มปริมาณไคโทซานทำให้การผ่านเข้าออกของสารเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดการรบกวนผนัง เซลล์และสารในเซลล์ถูกปล่อยออกมา เป็นผลให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

ไคโทซาน (DD 84%), กรดไตรฟลูออโรแอซิดิก (TFA, CF_3COOH) และไกลซีดีลไทรเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (GTMAC analytical grade, Fluka (Germany)) ไคคลอโรมีเทน (DCM) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Lab-Scan Analytical Science (Ireland)) พอลิเอทิลีนออกไซด์ (PEO, MW = 600 kDa) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) เมทิลไอโอดีน (CH_3I) กลูตารัลดีไฮด์ (GT) และ phosphate buffer saline (PBS) จาก Sigma-Aldrich (US) เบนซัลดีไฮด์ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$) จาก Acros Organic (US) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จาก Ajax Finechem (New Zealand) เมทานอล (CH_3OH) และ เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) จาก Fisher Scientific (UK), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Tryptic soy agar และ Soresen's phosphate buffer ได้รับอนุเคราะห์จากศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

3.1 อุปกรณ์

3.2.1 สแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโกปี (Scanning electron microscopy, SEM)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของแผ่นเส้นใยอิเล็กโทรสปิน โดยสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโกปี (JEOL JSM-5200, Japan)

3.2.2 อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)

ศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีโดยอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Nicolet Nexus 671, UK)

3.2.3 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance, NMR)

ศึกษา %DD ของไคโทซานโดยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Varian, model Inova 500 spectrometry, US)

3.2.4 เอกซ์เรย์โฟโตอิเล็กตรอนสเปกโทรสโกปี (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)

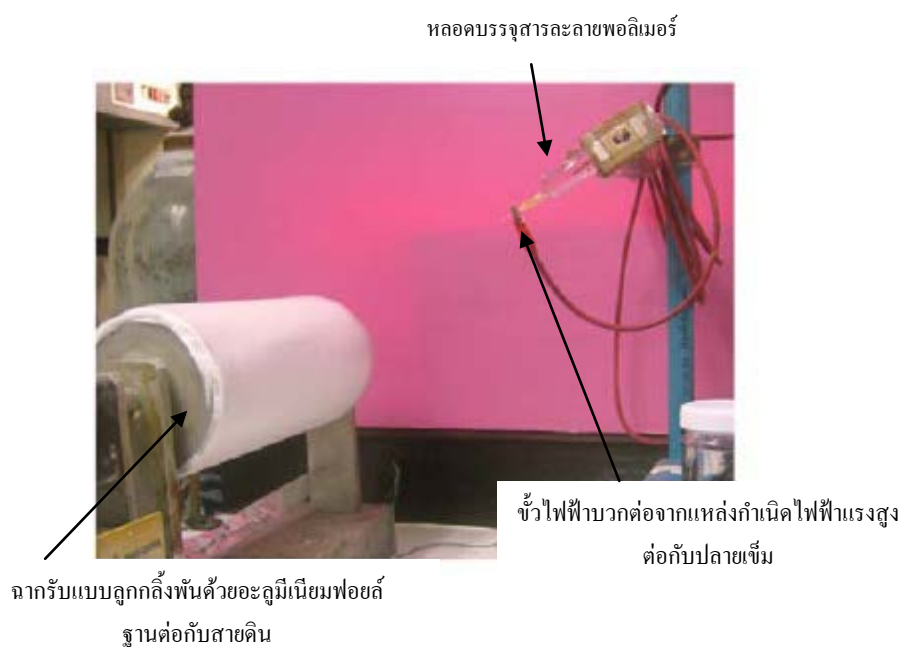
ค่าพลังงานยึดเหนี่ยว (binding energy) ของอะตอมที่สนใจ วิเคราะห์โดย Thermo Fisher Scientific Thetaprobe XPS (UK)

3.2.5 เอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชันสเปกโทรสโกปี (X-ray Diffraction, XRD)

ศึกษาความเป็นผลึกโดยเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชันสเปกโทรสโกปี (Bruker model D8 advance, Germany)

3.2 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมแผ่นเส้นใยไคโทซานโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต



รูปที่ 3.1 อุปกรณ์การขึ้นรูปเส้นใยโดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

เตรียมสารละลายไคโทซาน 6%, 7% และ 8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ละลายไคโทซานในระบบสารละลายผสมของ TFA และ DCM อัตราส่วน 70 ต่อ 30 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำสารละลายไคโทซานไปขึ้นรูปโดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต เตรียมสารละลายผสมของไคโทซานและพอลิเอทิลีนออกไซด์ให้สารละลายพอลิเมอร์มีความเข้มข้น 7% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใส่ PEO 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมตามลำดับ และใช้สารละลายผสมของ TFA และ

DCM อัตราส่วน 70 ต่อ 30 เป็นตัวทำละลาย ใช้เวลาในการละลายพอลิเมอร์เบลนด์ 18 ชั่วโมง นำไปขึ้นรูปโดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต ใช้ภาวะการฉีดเส้นใยดังนี้ ศักย์ไฟฟ้า 25 กิโลโวลต์ ระยะทางระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 20 เซนติเมตร ปล่อยสารละลายพอลิเมอร์ให้ไหลด้วยแรงโน้มถ่วง โดยระนาบของเข็มฉีดยาที่บรรจุสารละลายพอลิเมอร์ทำมุม 45 องศาับแนวตั้ง ใช้สารละลายพอลิเมอร์ 40 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการปั่นเส้นใย 72 ชั่วโมง อุปกรณ์การขึ้นรูปเส้นใยด้วยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตได้แสดงดังรูปที่ 3.1

3.3.2 ลักษณะวิทยาของแผ่นเส้นใย

นำแผ่นเส้นใยตัวอย่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร วางบนฐานรอง หลังจากนั้นเคลือบผิวหน้าของแผ่นเส้นใยด้วยทองคำเป็นเวลา 3 นาที ด้วย JEOL JFC-1100E sputtering device แล้วนำไปศึกษาสัณฐานวิทยาโดยเทคนิค SEM

3.3.3 การเชื่อมขวางแผ่นเส้นใยด้วยกลูตารัลดีไฮด์

ตริ่งแผ่นเส้นใย CS/PEO กว้าง 3 เซนติเมตร ยาว 12 เซนติเมตร จำนวน 5 แผ่น ด้วยแผ่นอะลูมิเนียมแล้วนำไปอังไของกลูตารัลดีไฮด์ในกล่องขนาดยาว 30 เซนติเมตร กว้าง 20 เซนติเมตร ก้นกล่องมีถาดแก้วบรรจุกลูตารัลดีไฮด์ 10 มิลลิลิตร วางแผ่นเส้นใยสูงจากก้นกล่อง 15 เซนติเมตร ใช้เวลาในการเชื่อมขวาง 6 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในตู้สุญญากาศเป็นเวลา 1 วัน

3.3.4 การสะเทินแผ่นเส้นใยไคโทซาน

แช่แผ่นเส้นใย CS/PEO ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 5 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างแผ่นเส้นใยด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง วางแผ่นไว้ให้แห้ง 1 วัน

3.3.5 การเตรียม HTACC

การกราฟต์ GTMAC ลงบนแผ่นเส้นใยไคโทซานแบ่งการวิจัยเป็น 2 ชุด 1) การกราฟต์ GTMAC ลงบนแผ่นเส้นใยไคโทซานที่เชื่อมขวาง และ 2) การกราฟต์ GTMAC ลงบนแผ่นเส้นใยไคโทซานที่เชื่อมขวางและสะเทินด้วยโซเดียมคาร์บอเนต แต่ละวิธีใช้แผ่นเส้นใยขนาดกว้าง 3 เซนติเมตร ยาว 12 เซนติเมตร จำนวน 4 แผ่น ใสลงในขวดบรรจุน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร

40 มิลลิลิตร อัตราส่วนโดยโมลของไคโทซานต่อ GTMAC เป็น 1:4 ทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศปกติ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลงล้าง GTMAC ส่วนเกินออกด้วยเอทานอล 3 ครั้ง วางให้แห้งในตู้สุญญากาศเป็นเวลา 1 วัน เพื่อระเหยเอทานอลส่วนที่เหลือออกจากแผ่นเส้นใย

3.3.6 การตรวจสอบคุณลักษณะ

การหาปริมาณ %DD ของไคโทซาน ทำได้โดยนำไคโทซานไปสารละลายใน 2% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ วิเคราะห์ด้วย ^1H NMR ของไคโทซาน ภายใต้คลื่นความถี่ 400 MHz

เก็บชิ้นงานตัวอย่างในตู้สุญญากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาบดกับ KBr และอัดเป็นแผ่นบาง แล้วศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของตัวอย่างโดยเทคนิค FT-IR

นำชิ้นงานตัวอย่างมาศึกษาค่าพลังงานยึดเหนี่ยว (binding energy) ของอะตอมที่สนใจโดยเทคนิค XPS ใช้แหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์ Monochromatic Al $K\alpha$ วิเคราะห์ photoelectron ที่กระเจิงที่มุม 50 องศา พื้นที่ของการวิเคราะห์ 400 ไมโครเมตร x 400 ไมโครเมตร ที่ความลึก 4-8 นาโนเมตรจากผิวของตัวอย่าง (energy calibration ค่า binding energy ของ C-C/C-H components ใน C 1s peak ที่ 284.6 eV)

นำไคโทซาน, เส้นใย CS/PEO, เส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการเชื่อมขวาง และเส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการเชื่อมขวางและการสะเทิน มาศึกษาความเป็นผลึกโดยเทคนิค XRD ใช้แหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์ Cu $K\alpha$ สแกน 2θ ในช่วง 5-50 องศา ความเร็วสแกน 1 องศาต่อนาที

3.3.7 ระดับขั้นการบวมตัว (degree of swelling) ของ HTACC

นำแผ่นเส้นใย HTACC ที่ได้จากการทำปฏิกิริยานาน 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง มาแช่น้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอาแผ่นเส้นใยออกจากอ่างแช่ สอดในกระดาษทิชชูและวางน้ำหนักกดทับ 500 กรัม เพื่อรีดน้ำส่วนเกินออก คำนวณหาระดับขั้นการบวมตัวได้ดังสมการ 3.1 ต่อไปนี้

$$\text{degree of swelling (\%)} = \frac{(W_{st} - W_{dt})}{W_{dt}} \times 100 \quad 3.1$$

โดย W_{st} คือ น้ำหนักแผ่นเส้นใยที่บวมน้ำ และ W_{dt} คือ น้ำหนักแผ่นเส้นใยที่แห้ง

3.3.8 การเตรียม *N*-benzyl chitosan fiber

นำแผ่นเส้นใย CS/PEO รูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.4 เซนติเมตร 5 แผ่น (40 มิลลิกรัม) ใส่ในขวดแก้วที่บรรจุสารละลายเบนซัลดีไฮด์ในเมทานอล 5 % (v/v) 4.3 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เติมโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 120 มิลลิกรัม (1.5 เท่าของโมลเบนซัลดีไฮด์) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแผ่นเส้นใยออกมาล้างด้วยเมทานอล 3 ครั้ง ตากให้แห้งในตู้สุญญากาศเป็นเวลา 1 วัน

3.3.9 การเตรียม *N*-Benzyl-*N,N*-dimethyl chitosan fiber

นำแผ่นเส้นใย *N*-benzyl chitosan รูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.4 เซนติเมตร 5 แผ่น (40 มิลลิกรัม) ใส่ลงในสารละลายผสมของโซเดียมไอโอดัดและโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้น 0.2 M และ 0.4 M ตามลำดับ เติมเมทิลไอโอดัดให้มีความเข้มข้น 1.6 M ในสารละลาย ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง นำแผ่นเส้นใยออกมาล้างด้วยเมทานอล 3 ครั้ง ตากให้แห้งในตู้สุญญากาศเป็นเวลา 1 วัน

3.3.10 วิจัยการต้านฤทธิ์จุลินทรีย์

การทดสอบนี้ใช้แบคทีเรีย 2 ชนิด คือ เชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 (เป็นตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก) และเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 (เป็นตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ) นำแผ่น HTACC และ แผ่นเส้นใยไคโทซาน ไปฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียม *S. aureus* ใน TSB วัดความขุ่นที่ค่า OD 600 นาโนเมตร ซึ่งมีจำนวนเชื้อประมาณ $1-5 \times 10^8$ หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/มิลลิลิตร) เจือจางให้มีเชื้อประมาณ $1-5 \times 10^5$ หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ควบเชื้อ 6 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีแผ่นเส้นใยบรรจุ 30 มิลลิกรัม อยู่แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าตลอดเวลา ตามเวลาที่กำหนด เมื่อครบเวลานำสารละลายจากขวดที่บ่มครบตามเวลา มาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และเกลี่ย (spread) บน tryptic soy agar (TSA) plate นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจำนวนเชื้อโดยวิธี total plate count และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ลดลงของแบคทีเรีย (%reduction) จากสมการ

$$\% \text{reduction} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \quad 3.2$$

โดย A คือ จำนวนเชื้อที่มีชีวิตในสารควบคุม และ B คือ จำนวนเชื้อที่มีชีวิตในสารตัวอย่าง

3.3.11 สันฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย

นำแผ่นเส้นใยตัวอย่างขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร ไปฆ่าเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 20 นาที หยอดเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และเชื้อ *E. coli* ลงในแผ่นเส้นใยที่เตรียมไว้ นำแผ่นเส้นใยไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรึงเซลล์ด้วยกลูตารัลดีไฮด์

การตรึงเซลล์ทำได้ดังนี้ ล้างแผ่นเส้นใยด้วย Phosphate buffer saline (PBS) 1 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย 3% ของกลูตารัลดีไฮด์เพื่อให้ผนังเซลล์คงรูป ในแผ่นไฟเบอร์ที่บ่มแบคทีเรีย แช่ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแช่แผ่นเส้นใยในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 30, 50, 70, 90 และ 100% โดยปริมาตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 นาที ตากแผ่นเส้นใยให้แห้งและนำไปศึกษาสันฐานวิทยาด้วยเทคนิค SEM

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 %degree of deacetylation (%DD) ของไคโทซาน

ไคโทซานเตรียมได้จากปฏิกิริยา deacetylation ของไคติน ร้อยละของหมู่ acetyl ในไคตินที่ถูกเปลี่ยนเป็นหมู่เอมิโนในไคโทซานเรียกว่า degree of deacetylation (%DD) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR โดยใช้ 2% CD₃COOD/D₂O เป็นตัวทำละลาย (Hirai *et al.*, 1991) แสดงสเปกตรัม H¹ NMR ของไคโทซานในรูปที่ 4.1 chemical shift ที่ 2.3 ppm. คือ หมู่ CH₃ บน N-acetyl บนไคติน chemical shift ที่ 3.4 ppm. แสดงถึงโปรตอนที่อยู่ตำแหน่งที่ 2 ของไคโทซาน โปรตอนในตำแหน่งที่ 3, 4, 5, 6 และ 6' แสดงค่า chemical shift ที่ 3.8-4.3 ppm. และ โปรตอนในตำแหน่งที่ 1 แสดง chemical shift ที่ 5.1 ppm.

Integral intensity ของโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4.1 สามารถคำนวณ %DD ของไคโทซานได้ 84% ตามสมการของ Hirai *et al.* (1991) ดังต่อไปนี้

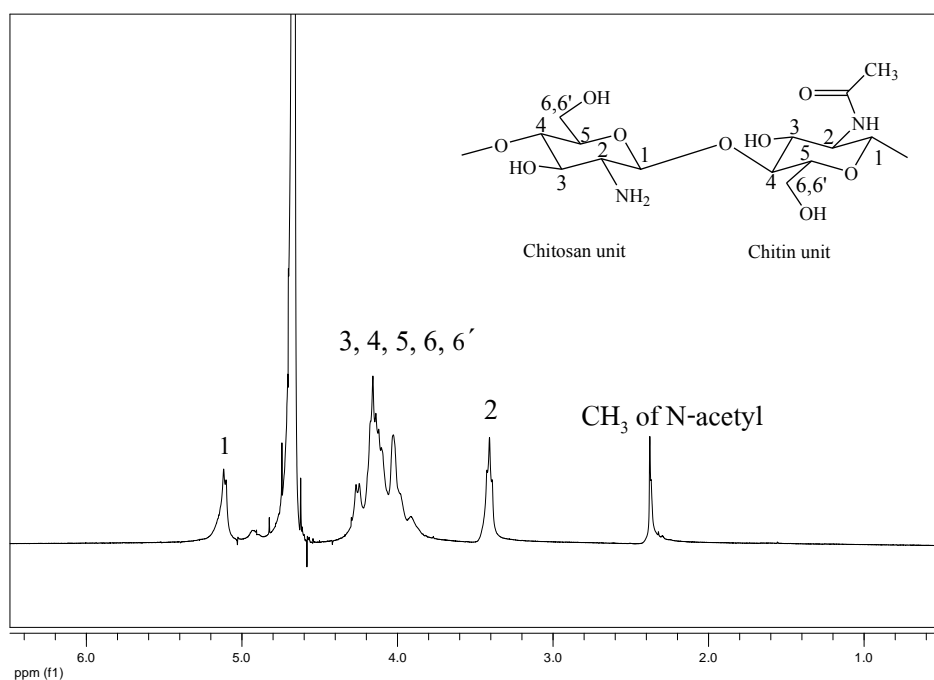
$$\%DD = \left[1 - \frac{(I_{N\text{-acetyl}}/3)}{(I_{H1-H6}/7)} \right] \times 100 \quad 4.1$$

เมื่อ $I_{N\text{-acetyl}}$ คือ Integral intensity ของหมู่ CH₃ บน N-acetyl บนไคติน

I_{H1-H6} คือ Integral intensity รวมของโปรตอนในตำแหน่งที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 6'

ตาราง 4.1 Integral intensity ของโปรตอนตำแหน่งต่าง ๆ บนไคโทซาน

Chemical Shift (ppm)	Proton	Integral intensity
5.1	H1	5.3
3.8-4.3	H3, H4, H5, H6, H6'	32.3
3.4	H2	5.6
2.3	N-acetyl	3.0



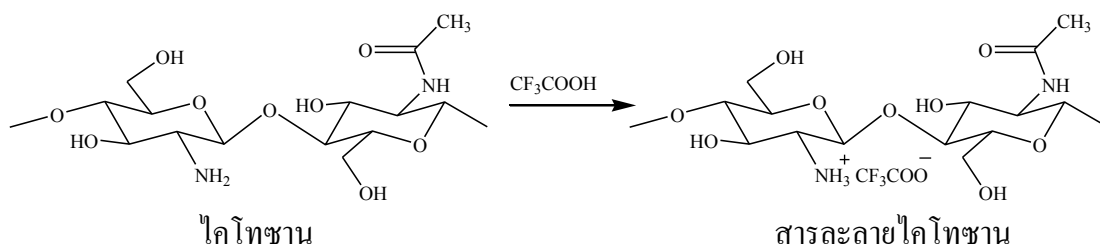
รูปที่ 4.1 สเปกตรัม H^1 NMR ของไคโทซาน

4.2 การเตรียมแผ่นเส้นใยไคโทซานโดยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง

อิเล็กโตรสปินนิง หรือ การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต เป็นเทคนิคที่ใช้ขึ้นรูปเส้นใยไคโทซาน โดยดึงยัดสารละลายไคโทซานด้วยแรงทางไฟฟ้าให้ไปตกบนฉากรับ ระหว่างที่ไคโทซานเดินทางไปยังฉากรับนั้น ตัวทำละลายจะระเหยออกไปทำให้ได้เส้นใยไคโทซานบนฉากรับ ปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการนี้ คือ สมบัติของไคโทซาน และตัวทำละลายที่ใช้

จากการศึกษาด้วยเทคนิค NMR พบว่าไคโทซานที่ใช้ในงานวิจัยมี %DD = 84% ซึ่งเหมาะสมกับการวิจัยนี้ เนื่องจากไคโทซานที่มี %DD มากกว่า 70% สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีฤทธิ์กรด สามารถขึ้นรูปได้ง่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไคโทซานที่มี %DD ต่ำ รวมถึงให้เส้นใยที่มีปริมาณของปมน้อยกว่า (Desai *et al.*, 2008) ในงานวิจัยนี้ใช้สารละลายผสมของกรดไตรฟลูออโรแอซิดิก (TFA) 70% และไดคลอโรมีเทน (DCM) 30% (Ohkawa *et al.*, 2004) TFA โปรโตเนตหมู่แอมิโนให้กลายเป็นเกลือแอมโมเนียมที่มีประจุบวก และทำให้อันตรกิริยาที่แข็งแกร่ง (rigid interaction) ระหว่างสายโซ่ลดลง ทำให้ความสามารถในการสปินเพิ่มขึ้น สามารถขึ้นรูปสารละลายไคโทซานเป็นเส้นใยได้

การขึ้นรูปเส้นใยโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตนั้น ขั้นตอนแรกจำเป็นต้องเตรียมสารละลายพอลิเมอร์ให้เป็นสารละลายเนื้อเดียว จึงนำมาขึ้นรูปซึ่งไคโทซานมีข้อจำกัดด้านการละลาย อันเนื่องมาจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโซ่โพลีเมอร์ ส่งผลให้ไคโทซานไม่สามารถละลายในน้ำได้ ไคโทซานจะละลายได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกรดเท่านั้น กรดจะโปรโตเนตหมู่แอมิโนในไคโทซานให้กลายเป็นหมู่แอมโมเนียมไอออน ทำให้แรงดึงดูดระหว่างสายโซ่โพลีเมอร์ของไคโทซานลดลง เป็นผลให้สามารถเตรียมสารละลายไคโทซานได้ (Cho *et al.*, 2006) แอมโมเนียมไอออนไคโทซานมีประจุบวกจำนวนมาก จึงละลายได้ในตัวทำละลายที่มีประจุ เช่น น้ำ กรดแอสซิดิก กรดไทรฟลูออโรแอสซิดิก แต่มีเพียงสารละลายไคโทซานในกรดไทรฟลูออโรแอสซิดิกเท่านั้นที่สามารถฉีดเป็นเส้นใยได้ การละลายไคโทซานด้วยกรดไทรฟลูออโรแอสซิดิกแสดงในรูปที่ 4.2

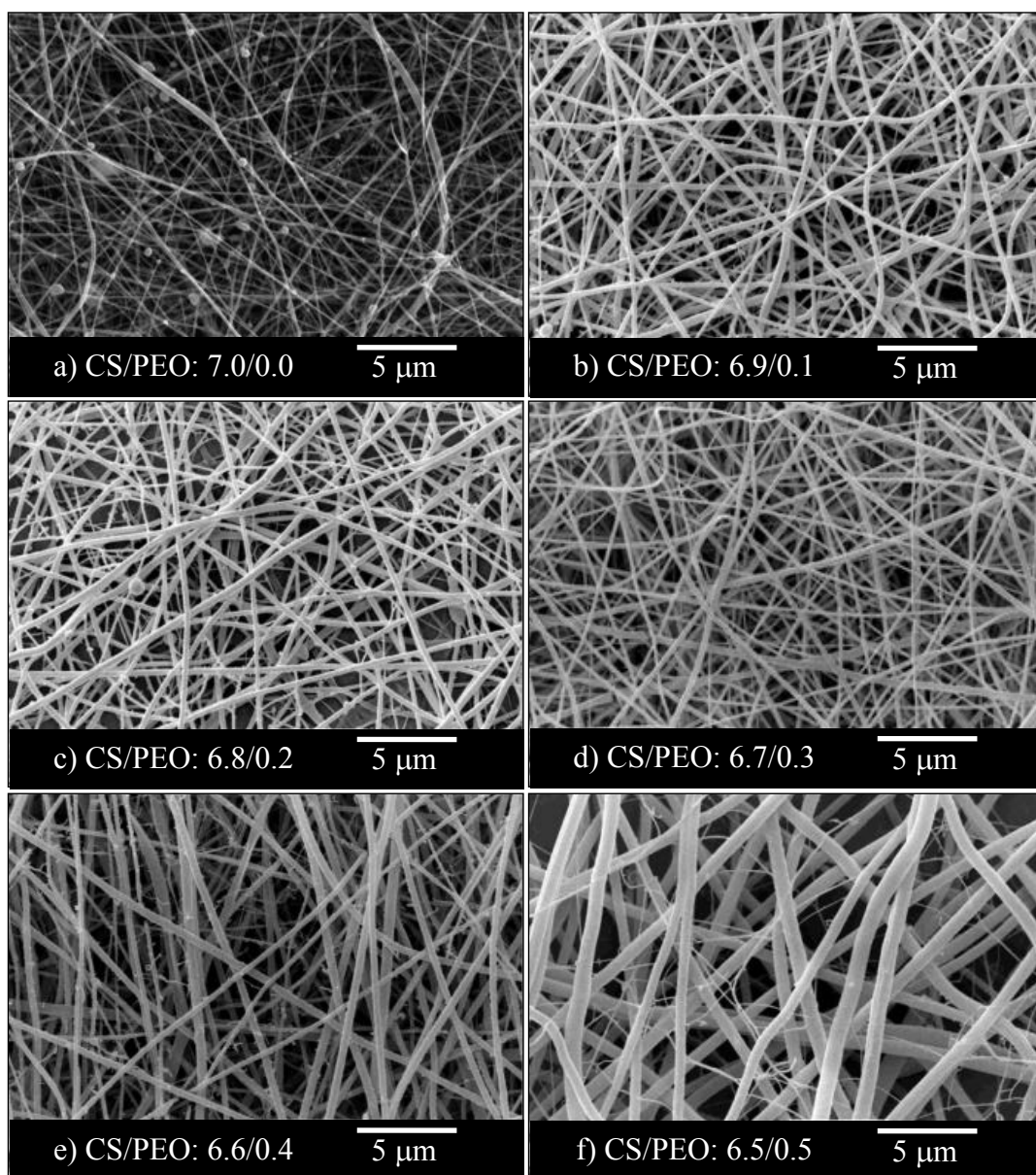


รูปที่ 4.2 การละลายไคโทซานด้วยกรดไทรฟลูออโรแอสซิดิก

เบื้องต้นผู้วิจัยได้ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเส้นใยไคโทซาน โดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตจากสารละลายไคโทซานเข้มข้น 6%, 7% และ 8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่ามีเพียงสารละลายไคโทซานความเข้มข้น 7% เท่านั้นที่สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นเส้นใย จึงได้ควบคุมความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่ 7% เพื่อศึกษาการขึ้นรูปเส้นใยโดยใช้สารละลายผสมของไคโทซานและพอลิเอทิลีนออกไซด์ต่อไป

เมื่อพิจารณาลักษณะทางวิทยาของเส้นใยจาก SEM พบว่า เส้นใยที่เตรียมได้จากสารละลายไคโทซาน 7% มีขนาดไม่สม่ำเสมอ พบปมกระจายตัวทั่วแผ่นเส้นใยจำนวนมาก (รูป 4.3 a) เมื่อสังเกตขณะฉีดเส้นใยพบว่ากรไหลของสารละลายไคโทซานไม่สม่ำเสมอ สารละลายไคโทซานบางส่วนฉีดออกมาเป็นเส้นใย ในขณะที่บางส่วนกระจายตัวเป็นหยดเล็ก ๆ คล้ายเส้นสเปรย์มากที่

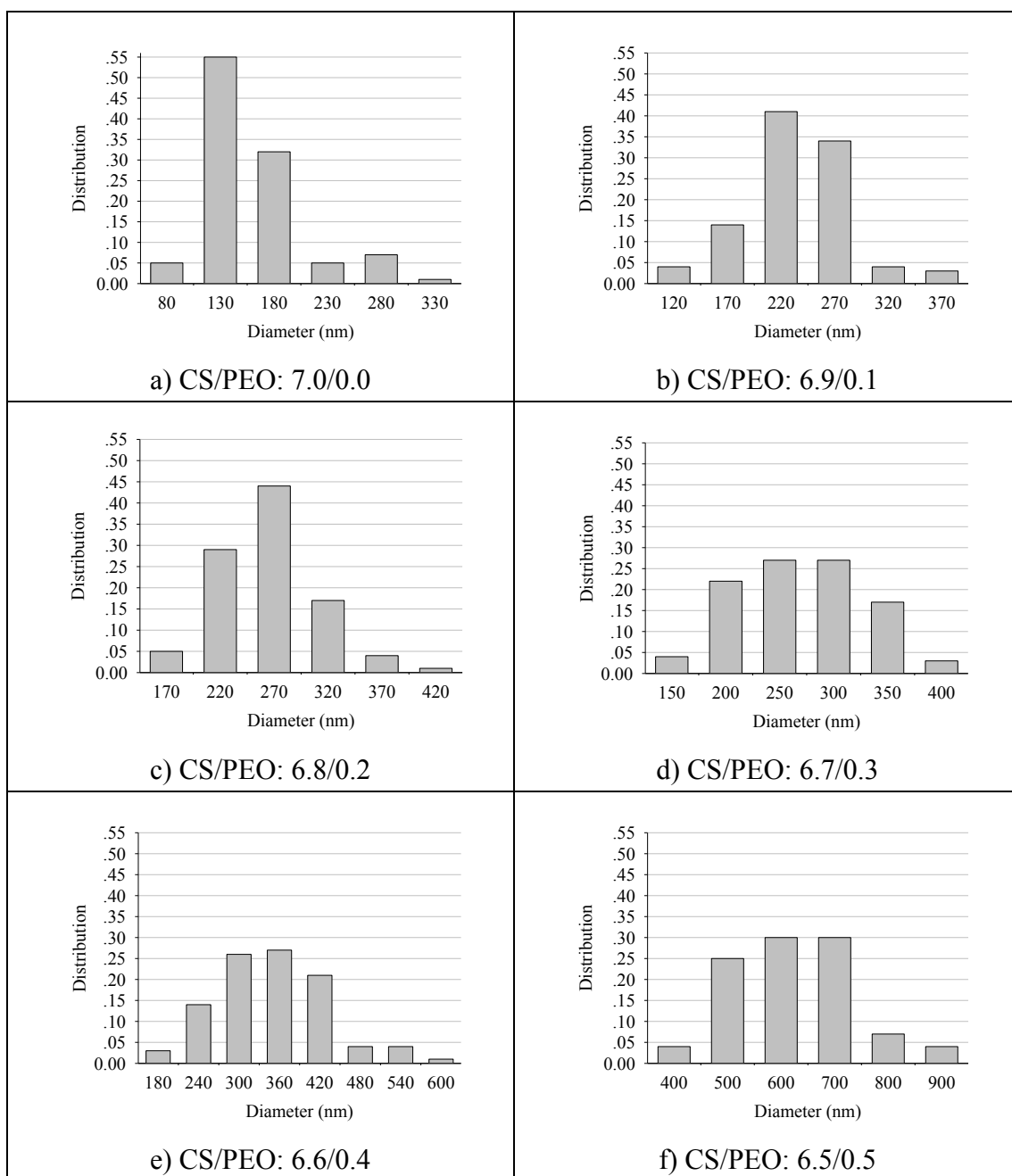
ฉากรับ เนื่องจากไคโทซานเป็นพอลิอิเล็กโทรไลต์ เมื่ออยู่ในภาวะสารละลายมีความเป็นประจุบวกในสายโซ่ (polycation) ทำให้เกิดการผลักกันของประจุซึ่งขัดขวางการเกิดการเกี่ยวพันของสายโซ่พอลิเมอร์ (Li *et al.*, 2005) ทำให้ไม่สามารถดึงยึดสารละลายไคโทซานได้เป็นเส้นอย่างต่อเนื่องและไม่สามารถเตรียมเส้นใยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางที่สม่ำเสมอได้ เพื่อเพิ่มความสามารถในการขึ้นรูปเส้นใย (electrospin ability) จึงนำพอลิเอทิลีนออกไซด์ (PEO) เบลนด์กับไคโทซานในอัตราส่วนต่าง ๆ และหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการขึ้นรูปเส้นใย



รูปที่ 4.3 ภาพ SEM ของเส้นใยได้จากอัตราส่วนต่าง ๆ ของ CS/PEO ในสารละลายซึ่งส่งผลกระทบต่อ
 ลักษณะวิทยาของเส้นใย

เมื่อเบลนด์ PEO กับไคโทซานพบว่า ความสามารถในการขึ้นรูปเส้นใยเพิ่มขึ้น อัตราส่วนระหว่าง CS กับ PEO ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเพื่อขึ้นรูปโดยเทคนิคการปั่นเส้นใย ด้วยไฟฟ้าสถิตส่งผลต่อลักษณะของเส้นใยดังนี้ ที่อัตราส่วน CS/PEO เป็น 6.9/0.1 (w/w) สังเกตขณะฉีดเส้นใยพบว่าคล้ายกับสารละลายไคโทซานคือ สารละลายพอลิเมอร์ผสมถูกฉีดออกมาไม่สม่ำเสมอและพบหยดพอลิเมอร์ผสมบนฉากรับ SEM ที่รูป 4.3 b แสดงให้เห็นว่า เส้นใยมีลักษณะเรียบขึ้น แต่มีเม็ดบีดจำนวนมากกระจายตัวบนแผ่นเส้นใย การฉีดเส้นใยดีขึ้นที่อัตราส่วน CS/PEO เป็น 6.8/0.2 (w/w) (รูปที่ 4.3 c) อย่างไรก็ตาม ที่อัตราส่วน CS/PEO เป็น 6.7/0.3 (w/w) ไม่พบเม็ดบีดบนแผ่นเส้นใยพอลิเมอร์ผสม ผิวเส้นใยมีลักษณะเรียบ (รูปที่ 4.3 d) เมื่อเพิ่มปริมาณของ PEO ในสารละลายให้อัตราส่วนของ CS/PEO เป็น 6.6/0.4 (w/w) และ 6.5/0.5 (w/w) สามารถฉีดเส้นใยพอลิเมอร์ผสมที่ไม่มีเม็ดบีดด้วย (รูปที่ 4.3 e และ รูปที่ 4.3 f)

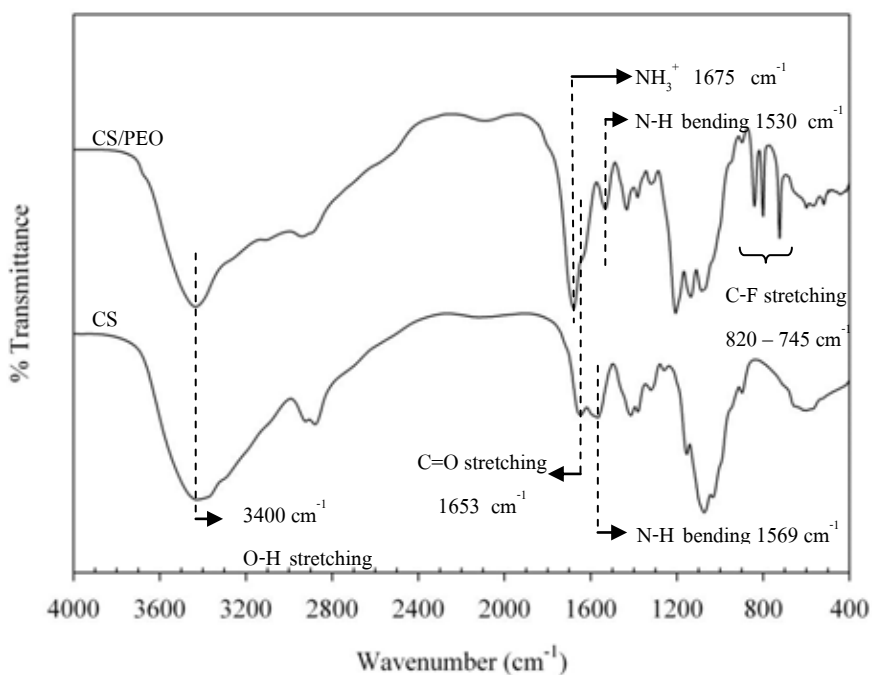
การหาการกระจายตัวของเส้นใยโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นใยของ CS/PEO ในอัตราส่วนต่าง ๆ จากรูปที่ได้จาก SEM นั้น วัดเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นใยจำนวน 100 เส้น ในแต่ละตัวอย่าง แล้วนำมาสร้างเส้นโค้งการกระจายตัวของเส้นใย พบว่า เส้นใยที่ได้จากสารละลายไคโทซานมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 149 ± 33 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยจากสารละลายอัตราส่วน CS/PEO เป็น 6.9/0.1 (w/w) เป็น 234 ± 49 นาโนเมตร และเพิ่มเป็น 624 ± 106 นาโนเมตร สำหรับเส้นใยจากสารละลายอัตราส่วน CS/PEO เป็น 6.5/0.5 (w/w) (รูปที่ 4.4) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใย และการกระจายตัวของเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ PEO เพราะพอลิเอทิลีนออกไซด์ช่วยเพิ่มความเกี่ยวพันทางสายโซ่ในพอลิเมอร์เบลนด์ ทั้งยังช่วยลดความเป็นพอลิอิเล็กโทรไลต์ในสารละลายพอลิเมอร์ การเพิ่มปริมาณของไคโทซานทำให้การนำไฟฟ้า (electrical conductivity) และแรงตึงผิว (surface tension) ของสารละลายมีค่าสูงขึ้น และความหนาแน่นของประจุสูงขึ้น ส่งผลให้เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดเล็กลง (Mincheva *et al.*, 2007) ดังนั้น จึงนำแผ่นเส้นใยจากสารละลายอัตราส่วน CS/PEO เป็น 6.7/0.3 (w/w) มาใช้เป็นแผ่นเส้นใยสำหรับศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.4 การกระจายตัวของเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใย CS/PEO

4.2.1 เอกลักษณะทางเคมีของแผ่นเส้นใยไคโทซานด้วยเทคนิค FT-IR

ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอกลักษณะทางเคมีของไคโทซาน และเส้นใยไคโทซานโดยเทคนิค FT-IR ดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบพีกของ FT-IR ของไคโทซานที่ 3400 cm^{-1} แสดงถึง O-H stretching พีกที่ 1653 cm^{-1} แสดงถึง C=O stretching (amide I) และพีกที่ 1569 cm^{-1} แสดงถึง N-H bending (amide II) เมื่อขึ้นรูปเส้นใย CS/PEO ด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต พบว่า พีกของ N-H bending เกิดการเลื่อนไปที่ 1530 cm^{-1} และ 1675 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงหมู่เอมิโนบนไคโทซานที่ถูกโปรโตเนต ($-\text{NH}_3^+$) ยืนยันได้จากพีกกว้างที่ 1675 cm^{-1} และอีก 3 พีกคือ $820\text{-}745\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึง TFA บนแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่อยู่ในรูปของเกลือ (Hasegawa et al., 1992)



รูปที่ 4.5 สเปกตรัม FT-IR ของ CS และเส้นใยจากสารละลาย CS/PEO อัตราส่วน 6.7/0.3

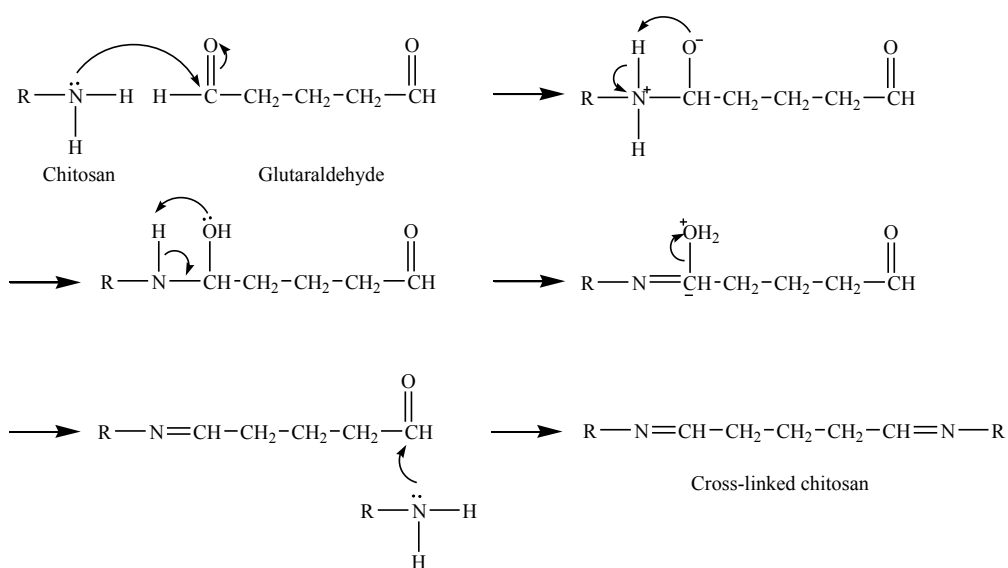
สามารถอธิบายจากรูป 4.5 ได้ว่า เมื่อไคโทซานละลายในกรด TFA หมู่เอมิโน ($-\text{NH}_2$) ในโครงสร้างของไคโทซานเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิก ($-\text{COOH}$) ในโครงสร้างของกรด TFA เกิดเป็นหมู่เกลือของ $-\text{NH}_3^+\text{CF}_3\text{COO}^-$ ตลอดสายโซ่ของไคโทซาน ด้วยเหตุนี้ แผ่นเส้นใยไคโทซานที่เตรียมได้อยู่ในรูป $-\text{NH}_3^+\text{CF}_3\text{COO}^-$ ซึ่งหมู่เกลือนี้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ ทำให้

แผ่นเส้นใยไคโทซานที่ได้จากการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต สามารถละลายในสารละลายที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบได้ ไม่ว่าจะอยู่ในภาวะกรด กลาง หรือเบสก็ตาม

4.3 การเตรียม HTACC/PEO จากการกราฟต์ GTMAC บนไคโทซาน

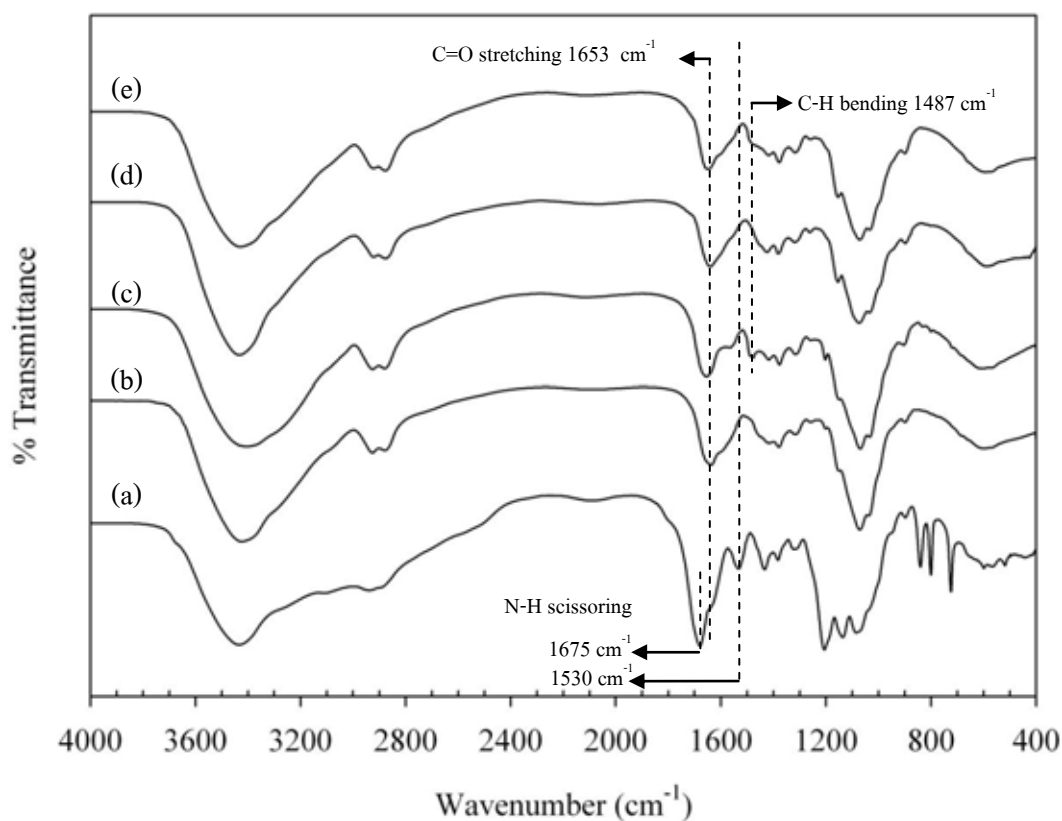
4.3.1 การเชื่อมขวางแผ่นเส้นใยด้วยไอของกลูตารัลดีไฮด์

แผ่นเส้นใยจากสารละลาย CS/PEO อัตราส่วน 6.7/0.3 (w/w) ได้รับการเชื่อมขวางด้วยไอของกลูตารัลดีไฮด์ (GT) เพื่อให้แผ่นเส้นใยไม่ละลายในน้ำในขั้นตอนการกราฟต์ GTMAC สาเหตุที่แผ่นเส้นใยละลายน้ำ เนื่องจากการจับตัวระหว่างหมู่เอมิโนกับกรดไตรฟลูออโรแอซิดิก (TFA) ทำให้กลายเป็นเกลือแอมโมเนียม ($-\text{NH}_3^+ \cdot \text{CF}_3\text{COO}^-$) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ PEO เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถละลายน้ำได้ แผ่นเส้นใยที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยไอของกลูตารัลดีไฮด์เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อน เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมิโนของไคโทซานกับหมู่แอลดีไฮด์ในกลูตารัลดีไฮด์เกิดเป็นหมู่ imine ($-\text{C}=\text{N}-$) กลไกการเชื่อมขวางได้แสดงในรูป 4.6 และแผ่นเส้นใยที่เชื่อมขวางแล้วสามารถรูปอยู่ได้ในขั้นตอนการกราฟต์ GTMAC จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR พบว่า พีกที่ 1675 และ 1530 cm^{-1} หายไป ซึ่งเป็นพีกที่แสดงเอกลักษณ์ของหมู่เอมิโน แต่อย่างไรก็ตาม ก็ไม่พบพีกของของหมู่ imine ($-\text{C}=\text{N}-$) เช่นกัน ซึ่ง Schiffman และ Schauer (2007) ได้เสนอไว้ว่า สามารถพบเอกลักษณ์ของพีกได้ที่ $1620-1660 \text{ cm}^{-1}$ เนื่องจากเกิดการซ้อนทับของพีกระหว่างหมู่ imine กับพีกของหมู่เอมิโนในไคโทซาน



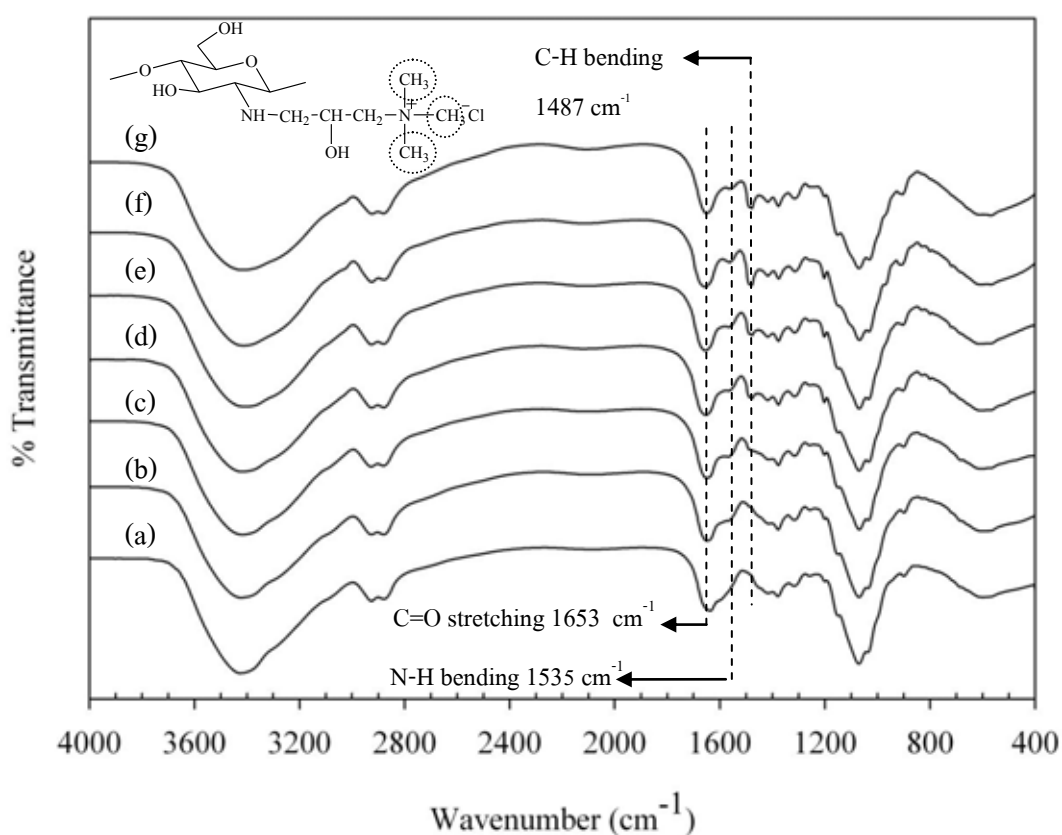
4.3.2 เอกลักษณะทางเคมีของ *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride/Poly(ethylene oxide) (HTACC/PEO)

ใช้เทคนิค FT-IR ศึกษาการกราฟต์ของ GTMAC บนโพลีโทซาน จาก FT-IR spectra แสดงในรูปที่ 4.7 ผลิตรกัณฑ์จากการกราฟต์ GTMAC บนแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางด้วย GT ไม่มีพีกของหมู่เอมีโนที่ 1530 cm^{-1} แต่พบพีกใหม่ที่ 1487 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีกของหมู่เมทิลบน GTMAC (รูปที่ 4.7 d) ในขณะที่ผลิตรกัณฑ์จากการกราฟต์ GTMAC บนแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางด้วย GT และนำมาสะเทินด้วยด่าง (รูปที่ 4.7 e) ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น แสดงว่า ไม่เกิดการกราฟต์ GTMAC บนแผ่นเส้นใย



รูปที่ 4.7 สเปกตรัม FT-IR ของ (a) เส้นใย CS/PEO, (b) เส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางด้วย GT, (c) ผลิตรกัณฑ์จาก b มาทำปฏิกิริยากับ GTMAC เป็นเวลา 8 ชั่วโมง, (d) ผลิตรกัณฑ์จาก b ที่สะเทินด้วยด่าง และ (e) ผลิตรกัณฑ์จาก d มาทำปฏิกิริยากับ GTMAC เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

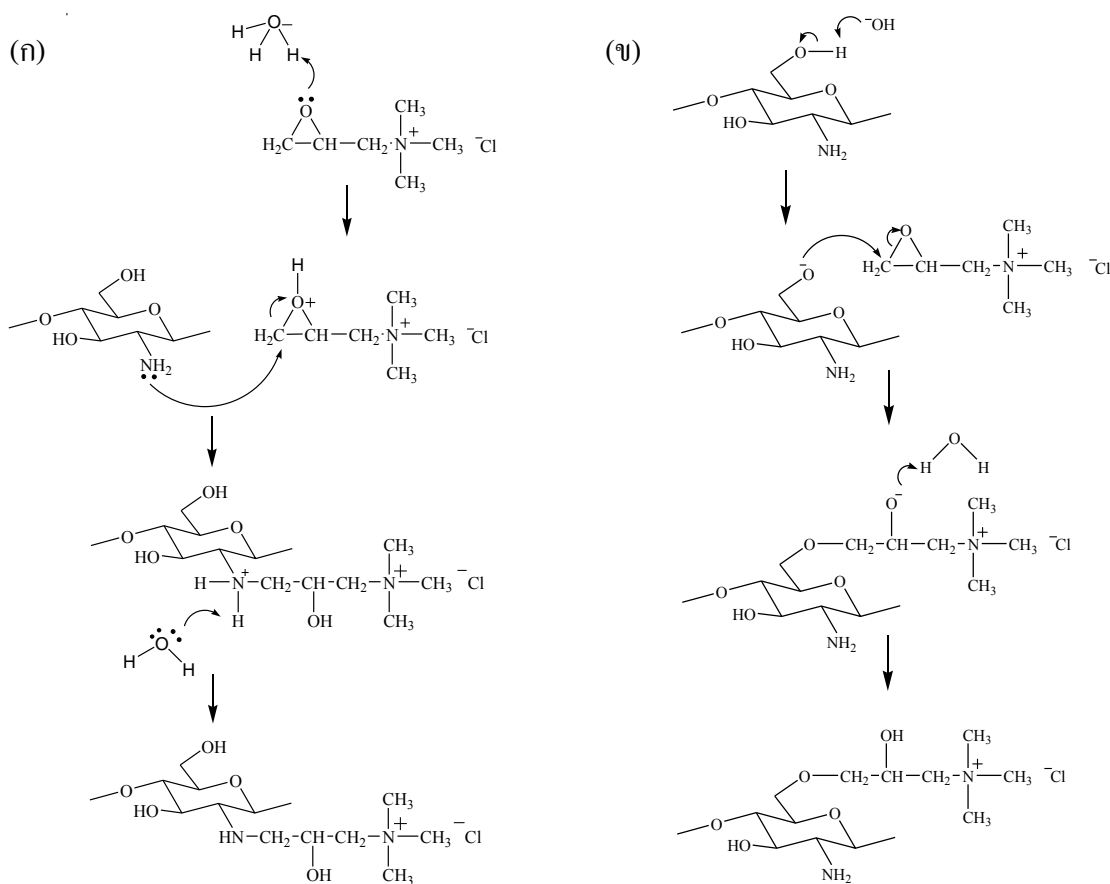
เมื่อศึกษาผลของเวลาทำปฏิกิริยาต่อการกราฟต์ GTMAC บนแผ่นเส้นใย CS/PEO ด้วยเทคนิค FT-IR ในรูปที่ 4.8 a และ 4.8 b คือ กราฟแสดงเอกลักษณ์ทางเคมีของไคโทซาน และไคโทซานที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ตามลำดับ ที่เวลาทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8 c) และ 4 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8 d) นั้น ไม่พบพีกของหมู่เมทิลที่ 1487 cm^{-1} ลักษณะของพีกคล้ายกับพีกของสารตั้งต้น กล่าวคือ ไม่เกิดการกราฟต์ GTMAC บนไคโทซานที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ หรือ มีการกราฟต์น้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้



รูปที่ 4.8 สเปกตรัม FT-IR ของ (a) เส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางด้วย GT, (b)-(g) ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากนำแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางด้วย GT มาทำปฏิกิริยากับ GTMAC เป็นเวลา 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ

พิจารณาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 6 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8 e) พบว่า มีพีคของหมู่เมทิลที่ 1487 cm^{-1} เกิดขึ้น และพบความสูงของพีคที่ 1487 cm^{-1} เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น 8 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8 f), 12 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8 g) และ 16 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8 h) แสดงว่า GTMAC ถูกกราฟต์ลงบนไคโทซานมากขึ้นเมื่อเวลาของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

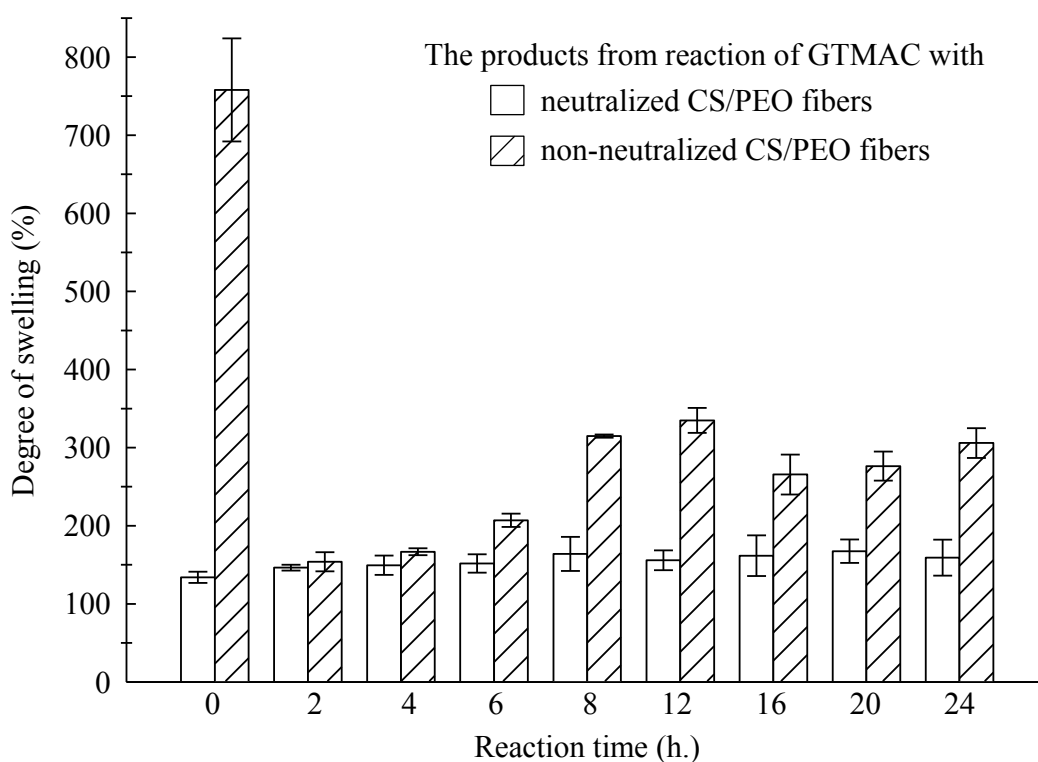
การศึกษานี้สอดคล้องกับศึกษาของ Seong *et al.* (1999) ที่เสนอว่า HTACC/PEO สามารถเตรียมโดยผ่านปฏิกิริยาการกราฟต์ GTMAC บนหมู่เอมิโนของไคโทซานภายใต้ภาวะกรด ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ก) เมื่อทำปฏิกิริยาในภาวะเบส GTMAC ถูกกราฟต์บนหมู่ไฮดรอกซี (OH) ซึ่งได้แสดงดังรูปที่ 4.9 (ข)



รูปที่ 4.9 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไคโทซานกับ GTMAC ในภาวะ (ก) กรด และ (ข) ด่าง

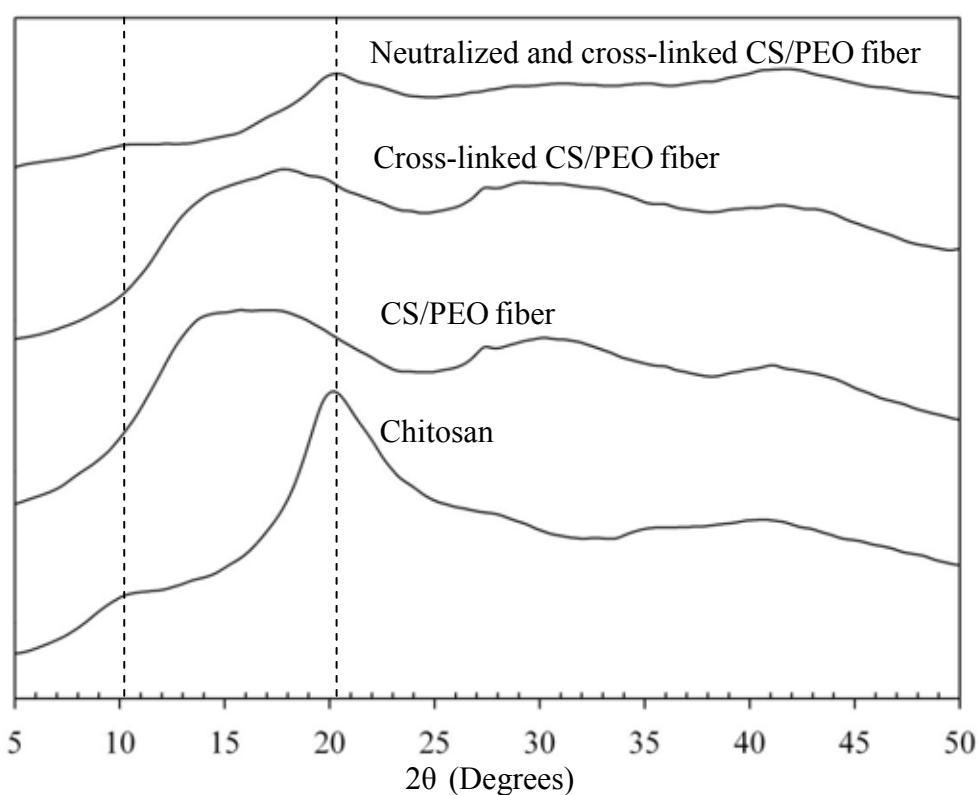
4.3.3 ผลของเวลาทำปฏิกิริยาต่อระดับชั้นการบวมตัว

นำ GTMAC กราฟต์บนแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่ไม่ได้รับการสะเทิน และแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการสะเทิน มาศึกษาผลของเวลาทำปฏิกิริยาต่อระดับชั้นการบวมตัว ดังแสดงในรูปที่ 4.10 เวลา 0 ชั่วโมง หมายถึง ก่อนกราฟต์ GTMAC บนแผ่นเส้นใยทั้ง 2 แบบ แผ่นเส้นใย CS/PEO ที่ไม่ได้รับการสะเทินมีระดับชั้นการบวมตัวมากถึง $754 \pm 66\%$ เนื่องจากหมู่แอมิโนบนไลโทซานถูกโปรโตเนตให้เป็นหมู่แอมโมเนียมด้วย TFA จึงมีความเป็น hydrophilicity มาก ในขณะที่แผ่นเส้นใยที่ได้รับการสะเทินมีระดับชั้นการบวมตัวเพียง $134 \pm 7\%$ เนื่องจากหมู่แอมโมเนียมบนไลโทซานถูกสะเทินด้วยด่างกลายเป็นหมู่แอมิโน จึงมีความเป็น hydrophilicity น้อยลง ส่งผลให้ระดับชั้นการบวมตัวน้อยลง ปฏิกิริยาการสะเทินของแผ่นเส้นใยด้วย Na_2CO_3 แสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.10 ผลของเวลาการทำกราฟต์ GTMAC บนแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่ไม่ได้รับการสะเทิน และแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการสะเทิน ต่อระดับชั้นการบวมตัว

ลักษณะของพอลิเมอร์ออสัณฐาน การสะเทินทำให้หมู่แอมโมเนียมบนไคโทซานที่เกิดขึ้นจากการโปรโตเนตของ TFA ในขั้นตอนการฉีดเส้นใยกลับมาเป็นหมู่เอมิโน (รูปที่ 4.11) ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิลระหว่างสายโซ่โพลีเมอร์ของไคโทซาน ไคโทซานเกิดการจัดเรียงตัว (molecular packing) ทำให้เกิดผลึกในแผ่นเส้นใยที่ได้รับการสะเทิน (Sangsanoh *et al.*, 2007) และสาเหตุนี้ทำให้ GTMAC ไม่สามารถกราฟต์บนแผ่นเส้นใยที่ถูกสะเทิน ผลจาก XRD สอดคล้องกับผลจาก FT-IR

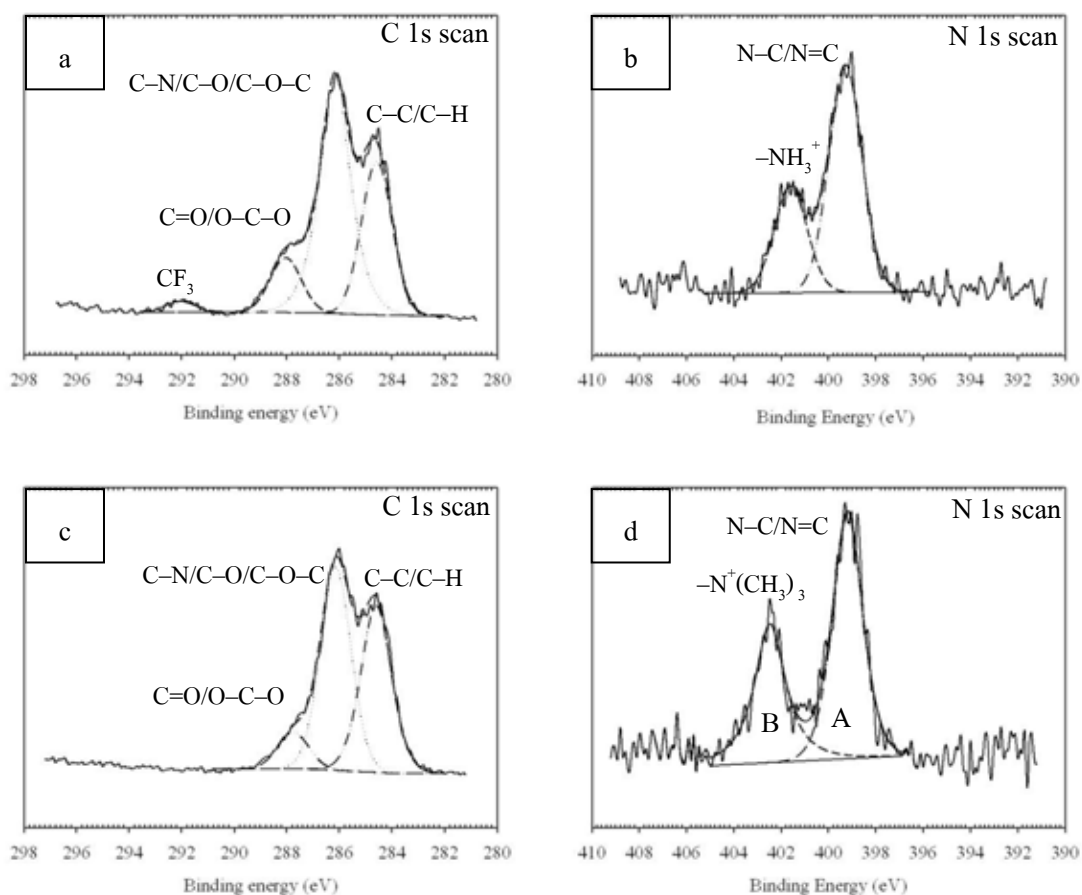


รูปที่ 4.12 XRD patterns ของไคโทซาน, เส้นใย CS/PEO, เส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการเชื่อมขวาง และเส้นใย CS/PEO ที่ได้รับการเชื่อมขวางและการสะเทิน

4.3.5 เอกลักษณะทางเคมีของ HTACC/PEO โดยเทคนิค XPS

XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงที่ผิว เนื่องจากมีความไวต่ออะตอมที่อยู่ใกล้ผิวมากกว่าอะตอมที่อยู่ในเนื้อสาร สัญญาณ (พีค) ส่วนใหญ่มาจากชั้นความหนาเพียง 2-3 อะตอมของผิว ดังนั้น สัญญาณที่ตรวจจับได้มาจากผิวเป็นหลัก ต่าง

จากเทคนิคการวิเคราะห์แบบบัลค์ (Bulk analysis) เช่น FT-IR ซึ่งเกี่ยวข้องกับเนื้อสาร ผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค FT-IR แสดงการกระจายตัวของสารที่ต้องการศึกษาในเนื้อสาร (คทาฐภษาณะ, 2554) ดังนั้น เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่ใช้ยืนยันการกราฟต์ GTMAC บนผิวของเส้นใย CS/PEO พิกที่ไต้เป็นค่าพลังงานยึดเหนี่ยวระหว่างอะตอม (binding energy) ซึ่งเป็นค่าพลังงานเฉพาะในธาตุแต่ละชนิดที่ศึกษา ซึ่งธาตุแต่ละชนิดนี้แสดงสัญญาณเป็นค่าพลังงาน binding energy ต่างกันที่จุดสูงสุดของพิก



รูปที่ 4.13 XPS spectra ของ (a-b) แผ่นเส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางแล้ว และ (c-d) HTACC/PEO

พิก C1s spectrum ของแผ่นเส้นใย CS/PEO ที่เชื่อมขวางแล้ว (รูปที่ 4.13 a) มีค่า binding energy ที่ 292.2 eV. แสดงพิกของ $-\text{CF}_3$ ของกรด TFA และ N1s spectrum (รูปที่ 4.13 b) มีค่า binding energy ที่ 399.3 eV. แสดงพิกของ N-C หรือ N=C ของไนโตรเจนบนหมู่เอมีโนไนไลโทซาน และ 401.7 eV. แสดงหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมที่เกิดจากการโปรโตเนตหมู่เอมีโนของ

กรด TFA ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายพอลิเมอร์ ซึ่งสอดคล้องกับค่าระดับขั้นการบวมตัวที่มีค่ามากถึง $754 \pm 66\%$

สำหรับ HTACC/PEO นั้น พิก C1s spectrum (รูปที่ 4.13 c) ไม่ใช่พิกของกรด TFA ที่ 292.2 eV. และพิก N1s spectrum (รูปที่ 4.13 d) มีค่า binding energy ที่ 399.2 eV. เป็นสัญญาณของ N-C หรือ N=C ของไนโตรเจนบนหมู่เอมิโนในไคโทซาน และ 402.5 eV. แสดงพิกของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมที่เกิดจากการกราฟต์ GTMAC บนไคโทซาน ($-N^+(CH_3)_3$) จึงยืนยันได้ว่า หมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมที่เกิดขึ้นเป็นของ HTACC/PEO จำนวนการแทนที่ของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (degree of quaternization, %DQ) ได้จากสมการ 4.2 ดังนี้ (Vallapa *et al.*, 2011)

$$\%DQ = \frac{\text{area peak B}}{\text{area peak A} + \text{area peak B}} \quad 4.2$$

โดย area peak A คือ พื้นที่ใต้กราฟจากพิกของหมู่เอมิโนในไคโทซาน มีค่า binding energy ที่ 399.2 eV. ซึ่งสัมพันธ์กับร้อยละของหมู่เอมิโนในสารตัวอย่าง และ area peak B คือ พื้นที่ใต้กราฟจากพิกของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมที่เกิดจากการกราฟต์ GTMAC บนไคโทซาน มีค่า binding energy ที่ 402.5 eV. มีความสัมพันธ์กับร้อยละของหมู่เอมิโนที่ถูกโปรโตเนตเป็นหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม ดังนั้น จึงสามารถใช้ร้อยละของหมู่เอมิโนและร้อยละของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมใน HTACC/PEO (ตาราง 4.2) แทนในสมการ 4.2 ได้เป็น

$$\%DQ = \frac{\%N^+(CH_3)_3}{\%NH_2 + \%N^+(CH_3)_3} \quad 4.3$$

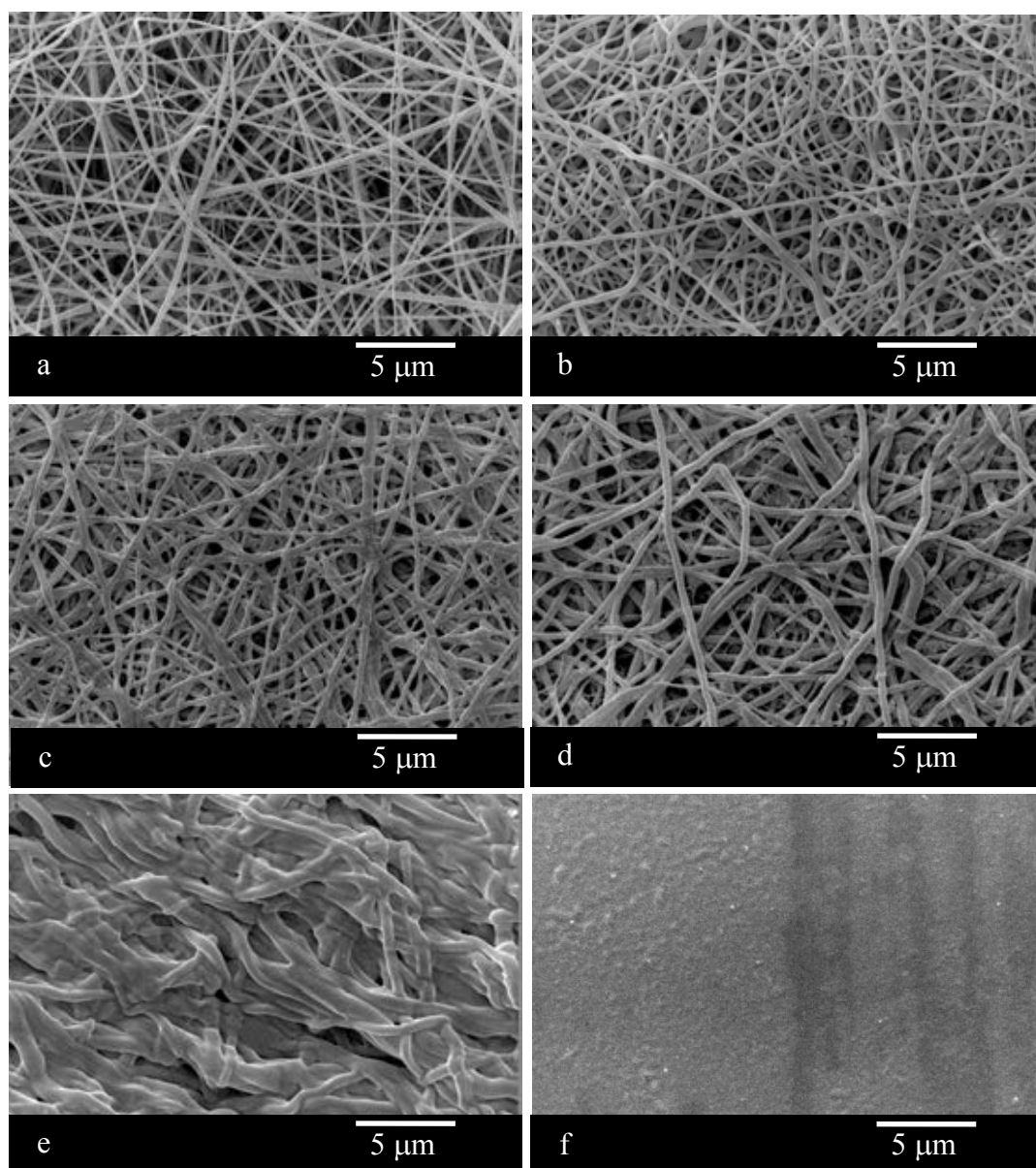
คำนวณขั้นการแทนที่ของหมู่เกลือแอมโมเนียม ได้ 40.7 %

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของหมู่เอมิโนและร้อยละของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมใน HTACC/PEO

material	binding energy	element/chemical bonding	%
Cross-linked CS/PEO	399.4	N-C/N=C	3.5
	401.7	NH ₃ ⁺	1.8
HTACC/PEO	399.2	N-C/N=C	3.5
	402.5	N ⁺ (CH ₃) ₃	2.4

4.4 การเตรียมแผ่นเส้นใย *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-chitosan iodide/poly(ethylene oxide) (QBzCS/PEO)

4.4.1 สัณฐานวิทยาของ QBzCS/PEO ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชัน



รูปที่ 4.14 สัณฐานวิทยาของ (a) CS/PEO fiber, (b) neutralized CS/PEO fiber, และ (c-f) QBzCS/PEO ที่เวลาทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันนาน 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

การเตรียม *N*-benzyl-dimethyl-chitosan iodide/Poly(ethylene oxide) (QBzCS/PEO) ใช้แผ่นเส้นใยไคโทซานที่สะเทินแล้ว เนื่องจากแผ่นเส้นใยที่สะเทินแล้วคงสภาพความเป็นเส้นใยอยู่ได้ทั้งในสารละลายที่เป็นกลางและเบส

จากการศึกษาเวลาทำปฏิกิริยาเมทิลชัน 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า สัณฐานวิทยาของเส้นใยเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้ รูปที่ 4.14 (a) คือ แผ่นเส้นใย CS/PEO ก่อนการสะเทิน เมื่อทำการสะเทินด้วยด่าง Na_2CO_3 เส้นใยมีลักษณะคงรูปได้ดังเห็นในรูป 4.14 (b) กล่าวคือ ปกติ เส้นใย CS/PEO ละลายในน้ำได้ เนื่องจากกรด TFA โพรโตนเนตหมู่เอมิโนให้เป็นหมู่แอมโมเนียม เมื่อนำแผ่นเส้นใย CS/PEO มาทำปฏิกิริยากับ Na_2CO_3 ทำให้เกลือแอมโมเนียมกลับเป็นหมู่เอมิโน ทำให้แผ่นเส้นใย CS/PEO ที่ผ่านการสะเทินยังคงรูปอยู่ได้และไม่ละลายในน้ำ

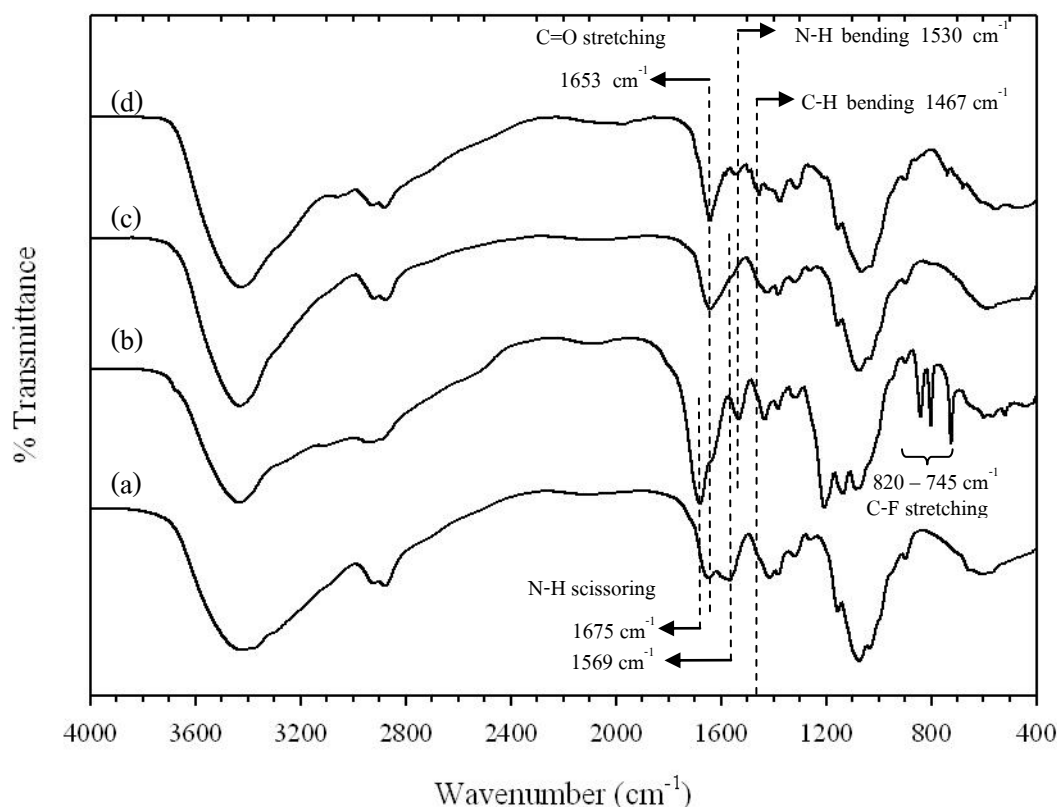
เมื่อพิจารณาเวลาทำปฏิกิริยาที่ 6 และ 12 ชั่วโมง (รูปที่ 4.14 c และ d) พบว่า แผ่นเส้นใยยังคงสภาพความเป็นแผ่นเส้นใย เส้นใยบางส่วนแนบติดกัน สังเกตแผ่นเส้นใยเมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นยังคงรูปของแผ่นเส้นใยอยู่ได้ในสารละลายเมทานอล เมื่อเพิ่มเวลาทำปฏิกิริยาเป็น 18 ชั่วโมง พบว่า ผิวของเส้นใยเส้นใยเชื่อมติดกันและเกิดการละลายเข้าหากัน และไม่มีที่ว่างระหว่างเส้นใย ทำให้ได้แผ่นเส้นใยที่เสียรูปไป นั่นคือ เกิดปฏิกิริยาการกราฟต์ที่มากเกินไป ทำให้เส้นใย QBzCS/PEO ละลายใน anhydrous methanol เมื่อเวลาทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์ม พบว่า ไม่เหลือความเป็นเส้นใยอยู่เลย

4.4.2 เอกลักษณะทางเคมีของ QBzCS/PEO โดยเทคนิค FT-IR

รูปที่ 4.15 (a-b) แสดงเอกลักษณ์ทางเคมีของไคโทซานและแผ่นเส้นใย CS/PEO ดังที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อ 4.2.1 นั่นคือ พีคที่ 3400 cm^{-1} แสดงลักษณะของ O-H stretching พีคที่ 1653 cm^{-1} แสดงลักษณะของ C=O stretching (amide I) และที่เลขคลื่น 1569 cm^{-1} แสดงลักษณะของ N-H bending (amide II) สำหรับแผ่นเส้นใย CS/PEO พบพีคของ N-H bending ที่เลขคลื่น 1530 cm^{-1} และ 1675 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของหมู่เอมิโนบนไคโทซานที่ถูกโปรโตนเนต ($-\text{NH}_3^+$) และอีก 3 พีคในช่วง $820\text{-}745\text{ cm}^{-1}$ แสดงพันธะ C-F stretching ใน TFA

พิจารณา FT-IR spectra ของ neutralized CS/PEO fibers (รูป 4.15 c) พบสัญญาณของพีคดังต่อไปนี้ พีคที่ 1653 cm^{-1} แสดงลักษณะของ C=O stretching (amide I) และพีคที่ 1569 cm^{-1} แสดงถึง N-H bending (amide II) เมื่อกราฟต์หมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมบนแผ่นเส้นใยที่ผ่าน

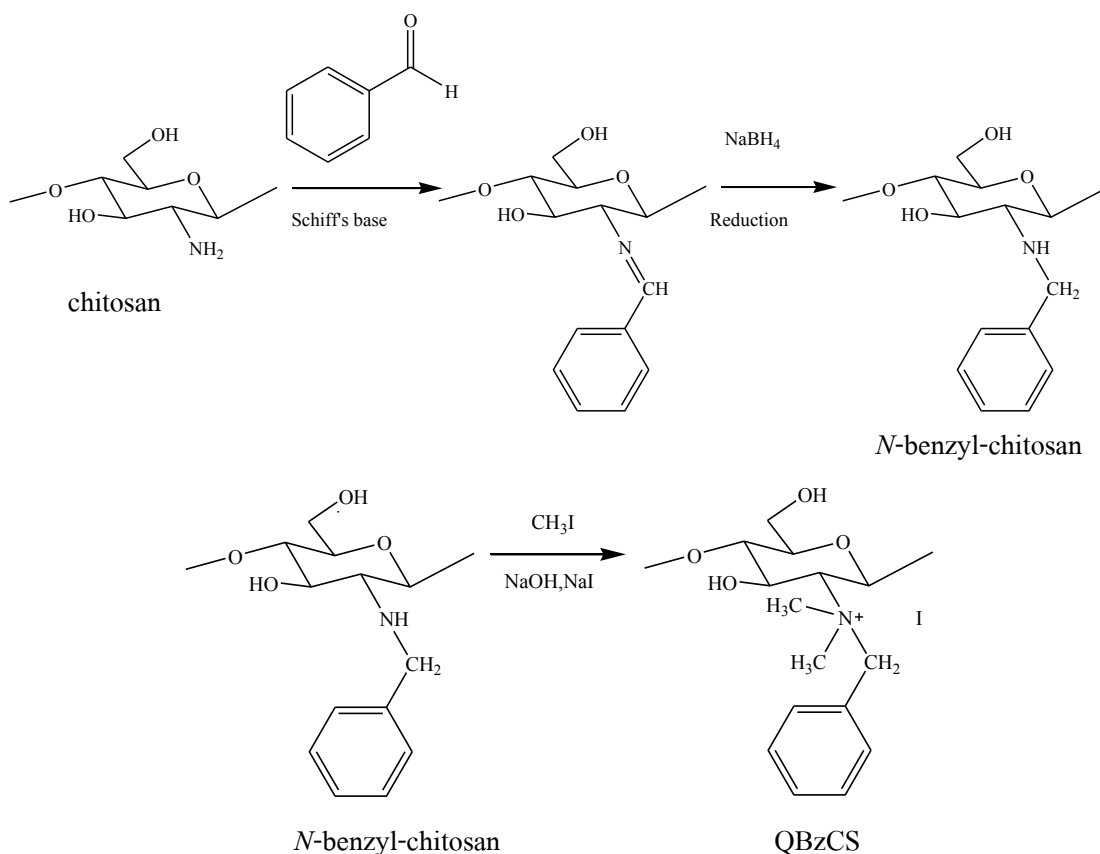
การสะท้อนแล้ว พบว่า พีกของ N-H bending ได้เลื่อนไปที่ 1530 cm^{-1} และเกิดพีกใหม่ที่ 1467 cm^{-1} ซึ่งแสดงลักษณะของ C-H bending ของหมู่เมทิลใน QBzCS/PEO (รูป 4.15 d) นั้น เป็นการยืนยันว่าปฏิกิริยาการกราฟต์ได้เกิดขึ้นแล้ว



รูปที่ 4.15 FT-IR spectra ของ (a) chitosan, (b) เส้นใย CS/PEO, (c) เส้นใย CS/PEO ที่ผ่านการสะท้อน และ(d) QBzCS/PEO

N-benzyl-*N,N*-dimethyl-chitosan iodide เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน อธิบายได้ดังนี้
 ขั้นที่ 1 การเตรียม *N*-benzyl-chitosan เกิดจากหมู่เอมีโนบนไคโทซานทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ของ benzaldehyde ผ่านปฏิกิริยา Schiff's base ได้พันธะระหว่างไนโตรเจนที่หมู่เอมีโนกับคาร์บอนที่หมู่คาร์บอนิลได้เป็นหมู่ imine ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยการเติมโซเดียมโบโรไฮไดรด์ได้ *N*-benzyl-chitosan

ขั้นที่ 2 *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-chitosan iodide เกิดจาก *N*-benzyl-chitosan ทำปฏิกิริยากับเมทิลไอโอไดด์ การแทนที่ไฮโดรเจนของหมู่เมทิลบนหมู่เอมีโนที่กราฟต์ด้วยเบนซิลไฮด์ ทำให้หมู่เอมีโนเปลี่ยนเป็นหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม โดยมีไอโอไดด์ไอออนเป็นแคน์เตอร์ไอออน (Wiarachai, 2008; Vallapa *et al.*, 2011) ปฏิกิริยาทั้ง 2 ขั้นตอนได้แสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 การเตรียม *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-chitosan iodide (QBzCS)

(Wiarachai, 2008; Vallapa *et al.*, 2011)

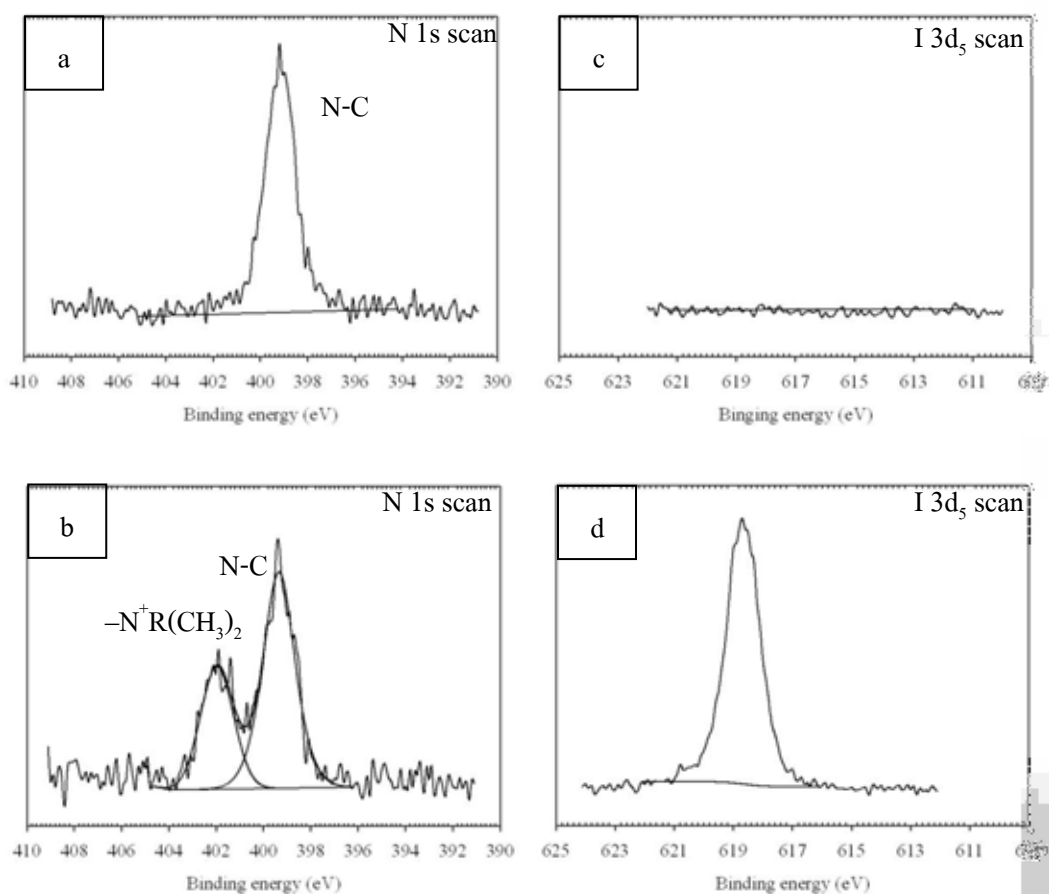
4.4.3 เอกลักษณะทางเคมีของ QBzCS/PEO โดยเทคนิค XPS

พิจารณาฟีกของสเปกตรัม N1s ของเส้นใย CS/PEO ที่สะเทินด้วยด่าง (รูปที่ 4.17 a) มีค่า binding energy ที่ 399.1 eV. ซึ่งหมายถึงหมู่เอมีโนในไนโคโทซานเพียงฟีกเดียว เมื่อ benzyl chitosan ได้ทำปฏิกิริยามetilเลชันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบค่า binding energy ที่ 399.4 eV. ซึ่งแสดงถึงพันธะระหว่าง N-C บนหมู่เอมีโนในไนโคโทซาน ส่วนค่า binding energy ที่ 402 eV. (รูปที่ 4.17

b) แสดงหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมที่เกิดจากการกราฟต์เมทิลไอโอไดด์ลงบน *N*-benzyl chitosan ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR และในเส้นใย CS/PEO ที่สะท้อนด้วยค่า ไม่พบพีกของไอโอดีนที่ 618.7 eV. (รูปที่ 4.17 c) ในขณะที่พีกที่มีค่า binding energy 618.7 eV. ของเส้นใย QBzCS/PEO (รูปที่ 4.17 d) ไอโอดีนทำหน้าที่เป็น counter ion ให้กับ QBzCS/PEO ร้อยละของหมู่แอมิโนและร้อยละของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมใน QBzCS/PEO แสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งแสดงค่าการแทนที่ของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (degree of quaternization, %DQ) คำนวณได้จากสมการ 4.4 ได้ค่า 36.1%

$$\%DQ = \frac{\%N^+R(CH_3)_2}{\%NH_2 + \%N^+R(CH_3)_2} \quad 4.4$$

โดย R คือ หมู่เบนซิล



รูปที่ 4.17 XPS spectra ของ (a,c) แผ่นเส้นใย CS/PEO ที่สะท้อนแล้ว และ (b,d) QBzCS/PEO

ตารางที่ 4.3 ร้อยละของหมู่แอมิโนและร้อยละของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมใน QBzCS/PEO

material	binding energy	element/chemical bonding	%
neutralized CS/PEO	399.1	N-C/N=C	5.5
	401.7	NH ₃ ⁺	-
QBzCS/PEO	402	N-C/N=C	2.2
	399.4	N ⁺ R(CH ₃) ₃	3.9

4.5 การต้านฤทธิ์แบคทีเรียของแผ่นเส้นใย CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO

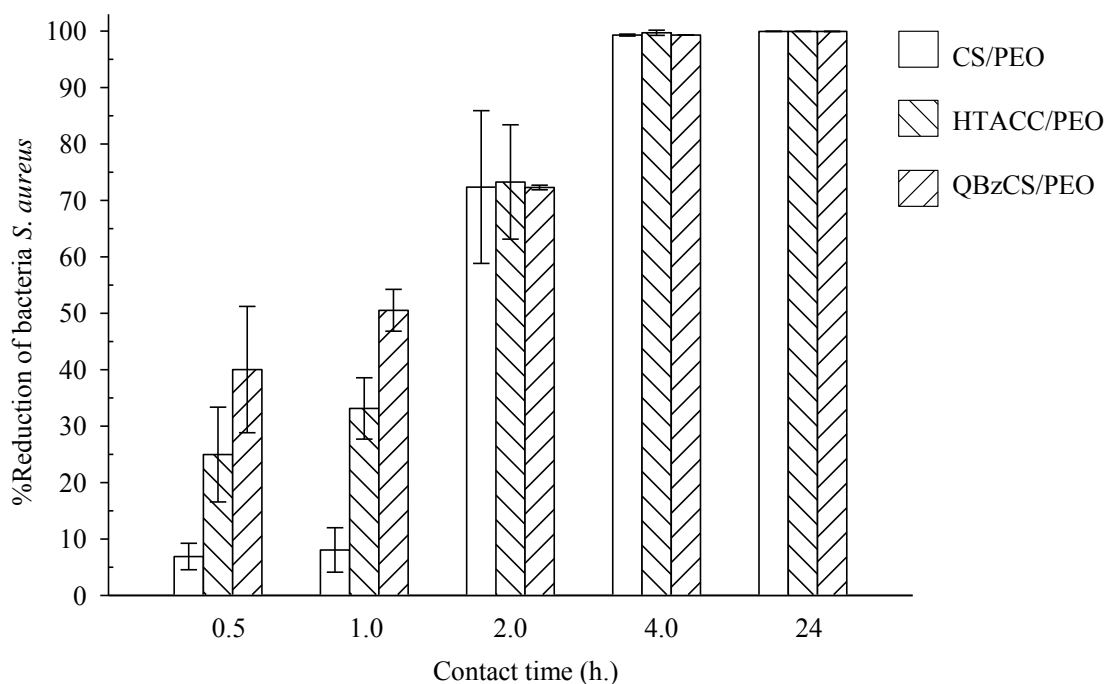
สมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียที่เรียตัวอย่าง แสดงด้วยค่า %reduction หมายถึง ร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่ตายหลังจากสัมผัสสารที่ใช้ตามเวลาที่กำหนด เปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่สัมผัสกับสารนั้นที่เวลาเดียวกัน สามารถคำนวณได้ด้วยสมการ 3.2 ดังที่กล่าวมาในบทที่ 3

รูปที่ 4.18 แสดงเปอร์เซ็นต์การลดลง (%reduction) ของแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* เมื่อใช้ CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO ที่เวลาสัมผัสสาร 0.5, 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง เมื่อเวลาสัมผัสสารเพิ่มขึ้นทั้ง CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO มีค่าการต้านฤทธิ์แบคทีเรียมากขึ้นตามลำดับ

พิจารณาที่เวลา 0.5 ชั่วโมง พบว่า ทั้ง HTACC/PEO และ QBzCS/PEO มีสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียดีกว่า CS/PEO โดย QBzCS/PEO มีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงมากที่สุดคือ 40% รองลงมาคือ HTACC/PEO 25% และ CS/PEO 6.9%

เมื่อเวลาสัมผัสสารเพิ่มขึ้นเป็น 1 ชั่วโมง QBzCS/PEO มีสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียสูงกว่า HTACC/PEO และ CS/PEO เช่นเดียวกับที่เวลาสัมผัสสาร 0.5 ชั่วโมง กล่าวคือ มีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 51.5%, 33.1% และ 8.0% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ที่เวลาสัมผัสสาร 2 ชั่วโมง พบว่า ทั้ง QBzCS/PEO, HTACC/PEO และ CS/PEO มีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงใกล้เคียงกัน 72% เมื่อเพิ่มเวลาสัมผัสสารเพิ่มขึ้นเป็น 4 และ 24 ชั่วโมง พบว่า สารทั้งสามชนิดมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงใกล้เคียงกัน คือ มีค่ามากกว่า 99% แสดงว่า สารทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่สูง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแผ่นเส้นใยที่มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมทั้ง 2 ชนิด และแผ่นเส้นใยไคโทซาน พบว่า แผ่นเส้นใยที่มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมทั้ง 2 ชนิด มีสมบัติต้าน

ฤทธิ์แบคทีเรียที่เรียกว่าไคโทซานที่เวลาสัมผัสสารน้อยกว่า 2 ชั่วโมง และ QBzCS/PEO มีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรียมากกว่า HTACC/PEO

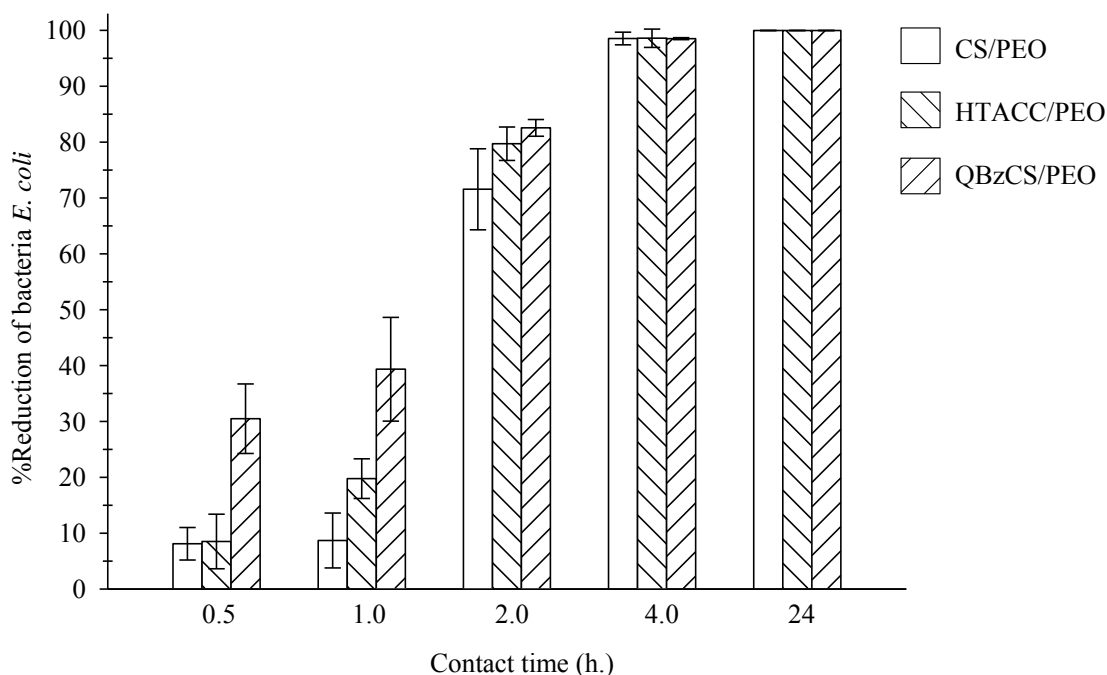


รูปที่ 4.18 %reduction ของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เวลาสัมผัสสาร 0.5, 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.19 แสดงเปอร์เซ็นต์การลดลง (%reduction) ของแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* เมื่อใช้ CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO ที่เวลาสัมผัสสาร 0.5, 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง

ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย *E.coli* เมื่อสัมผัสกับ CS/PEO และ HTACC/PEO เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกันคือ 8.1% และ 8.4% ตามลำดับ แสดงว่า การต้านฤทธิ์แบคทีเรียของ HTACC/PEO และ CS/PEO ไม่แตกต่างกัน ณ เวลานี้ ในขณะที่ QBzCS/PEO มีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลง 30.5% เมื่อเวลาสัมผัสสารเพิ่มขึ้นเป็น 1 ชั่วโมง พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรียที่สัมผัสกับ CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO มีค่า 8.6%, 19.7% และ 39.3% ตามลำดับ เมื่อเวลาสัมผัสสารเพิ่มขึ้น พบว่า สารทั้ง 3 ชนิดมีค่าการต้านฤทธิ์แบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรียมากกว่า 99 % ที่เวลาสัมผัสสาร 4 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

จากการวิจัยพบว่า QBzCS/PEO สามารถต้านฤทธิ์แบคทีเรียได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ HTACC/PEO และ CS/PEO ที่เวลาสัมผัสสาร 0.5 และ 1 ชั่วโมง

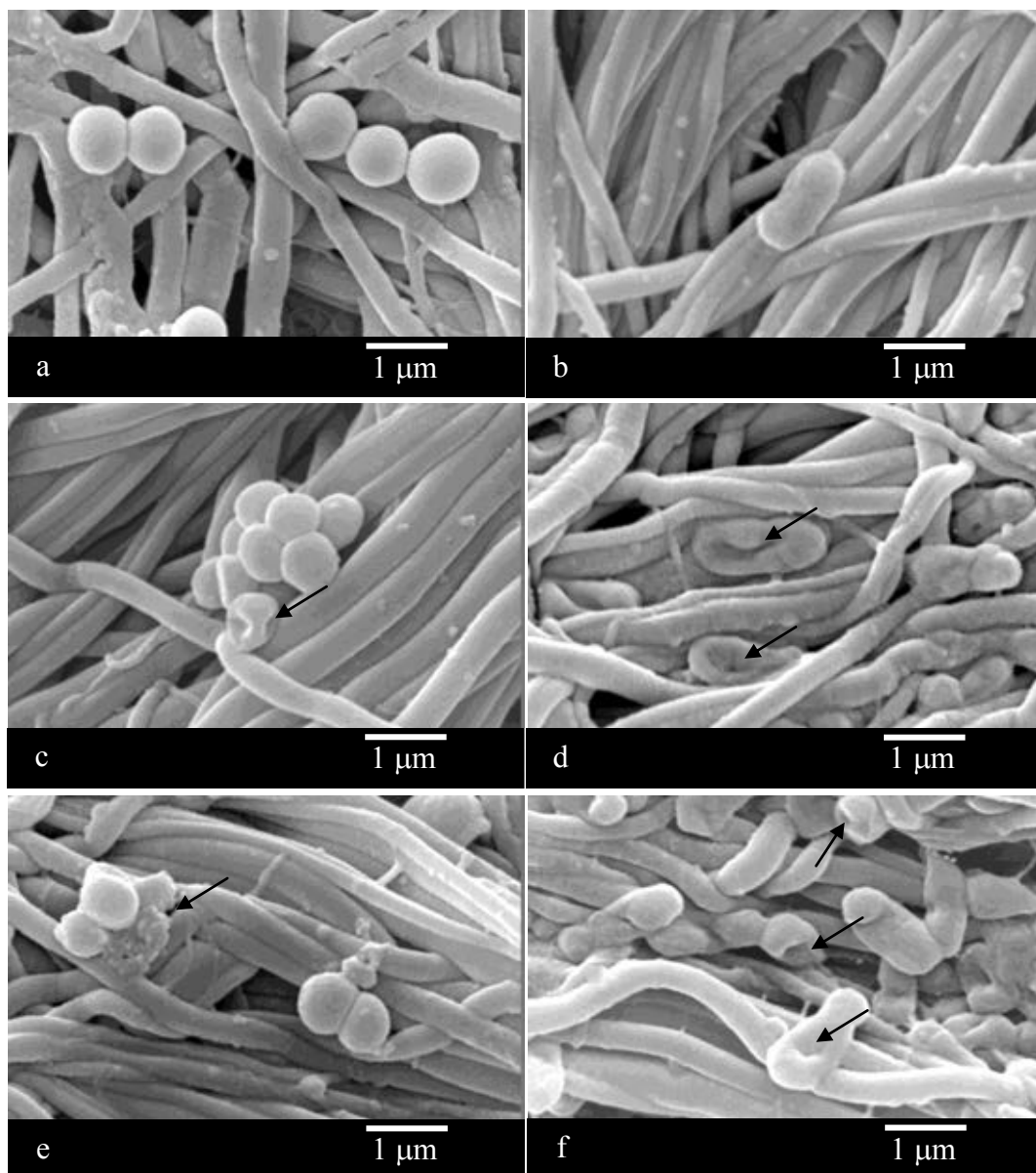


รูปที่ 4.19 %reduction ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่เวลาสัมผัสสาร 0.5, 1, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เวลา 0.5 และ 1 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย *E. coli* พบว่า ณ เวลาเดียวกัน เปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย *S. aureus* มีค่ามากกว่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย *E. coli* แสดงว่า สารทั้งสามตัวมีสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้ด้านทานสารที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียได้ดีกว่า

ศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียได้จากภาพ SEM ของแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* มีรูปร่างทรงกลม ขนาดประมาณ 0.8 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.20 a) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* มีรูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก มีความยาวประมาณ 1.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.20 b) บนแผ่นเส้นใย CS/PEO โดยตรงเซลล์ภายหลังจากหยดแบคทีเรียลงบนแผ่นเส้นใย ถือว่า แบคทีเรียไม่มีเวลาสัมผัส

สาร จากภาพแสดงให้เห็นว่า เซลล์แบคทีเรียทั้ง *S. aureus* และ *E. coli* ไม่มีการเสียหาย แสดงว่า เซลล์แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดยังมีชีวิตอยู่ขณะที่ตรึงเซลล์



รูปที่ 4.20 สัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย (a) *S. aureus*, (b) *E.coli*, (c) *S. aureus* บนแผ่นเส้นใย HTACC/PEO, (d) *E. coli* บนแผ่นเส้นใย HTACC/PEO, (e) *S. aureus* บนแผ่นเส้นใย QBzCS/PEO และ (d) *E. coli* บนแผ่นเส้นใย QBzCS/PEO ให้ (c-d) ใช้เวลาสัมผัสสาร 24 ชั่วโมง

ผลของแผ่น HTACC/PEO ที่สัมผัสแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ที่เวลาสัมผัสสาร 24 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.20 (c) และ 4.21 (d) ตามลำดับ เมื่อสังเกตรูปร่างของแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่า แบคทีเรียมีรูปร่างผิดปกติไม่เป็นรูปทรงกลม และแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งมีรูปร่างบิดเบี้ยวไปจากเดิมซึ่งเป็นรูปท่อนทรงกระบอก หากเซลล์แบคทีเรียมีรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม แสดงว่า เป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิต หากเป็นเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* และแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีชีวิตควรมีรูปร่างและลักษณะดังรูปที่ 4.20 (a) และ 4.20 (b) ตามลำดับ สำหรับแผ่นเส้นใย QBzCS/PEO ไม่พบแบคทีเรีย *S. aureus* ที่มีผนังเซลล์แตกและไม่เหลือสภาพของเซลล์แบคทีเรียดังแสดงในรูปที่ 4.9 (e) ในขณะที่ *E. coli* มีลักษณะคล้ายกับ *E. coli* บนแผ่น HTACC/PEO พิจารณาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่นเส้นใย พบว่า มีขนาดใหญ่ประมาณ 400-500 นาโนเมตร เนื่องจากการบวมตัวของแผ่นเส้นใยในขั้นตอนการบ่มแบคทีเรีย และเมื่อตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ แผ่นเส้นใยไคโทซานจึงถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตาไรลดีไฮด์ ทำให้คงสภาพอยู่ในลักษณะของเส้นใยที่บวมน้ำ

ปกติ การตายของแบคทีเรียเกิดเนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบกับหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมซึ่งมีประจุบวก การส่งสารต่าง ๆ ผ่านเซลล์เมมเบรนผิดปกติ แบคทีเรียเสียหาย และทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด

การต้านฤทธิ์แบคทีเรีย *S. aureus*. เกิดขึ้นจากอันตรกิริยาระหว่างประจุบวกของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมกับผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีส่วนประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ กรดไทโคอิก (teichoic acid) มีโครงสร้างเป็นสายพอลิเมอร์ของกรดฟอสเฟต มีหน้าที่เชื่อมต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ประจุลบ ส่งผลให้เซลล์เมมเบรนเสียหาย อีกปัจจัยหนึ่ง คือ ความไม่ชอบน้ำของสารต้านฤทธิ์แบคทีเรีย หากสารนั้นมีความไม่ชอบน้ำมาก ก็มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากขึ้น เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ QBzCS/PEO เปรียบเทียบกับ HTACC/PEO พบว่า HTACC มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ซึ่งมีความชอบน้ำ ทำให้ QBzCS/PEO มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีกว่า ถ้าพิจารณาการต้านฤทธิ์แบคทีเรีย *E. coli* ของ QBzCS เปรียบเทียบกับของ CS/PEO พบว่า QBzCS มีสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียที่สูงกว่า CS/PEO และ HTACC/PEO เพราะมีความไม่ชอบน้ำของหมู่แทนที่ ทำให้สามารถเข้ากันได้กับผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ คือ ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีความไม่ชอบน้ำมาก ประกอบกับผนังเซลล์มีความซับซ้อนมากกว่าผนังของแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้แบคทีเรียแกรมลบต้านทานสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Kim *et al.*, 1996; Lui *et al.*, 2004; Vallapa *et al.*, 2011)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การขึ้นรูปเส้นใยพอลิเมอร์เบลนด์ระหว่างไคโทซานกับพอลิเอทิลีนออกไซด์ โดยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต ใช้อัตราส่วนของไคโทซานต่อพอลิเอทิลีนออกไซด์เป็น 6.7 ต่อ 0.3 ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เบลนด์ 7% โดยน้ำหนัก การเติมพอลิเอทิลีนออกไซด์ลงในสารละลายพอลิเมอร์ ช่วยเพิ่มความสามารถในการขึ้นรูปสำหรับเทคนิคนี้ มีผลต่อขนาดเส้นใยพอลิเมอร์เบลนด์ นั่นคือ เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อปริมาณของพอลิเอทิลีนออกไซด์มากขึ้น การเพิ่มปริมาณพอลิเอทิลีนออกไซด์ ทำให้การกระจายตัวของเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเพิ่มขึ้นด้วย เส้นใยที่ได้มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 272 ± 56 นาโนเมตร มีลักษณะเรียบปราศจากปม

งานวิจัยนี้ สามารถกราฟต์หมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมบนแผ่นเส้นใยพอลิเมอร์เบลนด์ของไคโทซานกับพอลิเอทิลีนออกไซด์ได้ 2 ชนิดคือ ชนิดแรก กราฟต์ GTMAC บนผิวแผ่นเส้นใย CS/PEO ทำให้กลายเป็น *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethylammoniumchitosan chloride/poly(ethylene oxide) (HTACC/PEO) พิสูจน์เอกลักษณ์ของแผ่นเส้นใยนี้ด้วย FT-IR การบวมตัว และ XPS ได้ ชนิดที่สอง *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-chitosan iodide/poly(ethylene oxide) (QBzCS/PEO) ให้แผ่นเส้นใย CS/PEO ทำปฏิกิริยากับ benzyl aldehyde แล้วตามด้วยปฏิกิริยาเมทิลชันกับ methyl iodide สามารถยืนยันการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค FT-IR และ XPS

แผ่นเส้นใยทั้งสามนี้สามารถต้านฤทธิ์แบคทีเรียที่เวลาสัมผัสเชื้อแบคทีเรีย 0.5 และ 1 ชั่วโมง ทั้ง HTACC/PEO และ QBzCS/PEO ต้านเชื้อได้โดยมีเปอร์เซ็นต์ การลดลงของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้มากกว่า CS/PEO จากประจวบกับบนสารที่กราฟต์หมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไปเกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์แบคทีเรียที่มีประจุลบ สำหรับแบคทีเรีย *E. coli* ที่เวลาสัมผัสสาร 0.5 ชั่วโมง QBzCS/PEO มีเปอร์เซ็นต์ การลดลงของแบคทีเรียมากกว่า CS/PEO และ HTACC/PEO ส่วนเวลาสัมผัสสาร 0.1 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ การลดลงของแบคทีเรียเรียงตามลำดับดังนี้ QBzCS/PEO > HTACC/PEO > CS/PEO การกราฟต์หมู่ควอเทอร์นารีที่มีความไม่ชอบน้ำมาก ทำให้สามารถต้านฤทธิ์แบคทีเรียแกรมลบได้ดี เปรียบเทียบที่เวลาสัมผัสสารเท่ากัน พบว่า เส้นใยไคโทซานดัดแปรทั้ง 2 ชนิด มีสมบัติต้านฤทธิ์แบคทีเรีย *S. aureus* ดีกว่าแบคทีเรีย *E. coli* เนื่องจากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกมีความซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อเวลาสัมผัสระหว่าง

เชื่อมกับแผ่นอิเล็กทรอนิกส์โคโทซานทั้ง 3 ชนิด นานตั้งแต่ 4 ชั่วโมงขึ้นไป ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย ทั้ง 2 ชนิด มีค่าเท่ากับคือ ร้อยละ 99.9 แสดงว่า มีสมบัติการต้านฤทธิ์แบคทีเรียดีมาก

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เตรียมแผ่นเส้นใยโคโทซานตัดแปรที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำไปเป็นวัสดุต้นแบบของแผ่นปิดแผล จึงยังมีประเด็นที่น่าศึกษาอีกหลายประการ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ สมบัติการห้ามเลือด อีกทั้งโคโทซานตัดแปรนี้สามารถประยุกต์ในงานด้านอื่นได้ เช่น วัสดุนำส่งยา หรือ สารออกฤทธิ์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คทาวุธ ภาชนะ. (2554) เอกสารประกอบการสอนวิชา เคมีพื้นผิว. ชลบุรี: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2550) *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประภัสสร สุรวฒนาวรรณ. *ไคติน-ไคโตซาน*. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http:// 202.129.59.198/rdi/html/ chitin.html](http://202.129.59.198/rdi/html/chitin.html) [2554, เมษายน 20].

พิชญ์ ศุภผล, ผกากรอง สังข์เสนาะ และ พิมลพรรณ กำพลานนท์. (2552) กระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต. ใน *วัสดุชีวภาพรักษ์โลก*, หน้า 127-133. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ห้างหุ้นส่วนจำกัดมณีส फिल्ม.

ภัทรชัย กรดติลิน.(2549) *ตำราวิทยาแบคทีเรียทางการแพทย์* กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ภาษาอังกฤษ

Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F.A. and Zhang, M. (2005) Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 26: 6176–6184.

Cho, J. Grant, J. Miller, M.P. and Allen, C. (2006) *Synthesis and Physicochemical and Dynamic Mechanical Properties of a Water-Soluble Chitosan Derivative as a Biomaterial*. *Biomacromolecules* 7: 2845-2855.

Desai, K., Kit, K., Li, J. and Zivanovic, S. (2008). Morphological and surface properties of electrospun chitosan nanofibers. *Biomacromolecules* 9: 1000-1006.

- Gopal. R., Kaur. S., Ma. Z., Chan. C., Ramakrishna., S and Matsuura. T. (2006). Electrospun nanofibrous filtration membrane. *Journal of Membrane Science* 281(1-2): 581-586.
- Gopal. R., Kaur. S., Ma. Z., Feng. C. Y., Chan. C., Ramakrishna. S., Tabe. S. and Matsuura. T. (2007). Electrospun nanofibrous polysulfone membranes as pre-filters: Particulate removal. *Journal of Membrane Science* 289(1-2): 210-219.
- Guiping, M., Dongzhi, Y., Yingshan, Z., Yu, J. and Jun, N. (2007). Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl pyrrolidone) electrospun fibers. *Frontiers of Materials Science in China* 1(4): 432-436.
- Hirai, A., Odani, H and Nakajima, A. (1991) Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin* 26(1): 87-94.
- Ignatova, M., Manolova, N. and Rashkov, I. (2007) Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. *European Polymer Journal* 43: 1112-1122.
- Ignatova, M., Manolova, N., Markova, N. and Rashkov, I. (2009) Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications. *Macromolecular Bioscience* 9: 102-111.
- Ignatova, M., Starbova, K., Markova, N., Manolova, N. and Rashkov, I. (2006) Electrospun nanofibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly(vinyl alcohol). *Carbohydrate Research* 341: 2098-2107.
- Kampalanonwat, P. and Supaphol, P. (2010). Preparation and adsorption behavior of aminated electrospun polyacrylonitrile nanofiber mats for heavy metal ion removal. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2(12): 3619-3627.

- Ki, C. S., Gang, E. H., Um, C.I. and Park, Y.K. (2007). Nanofibrous membrane of wool keratose/silk fibroin blend for heavy metal ion adsorption. *Journal of Membrane Science* 302(1-2): 20-26.
- Kim, C.H., Choi, J.W., Chun, H.J. and Choi, K.S. (1997) Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. *Polymer Bulletin* 38: 387-393.
- Li, L., and Hsieh, Y-L. (2005) Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers. *Carbohydrate Research* 341: 374-381.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X. and Sun, L. (2004) Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology* 95: 147-155.
- Luu, Y., Kim, K. K., Hsiao B. S., Chu, B. and Hadjiargyrou, M. (2003) Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *Journal of Controlled Release* 89(2): 341-353.
- Ma, Z., He, W., Yong, T. and Ramakrishna, S. (2005) Grafting of Gelatin on Electrospun Poly(caprolactone) Nanofibers to Improve Endothelial Cell Spreading and Proliferation and to Control Cell Orientation. *Tissue Engineering* 11(7-8): 1149-1158.
- Mincheva, R., Manolova, N. and Rashkov, I. (2007) Bicomponent aligned nanofibers of *N*-carboxyethylchitosan and poly(vinyl alcohol). *European Polymer Journal* 43: 2809-2818.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. and Sharma C.P. (2009). Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation. *Progress in Polymer Science* 34: 641-678.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W-E., Lim, T-C. and Ma, Z. (2005). *An Introduction to electrospinning and nanofibers*. World Scientific Publishing Co. Pet. Ltd., Toh Tuck Link, Singapore.

- Rosa, S., Laranjeira, M.C.M., Riela, H.G. and F'aveire, V.T. (2008) Cross-linked quaternary chitosan as an adsorbent for the removal of the reactive dye from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 155: 253-260.
- Sangsanoh, P. and Supaphol, P. (2006). Stability Improvement of Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes in Neutral or Weak Basic Aqueous Solutions. *Biomacromolecules* 7(10): 2710-2714.
- Sangsanoh, P., Waleetorncheepsawat, S., Suwantong, O., Wutticharoenmongkol, P., Weeranantanapan, O., Chuenjitkuntaworn, B., Cheepsunthorn, P., Pavasant, P. and Supaphol, P. (2007). In vitro biocompatibility of schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds. *Biomacromolecules* 8(5): 1587-1594.
- Schiffman, J.D. and Schauer, C.L. (2008). A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. *Polymer Reviews* 48: 317-352.
- Seong, H-S., Whang, H. S. and Ko S-W. (2000) Quaternary ammonium derivative of chitooligosaccharide as antimicrobial agent for cellulosic fibers. *Journal of Applied Polymer Science* 76: 2009-2015.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y.J., (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology* 10: 37-51.
- Sill, T.J. and Recum, H.A.V. (2008). Review electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29: 1989-2006.
- Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., and Supaphol, P. (2007). Vitamin-Loaded Electrospun Cellulose Acetate Nanofiber Mats as Transdermal and Dermal Therapeutic Agents for Vitamin A Acid and Vitamin E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67(2): 387-397.

- Vallapa N. (2008) Preparation and antibacterial activity of quaternary ammonium-containing chitosan surface. Master's thesis, Petrochemical and Polymer Science, Chulalongkorn University, Bangkok Thailand.
- Vallapa, N., Wiarachai, O., Thongchul, N., Pan, J., Tangpasuthadol, V., Kiatkamjornwong, S. and Hoven, V.P. (2011) Enhancing antibacterial activity of chitosan surface by heterogeneous quaternization. *Carbohydrate Polymers* 83: 868-875.
- Verreck, G., Chun, I., Peeters, J., Rosenblatt, J. and Brewster, M.E. (2003). Preparation and Characterization of Nanofibers Containing Amorphous Drug Dispersions Generated by Electrostatic Spinning. *Pharmaceutical Research* 20(5):810-817.
- Wiarachai O. (2008) Antibacterial activity of quaternary ammonium-containing chitosan particles. Masters thesis, Petrochemical and Polymer Science, Chulalongkorn University, Bangkok Thailand.
- Wiarachai, O. and Kanchanasuwan, O. (2005) Preparation of hydrogel from *N,N,N*-trimethylchitosan for controlled release of protein. Senior project, Department of chemistry, Faculty of science, Chulalongkorn University, Bangkok Thailand.
- Zhang, Y. Z., Su, B., Ramakrishna, S. and Lim, C. T. (2008) Chitosan nanofibers from an easily electrospinnable UHMWPEO-doped chitosan solution system. *Biomacromolecules* 9: 136-141.
- Zhou, Y., Yang, D., Chen, X., Xu, Q., Lu, F. and Nie, J. (2008) Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for Skin regeneration. *Biomacromolecules* 9: 349-354.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางก-1 เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย CS/PEO ที่อัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนระหว่าง CS/PEO	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (นาโนเมตร)
7.00/0.00	149 ± 33
6.90/0.10	234 ± 49
6.80/0.20	265 ± 47
6.70/0.30	272 ± 56
6.60/0.40	350 ± 83
6.50/0.50	624 ± 106

ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใย 100 เส้น

ตารางก-2 การบวมน้ำ

เวลาทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	การบวมน้ำของผลิตภัณฑ์จาก GTMAC ณ ภาวะ	
	Neutralized chitosan	Non-Neutralized chitosan
0	134 ± 7	758 ± 66
2	146 ± 4	154 ± 12
4	149 ± 12	167 ± 4
6	152 ± 12	207 ± 9
8	164 ± 22	315 ± 2
12	156 ± 13	335 ± 16
16	162 ± 26	266 ± 25
20	167 ± 15	276 ± 19
24	159 ± 23	306 ± 19

ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ภาคผนวก ข

ตารางข-1 %reduction ของแบคทีเรีย *S. aureus* เมื่อสัมผัสกับ CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO

เวลาสัมผัสสาร	%reduction		
	CS/PEO	HTACC/PEO	QBzCS/PEO
0.5	6.9 ± 2.3	25 ± 8.4	40.0 ± 11.2
1	8.0 ± 3.9	33.1 ± 5.4	50.5 ± 3.7
2	72.4 ± 13.5	73.3 ± 10.1	72.3 ± 0.4
4	99.3 ± 0.2	99.7 ± 0.5	99.3 ± 0.0
24	99.9 ± 0.0	99.9 ± 0.0	99.9 ± 0.0

ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ตารางข-2 %reduction ของแบคทีเรีย *E. coli* เมื่อสัมผัสกับ CS/PEO, HTACC/PEO และ QBzCS/PEO

เวลาสัมผัสสาร	%reduction		
	CS/PEO	HTACC/PEO	QBzCS/PEO
0.5	8.1 ± 2.9	8.5 ± 4.9	30.5 ± 6.2
1	8.7 ± 4.9	19.8 ± 3.6	39.3 ± 9.3
2	71.6 ± 7.2	79.7 ± 3.0	82.6 ± 1.5
4	98.5 ± 1.1	98.6 ± 1.6	98.5 ± 0.2
24	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0

ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวลัษวัลย์ เตียวตระกูลวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2527 ที่จังหวัดสิงห์บุรี สำเร็จการศึกษาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยศิลปากร ในปี พ.ศ. 2550 และได้เข้าศึกษาต่อที่สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2551

งานวิจัยนี้บางส่วนจากวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ได้นำเสนอแบบ Oral presentation เรื่อง “Surface modification of electrospun chitosan” บทความเลขที่ 124 หน้า 465-468 ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Pure and Applied Chemistry International Conference 2011 (PACCON 2011) จัดโดยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒและสมาคมเคมีแห่งประเทศไทย วันที่ 5-7 มกราคม 2554 ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชัน, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย