



รายงานการวิจัย

การศึกษากิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียของเม็ดบีคัลอัลจินต/ไคโตซาน/
ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

A study of antibacterial activity of alginate/chitosan/
silver nanoparticle beads on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

ดร.ภวิกา มหาสวัสดิ์

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

พ.ศ. 2559

ชื่องานวิจัย	การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเมล็ดบีคัลจินเนต/โคโคซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเชื้อ <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>
ผู้วิจัย	ดร.ภวิกา มหาสวัสดิ์
คณะ	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ปี	2559

บทคัดย่อ

ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่กว้าง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของเมล็ดบีคัลจินเนต/โคโคซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล (S1, S2 และ S3) และเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล จากเมล็ดบีคัลจินเนต/โคโคซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ต่อฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ความเข้มข้นเริ่มต้นของอัลจินเนต/โคโคซานที่ใช้เป็น 2%w/v และ 0.05%w/v ตามลำดับ สำหรับการเตรียมเมล็ดบีคัล S1 หลังจากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของอัลจินเนตเป็น 4 และ 6%w/v และความเข้มข้นของโคโคซานเป็น 0.1 และ 0.15%w/v สำหรับการเตรียมเมล็ดบีคัล S2 และ S3 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับเมล็ดบีคัลที่ไม่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล (C1, C2 และ C3) จากผลการทดลองพบว่า เมล็ดบีคัล S1 ($1,149.76 \pm 201.27 \mu\text{m}$) ที่เตรียมได้ มีขนาดเล็กกว่าเมล็ดบีคัล S2 ($1,263.18 \pm 203.71 \mu\text{m}$) และเมล็ดบีคัล S3 ($1,324.50 \pm 197.80 \mu\text{m}$) ตามลำดับ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเมล็ดบีคัล S1 ($0.99 \pm 0.02 \%w/w$) มากกว่าเมล็ดบีคัล S2 ($0.6 \pm 0.02 \%w/w$) และเมล็ดบีคัล S3 ($0.29 \pm 0.01 \%w/w$) ตามลำดับ ($p < 0.05$) นอกจากนี้พบว่า เมล็ดบีคัล S1, S2 และ S3 สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีชีวิตใน PBS (pH 7.4) ได้มากกว่าเมล็ดบีคัล C1, C2 และ C3 อย่างมีนัยสำคัญ ตามลำดับ ($p < 0.05$) ค่า MBC ของเมล็ดบีคัล S1, S2 และ S3 ต่อเชื้อ *E. coli* มีค่าเป็น 10, 10 และ 3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และค่า MBC ของเมล็ดบีคัล S1, S2 และ S3 ต่อเชื้อ *S. aureus* มีค่าเป็น >10, 10 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเพิ่มขึ้น ปริมาณซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ตรวจพบเพิ่มขึ้นเช่นกัน ถึงแม้ว่า เมล็ดบีคัล S1 สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลได้มากกว่าเมล็ดบีคัล S2 และเมล็ดบีคัล S3 ตามลำดับ ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเมล็ดบีคัล S3 มีแนวโน้มยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าเมล็ดบีคัล S2 และ S1 ตามลำดับ จึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเมล็ดบีคัล S1, S2 และ S3 นั้น ไม่ได้ขึ้นกับซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยออกมาเพียงอย่างเดียว อาจขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของอัลจินเนต/โคโคซานด้วย ดังนั้นเมล็ดบีคัลอัลจินเนต/โคโคซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ในการศึกษานี้ สามารถนำไปใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ต่อไป

Research Title	A study of antibacterial activity of alginate/chitosan/silver nanoparticle beads on <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>
Researcher	Dr. Pawika Mahasawat
Faculty	Science and Technology
Year	2016

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have been used extensively, because of their broad antibacterial activity. Therefore, the aim of this study was to study the antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 of alginate/chitosan/silver nanoparticle beads (S1, S2 and S3), and to determine a correlation between a release of silver ions (Ag^+) and/or AgNPs from alginate/chitosan/silver nanoparticle beads and the antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. Initial concentrations of alginate and chitosan were 2%w/v and 0.05%w/v, respectively, for the preparation of S1 beads. Then, the concentrations of alginate were increased to 4 and 6%w/v, and those of chitosan were raised to 0.1 and 0.15%w/v for the preparation of S2 and S3 beads, respectively. These were compared with the beads without AgNPs (C1, C2 and C3). The results showed that the prepared S1 beads ($1,149.76 \pm 201.27 \mu\text{m}$) were smaller than S2 beads ($1,263.18 \pm 203.71 \mu\text{m}$) and S3 beads ($1,324.50 \pm 197.80 \mu\text{m}$), respectively ($p > 0.05$). Moreover, loading capacity of AgNPs in S1 beads ($0.99 \pm 0.02 \text{ %w/w}$) was higher than that in S2 beads ($0.6 \pm 0.02 \text{ %w/w}$) and in S3 beads ($0.29 \pm 0.01 \text{ %w/w}$), respectively ($p < 0.05$). Furthermore, S1, S2 and S3 beads could significantly reduce the viable *E. coli* and *S. aureus* in PBS (pH 7.4) greater than C1, C2 and C3 beads, respectively ($p < 0.05$). MBC values of S1, S2 and S3 beads against *E. coli* were 10, 10 and 3 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and the MBC values of S1, S2 and S3 beads against *S. aureus* were >10 , 10 and 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Moreover, when the initial concentrations of AgNPs were increased, the concentrations of detected Ag^+ also increased. Even though S1 beads could release more Ag^+ and/or AgNPs than S2 and S3 beads, respectively, bactericidal activity of S3 beads against *E. coli* and *S. aureus* tended to be higher than that of S2 and S1 beads, respectively. This might be because the bactericidal activity against *E. coli* and *S. aureus* of S1, S2 and S3 beads did not only depend on Ag^+ and/or AgNPs, but also might be due to the concentrations of alginate/chitosan. Therefore, these prepared alginate/chitosan/AgNP beads can be further used for the inhibition of bacterial cells.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ประจำปีงบประมาณ 2559 อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบผลงานวิจัยฉบับนี้ให้เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และขอมอบความกตัญญูกตเวทิตาคุณ แด่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

ภวิกา มหาสวัสดิ์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สิงหาคม 2560



สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ช
สารบัญภาพ		ซ
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
	1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	2.1 ทฤษฎีด้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	5
	2.2 การคอมโพสิตซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลกับพอลิเมอร์	10
	2.3 การนำอัลจินต/ไคโตซานไปใช้ในทางการแพทย์	14
บทที่ 3	วิธีการทดลอง	16
	3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	16
	3.2 วิธีการทดลอง	17
	3.2.1 การเตรียมเม็บบีคอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	17
	3.2.1.1 การเตรียมสารแขวนลอยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	17
	3.2.1.2 การเตรียมเม็บบีคอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	17
	3.2.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	18
	3.2.2.1 การตรวจสอบรูปร่าง ขนาด และศักย์ซีต้าของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	18
	3.2.2.2 การตรวจสอบสเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	19
	3.2.3 การตรวจสอบคุณลักษณะของเม็บบีค C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	19

	หน้า	
3.2.3.1	การศึกษารูปร่างและขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	19
3.2.3.2	การศึกษาความสามารถในการบรรจุ (%) ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3	19
3.2.3.3	การหาค่าการสูญเสียของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	19
3.2.4	การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	20
3.2.5	การศึกษาการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3	20
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	21
4.1	การตรวจสอบคุณลักษณะของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	21
4.1.1	การศึกษารูปร่าง ขนาด และศักย์ซีต้าของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	21
4.1.2	การตรวจสอบสเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	23
4.2	การตรวจสอบคุณลักษณะของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	24
4.2.1	รูปร่างและขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	24
4.2.2	การศึกษาความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3	31
4.2.3	การหาค่าการสูญเสียของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	32
4.3	การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	33
4.4	การศึกษาการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3	36
บทที่ 5	สรุปและข้อเสนอแนะ	39
5.1	สรุป	39
5.2	ข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง		41
ภาคผนวก		47
ก	ข้อมูลการทดลอง	47

	หน้า	
ก1	ขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	47
ก2	ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3	50
ก3	ค่าการสูญเสียน้ำของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	51
ก4	ฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	52
ก5	การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3	54
ข	ประวัติผู้วิจัย	55
ค	การเผยแพร่ผลงาน	57



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ผลิตภัณฑ์ที่กำหนดในท้องตลาดที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	1
2.1	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเชื้อแบคทีเรียกรัม ลบ	6
2.2	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเชื้อแบคทีเรียกรัม บวก	8
3.1	เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	16
3.2	สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	16
3.3	ความเข้มข้นสารละลายอัลจินต ไคโตซาน และแคลเซียมไนเตรท	17
3.4	ความเข้มข้นสารละลายอัลจินต ไคโตซาน แคลเซียมไนเตรท และซิล เวอร์นาโนพาร์ติเคิล	18
ก1	ขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	47
ก2	ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3	50
ก3	ค่าการสูญเสียของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	51
ก4	ฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>E. coli</i> ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	52
ก5	ฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> เม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	53
ก6	ปริมาณการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล จากเม็ดบีด S1, S2 และ S3 หลังจากตรวจสอบด้วยเครื่อง ICP-OES	54

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
4.1	รูปร่าง ขนาด และการกระจายขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลตรวจสอบด้วยกล้อง TEM	22
4.2	ขนาด และการกระจายขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลตรวจสอบด้วยเทคนิค DLS	23
4.3	สเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	24
4.4	ลักษณะของเม็ดบีดในระหว่างการทำแห้ง	25
4.5	รูปร่างและขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 ตรวจสอบด้วยกล้อง optical microscope	26
4.6	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	27
4.7	รูปร่างและพื้นผิวของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 ตรวจสอบด้วยกล้อง SEM	28
4.8	ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3	32
4.9	ค่าการสูญเสียของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	32
4.10	ฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3	34
4.11	ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3	35
4.12	การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3	36
4.13	ความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล จากเม็ดบีด S1, S2 และ S3 กับฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>	38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในอดีตได้มีการนำซิลเวอร์ (silver; Ag) มาใช้อย่างกว้างขวางในทางการแพทย์ เพื่อใช้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial agent) เช่น การนำสารประกอบซิลเวอร์ (silver compound) มาใช้รักษาบาดทะยัก (tetanus), ข้ออักเสบเรื้อรัง (rheumatoid arthritis), ไข้หวัด (colds) และ หนองใน (gonorrhoea) เป็นต้น [1,2] แต่เนื่องจากมีรายงานการเกิดความผิดปกติของสีผิวของมนุษย์ (blue-grey discoloration) หลังจากมีการสัมผัสกับสารประกอบซิลเวอร์ในปริมาณที่มากพอ [3,4] ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการนำซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล (silver nanoparticles; AgNPs) มาใช้ เนื่องจากมีรายงานว่าซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีความเป็นพิษ (toxicity) ต่อเซลล์มนุษย์ (human cells) น้อยกว่าสารประกอบซิลเวอร์ [5-7] และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์ยังคงอยู่ ถึงแม้จะเตรียมซิลเวอร์ในรูปแบบนาโนพาร์ติเคิลก็ตาม ซึ่งมีหลายการศึกษาได้รายงานถึงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบออกฤทธิ์กว้างของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ได้แก่ มีรายงานถึงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลทั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบ (เช่น *E. coli*, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* เป็นต้น) และแบคทีเรียแกรมบวก (เช่น *B. subtilis*, *M. bovis* BCG, *M. smegmatis* และ *S. aureus* เป็นต้น) [8-10] ทั้งนี้เนื่องจากซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบออกฤทธิ์กว้าง ทำให้ในปัจจุบันได้มีการนำซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในท้องตลาดมากมาย ดังแสดงในตารางที่

1.1

ตารางที่ 1.1 ผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในท้องตลาดที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล [11]

ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	เปอร์เซ็นต์
ครีมและเครื่องสำอาง	32.4
ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ	4.1
เสื้อผ้า	18
เครื่องกรองอากาศและเครื่องกรองน้ำ	12.3
ผลิตภัณฑ์ในครัวเรือน	16.4
น้ำยาทำความสะอาด	8.2
อื่น ๆ	8.6

ดังนั้นที่ผ่านมา จึงมีหลายการศึกษาได้ศึกษาถึงความปลอดภัยของการใช้ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อมนุษย์ โดยศึกษาความเป็นพิษของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเซลล์ (cytotoxicity) ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า มี

หลายการศึกษาได้รายงานถึงความเป็นพิษของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเซลล์มนุษย์ เช่น ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาด 5-10 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น $3.38 \pm 0.55 \mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์ HepG2 cells ลง 50% (IC_{50} $3.38 \pm 0.55 \mu\text{g/ml}$) [7], นอกจากนี้ยังพบว่า ความเป็นพิษของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาด 5, 20 และ 50 นาโนเมตร ต่อเซลล์ A549 cells, SGC-7901 cells, HepG2 cells และ MCF-7 cells ขึ้นกับขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาด 5 นาโนเมตร มีความเป็นพิษมากกว่าซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาด 20 และ 50 นาโนเมตร ตามลำดับ [12] เป็นต้น

ดังนั้นเพื่อลดความเป็นพิษของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลลง จึงได้มีการนำซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมาบรรจุลงในเม็ดปิด (beads) ที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) เช่น อัลจิเนต (alginate), ไคโตซาน (chitosan) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose: CMC) เป็นต้น และศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียของเม็ดปิดที่ได้ ซึ่งพบว่า ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่บรรจุในพอลิเมอร์ยังคงมีฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่บรรจุในอัลจิเนตและไคโตแลคไฮโดรเจล (alginate-chitlac hydrogels containing AgNPs) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ หลังจากบ่ม (incubate) เป็นเวลา 30 นาที และยังพบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ หลังจากบ่มเชื้อ *S. epidermidis* กับอัลจิเนตและไคโตแลคไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง [13] นอกจากนี้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *B. subtilis* และมีขอบเขตการยับยั้ง (inhibition zone) เป็น 13, 15, 14 และ 13 มิลลิเมตร ตามลำดับ [14] เป็นต้น

แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาใด ที่ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมเม็ดปิดต่อฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นในการศึกษานี้ ได้เลือกใช้พอลิเมอร์ชีวภาพ คือ อัลจิเนต และไคโตซาน ในการเตรียมเม็ดปิดที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล เนื่องจากการนำเม็ดปิดอัลจิเนต/ไคโตซาน มาใช้ในการนำส่งซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลนั้น ยังมีผู้ศึกษาน้อยมาก [13,15] นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงข้อดีของการใช้อัลจิเนตร่วมกับไคโตซาน เช่น การใช้อัลจิเนตร่วมกับไคโตซานสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับไคโตซาน/อัลจิเนตไฮโดรเจล (chitosan/alginate hydrogel) ในสารละลายที่จำลองสภาวะในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (physiological solution) ได้ดีกว่าการใช้ไคโตซานหรืออัลจิเนตเดี่ยวๆ [16] นอกจากนี้การใช้อัลจิเนต/ไคโตซานร่วมกันในโครงร่างแหอัลจิเนต/ไคโตซาน (alginate/chitosan scaffold) เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะ ยังส่งผลต่อขนาดของรู (pore size) ของโครงร่างแหอัลจิเนต/ไคโตซาน โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของไคโตซาน/อัลจิเนตเพิ่มขึ้น ขนาดรูของโครงร่างแหอัลจิเนต/ไคโตซานจะลดลง ซึ่งจะมีผลต่อการปลดปล่อยสารสำคัญต่อไป [17] และยังมีรายงานว่า การใช้ไคโตซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกเดี่ยวๆ ไม่เหมาะที่จะใช้ในทางวิศวกรรม

เนื้อเยื่อ (tissue engineering) แต่การใช้ร่วมกับอัลจินตซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุลบและช่วยการเจริญเติบโตของเซลล์ จะส่งผลดีในทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากกว่า [16]

ดังนั้นในการศึกษานี้ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ซึ่งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นประจำในแผลเรื้อรัง (chronic wounds) [18] การติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน (skin and soft tissue infections) [19] โดยเริ่มต้นจากการเตรียมเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซานที่แตกต่างกัน และศึกษาคุณลักษณะของเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ โดยศึกษาขนาด ความสามารถในการบรรจุ และการสูญเสียน้ำ หลังจากนั้น ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลออกจากเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล จากเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ต่อฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- (1) เพื่อเตรียมและศึกษาคุณลักษณะของเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล
- (2) เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของอัลจินต/ไคโตซาน ต่อขนาดของเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล และต่อความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล
- (3) เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ต่อฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ในการศึกษานี้ ต้องการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยหากเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ สามารถต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ดังนั้น ในอนาคตข้างหน้า สามารถนำเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล มาใช้ในการต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ต่อไป โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบในวัสดุปิดแผล เนื่องจากเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เป็นเชื้อที่พบได้ในแผลเรื้อรัง [18]

1.4 ขอบเขตการวิจัย

เตรียมเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซาน ดังนี้ 1% และ 0.05%, 2% และ 0.1% และ 3% และ 0.15% หลังจากนั้นศึกษาคุณลักษณะของ

เมล็ดบีคัลจินเนต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ ได้แก่ การศึกษารูปร่างและขนาดของเมล็ดบีคัล โดยใช้อุปกรณ์จุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) การศึกษาความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเมล็ดบีคัล โดยใช้เครื่อง inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) และการหาค่าการสูญเสียของเมล็ดบีคัล หลังจากนั้นศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเมล็ดบีคัลอัลจินเนต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยการบ่มเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* กับเมล็ดบีคัลอัลจินเนต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล เป็นเวลา 24 ชม. โดยปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีชีวิตอยู่ สามารถหาได้โดยวิธี viable count ซึ่งค่าที่ได้มีหน่วยเป็น colony forming unit/ml หรือ CFU/ml หลังจากนั้น ศึกษาการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลออกจากเมล็ดบีคัลอัลจินเนต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเมล็ดบีคัลอัลจินเนต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล กับปริมาณซิลเวอร์ไอออนและ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยออกจากเมล็ดบีคัลอัลจินเนต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบออกฤทธิ์กว้าง โดยครอบคลุมทั้งต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (เช่น *E. coli*, *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* เป็นต้น) และแบคทีเรียแกรมบวก (เช่น *B. subtilis*, *M. bovis* BCG, *M. smegmatis* และ *S. aureus* เป็นต้น) [8-10] ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2 ตามลำดับ

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลอาจเนื่องมาจากอันตรกิริยา (interaction) ของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดรู (pit) ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งนำไปสู่การสะสมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเซลล์แบคทีเรีย โดยเมื่อซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแล้ว จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ respiratory chain dehydrogenase [10] และเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) ภายในเซลล์แบคทีเรีย และทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด [10,20] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลยังเกิดจากซิลเวอร์ไอออนที่ถูกปลดปล่อยออกมาเพียงอย่างเดียว ไม่ได้เกิดจากอนุภาคของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล [21] ซึ่งการศึกษานี้ได้ศึกษากับซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ถูกเคลือบด้วย PEG ที่มีขนาด 5 nm และ 11 nm ต่อเชื้อ *E. coli* ภายใต้สภาวะที่ใช้ ออกซิเจน (aerobic) และไม่ใช่ ออกซิเจน (anaerobic) โดยใช้ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาด 5 nm และ 11 nm ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน และเฉพาะซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาด 5 nm ในสภาวะที่ใช้ ออกซิเจน จากการทดลองพบว่า ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน เชื้อ *E. coli* มีชีวิตรอด 100% ที่ความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาด 5 nm และ 11 nm เป็น 158 $\mu\text{g/ml}$ และ 195 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แต่ในสภาวะที่ใช้ ออกซิเจนพบว่า เชื้อ *E. coli* ที่มีชีวิตรอดมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง และพบว่าสามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้สมบูรณ์ (100%) เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ภายใต้ magnetic stirring หลังจากสัมผัสกับซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาด 5 nm ที่ความเข้มข้น $\sim 90 \mu\text{g/ml}$ จากการทดลองพบว่า ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลถูกออกซิไดซ์และปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนเมื่อสัมผัสกับอากาศ ดังแสดงในสมการที่ 2.1 และภายใต้สภาวะกรด ดังแสดงในสมการที่ 2.2 [21] ดังนี้



ตารางที่ 2.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

สายพันธุ์	เกลือซิลเวอร์	ตัวรีดิวซ์	สเตบิลไลเซอร์	ขนาด (nm)	ความเข้มข้นแบคทีเรีย [CFU/ml]	MIC ^a [µg/ml]	อื่น ๆ	อ้างอิง
<i>Acinetobacter Baumannii</i>	AgNO ₃	Gallic acid	-	20-25 ^b	-	0.4±0.1	-	[8]
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	5 ^c	5 × 10 ⁵	25	-	[10]
	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	15 ^c		50		
	AgNO ₃	PEG	PVP	55 ^c		200		
<i>Escherichia coli</i>	AgNO ₃	Ascorbic acid	Daxad19	12 ^c	10 ⁵	-	การยับยั้งสมบูรณ์ที่ 50-60 µg/ml	[22]
	AgNO ₃	NaBH ₄	-	13.5 ^c	10 ⁷	0.36-0.72 × 10 ⁻³	-	[23]
	AgNO ₃	NaBH ₄	PVA	15 ^c	-	-	การยับยั้งที่ ~ 55% ที่ 1 µg/ml	[24]
	-	-	-	21 ^d	10 ⁷ -10 ⁸	-	~250x10 ⁶ particles/cm ³ สามารถยับยั้งได้ 99% หลังจาก 1 นาที	[25]
	-	-	-	7 ^b	-	6.25	-	-
	AgNO ₃	Gallic acid	-	29 ^b	10 ⁵	13.02	-	[9]
	-	-	-	89 ^b	-	11.79	-	-
	-	-	-	16 ^c	10 ⁴	-	การยับยั้งสมบูรณ์ที่ 60 µg/ml	[26]
	-	-	-	5 ^c	10 ⁷	-	การยับยั้งสมบูรณ์ที่ 10 µg/ml	[27]
	AgNO ₃	Gallic acid	-	20-25 ^b	-	0.5±0.2	-	[8]
AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	5 ^c	-	6	-	-	
AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	15 ^c	10 ³	12	-	[10]	
AgNO ₃	PEG	PVP	55 ^c	-	100	-	-	

สายพันธุ์	เกลือซิลเวอร์	ตัวรีดิวซ์	สเตบิลไลเซอร์	ขนาด (nm)	ความเข้มข้นแบคทีเรีย [CFU/ml]	MIC ^a [µg/ml]	อื่นๆ	อ้างอิง
	AgNO ₃	UV radiation	Branched polyethyleneimine	10±4.6 ^a ; 10.9±0.8 ^b			EC ₅₀ 305±33 µg/L	
	-	-	PVP	72±24 ^a ; 11±0.7 ^b	-		EC ₅₀ 793±71 µg/L	[28]
	AgNO ₃	Sodium citrate	Citrate	56±14 ^a ; 10.9±0.8 ^b			EC ₅₀ 2041±5 µg/L	
				10 ^c			EC ₅₀ 0.27±0.2 µg/ml	
				20 ^c			EC ₅₀ 0.51±0.24 µg/ml	
	-	-	Citrate	40 ^c	2-3 × 10 ⁷	-	EC ₅₀ 1.51±1.12 µg/ml	[29]
				60 ^c			EC ₅₀ 2.56±1.6 µg/ml	
				80 ^c			EC ₅₀ 2.96±1.83 µg/ml	
<i>Fusobacterium Nucleatum</i>	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	5 ^e		25		
	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	15 ^c	10 ³	50	-	[10]
	AgNO ₃	PEG	PVP	55 ^c		100		
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	-	-	-	20, 40, 60	10 ⁵	-	No antibacterial activity with AgNP dose of 0.1-0.28 µg/ml	[30]
	AgNO ₃	Gallic acid	-	20-25 ^b	-	0.4±0.1	-	[8]
				10 ^c			EC ₅₀ value of 0.55±0.22 µg/ml	
				20 ^c			EC ₅₀ value of 0.99±0.4 µg/ml	
<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	-	-	Citrate	40 ^c	2-3 × 10 ⁷	-	EC ₅₀ value of 2.12±1.11 µg/ml	[29]
				60 ^c			EC ₅₀ value of 3.81±1.22 µg/ml	
				80 ^c			EC ₅₀ value of 5.25±1.82 µg/ml	

^aMIC = minimum inhibitory concentration; ขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลวัดด้วย ^bDLS, ^cTEM และ ^dScanning mobility particle sizer; - ไม่มีการรายงาน

ตารางที่ 2.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

สายพันธุ์	เกลือซิลเวอร์	ตัวรีดิวซ์	สเตบิลไลเซอร์	ขนาด (nm)	ความเข้มข้น แบคทีเรีย [CFU/ml]	MIC ^a [µg/ml]	อื่น ๆ	อ้างอิง
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	21 ^b	10 ⁷ -10 ⁸	-	~250x10 ⁶ particles/cm ³ สามารถยับยั้งได้ 99% หลังจาก 9 นาที	[25]
	AgNO ₃	Gallic acid	-	20-25 ^c	-	1.7±0.2	-	[8]
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	AgNO ₃	Gallic acid	-	20-25 ^c	-	1.1±0.0	-	[8]
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	AgNO ₃	Gallic acid	-	20-25 ^c	-	0.5±0.3	-	[8]
<i>Staphylococcus aureus</i>	AgNO ₃	NaBH ₄	-	13.5 ^d	-	>3.6 × 10 ⁻³	-	[23]
	AgNO ₃	Gallic acid	-	7 ^b	10 ⁵	7.5	-	[9]
				29 ^b		16.67		
89 ^b	33.71							
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	5 ^d	10 ⁷	-	Minimum bactericidal concentration (MBC) 20 µg/ml	[31]
	AgNO ₃	Gallic acid	-	20-25 ^c	-	0.7±0.2	-	[8]
	AgNO ₃	Ascorbic acid	Chitosan	20±2 ^d	10 ⁷	1.25±0.75 (สายพันธุ์ UCLA 8076); 0.75±0.25 (สายพันธุ์ 1190R)	MBC 6 µg/ml	[32]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	21 ^b	10 ⁷ -10 ⁸	-	~250x10 ⁶ particles/cm ³ สามารถยับยั้งได้ 99% หลังจาก 1 นาที; ~100x10 ⁶ particles/cm ³ สามารถยับยั้งได้ 99% หลังจาก 9 นาที	[25]
<i>Streptococcus mitis</i>	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	5 ^d	5 × 10 ⁵	25	-	[10]
	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	15 ^d		50		

สายพันธุ์	เกลือซิลเวอร์	ตัวรีดิวซ์	สเตบิลิเซอร์	ขนาด (nm)	ความเข้มข้น แบคทีเรีย [CFU/ml]	MIC ^a [μg/ml]	อื่น ๆ	อ้างอิง
	AgNO ₃	PEG	PVP	55 ^d		100		
				8.4 ^c		66.9		
	AgNO ₃	Gallic acid	-	16.1 ^c	6 × 10 ⁵	108.3	-	[33]
				98 ^c		222.9		
<i>Streptococcus mutans</i>	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	5 ^d		50		
	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	15 ^d	5 × 10 ⁵	50	-	[10]
	AgNO ₃	PEG	PVP	55 ^d		200		
	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	5 ^d		50		
<i>Streptococcus sanguis</i>	AgNO ₃	NaBH ₄	PVP	15 ^d	5 × 10 ⁵	50	-	[10]
	AgNO ₃	PEG	PVP	55 ^d		100		

^aMIC = minimum inhibitory concentration; ขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลวัดด้วย ^bScanning mobility particle sizer, ^cDLS and ^dTEM; - ไม่มีการรายงาน

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขึ้นกับปริมาณซิลเวอร์ไอออนที่ปลดปล่อยออกมาจากซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลภายใต้สภาวะที่ใช้ออกซิเจน ซึ่งหากปริมาณซิลเวอร์ไอออนที่ปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน [21]

2.2 การคอมโพสิตซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลกับพอลิเมอร์

เนื่องจากซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบออกฤทธิ์กว้างและมีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และช่วยทำให้แผลหายเร็วขึ้น [34] ทำให้ในปัจจุบันมีหลายการศึกษา ที่ได้นำซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมาคอมโพสิต (composite) กับพอลิเมอร์ และเตรียมในรูปแบบต่าง ๆ เช่น แผ่นแปะและเม็บบิด เป็นต้น เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอุปกรณ์ที่ใช้ในทางการแพทย์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป ดังนี้

Maneerung และคณะ (2008) ได้เตรียมแผ่นเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย (bacterial cellulose) ที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยแช่แผ่นเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท และตามด้วยสารละลาย sodium borohydride โดยการเกิดซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง silver nitrate และ sodium borohydride หลังจากนั้นทำแผ่นเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลให้แห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) นอกจากนี้พบว่าแผ่นเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลหลังจากทำแห้งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้สูง และมีขอบเขตการยับยั้งเป็น 2 mm และ 3.5 mm ตามลำดับ นอกจากนี้ % การลดลง (% reduction) ของเชื้อ *E. coli* และ *S. Aureus* หลังจากการนับการเกิดโคโลนี (colony forming unit count) ที่ 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับที่ 0 ชั่วโมง เป็น 99.7% และ 99.9% ตามลำดับ [35]

Travan และคณะ (2009) ได้เตรียมอัลจินตและไคโตแลค (chitlac; 1-deoxylactit-1-yl chitosan) ไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล (alginate-chitlac hydrogels containing AgNPs) ซึ่งเตรียมโดยละลายไคโตแลคกับ silver nitrate เข้าด้วยกัน หลังจากนั้นเติมสารละลายกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) โดยการเกิดซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง silver nitrate และกรดแอสคอร์บิก หลังจากนั้นนำสารละลายข้างต้นผสมกับสารละลายอัลจินต และนำไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อให้เกิดเป็นไฮโดรเจลโดยสมบูรณ์ ซึ่งพบว่าอัลจินตและไคโตแลคไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. epidermidis* ที่มีชีวิต (viable cell) ลงได้อย่างชัดเจนหลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาที และสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. epidermidis* ที่มีชีวิตลงได้อย่างสมบูรณ์หลังจากบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง [13]

Obradovic และคณะ (2012) ได้คอมโพสิตอัลจินเตกับพอลิเมอร์ ได้แก่ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (poly-vinyl alcohol, PVA) และ poly-N-vinyl-2-pyrrolidone (PVP) และนำมาเตรียมในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ เม็ดบีด และ แผ่นดิสก์ (disc) และนำมาบรรจุด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยมีวิธีการเตรียมคือ ละลายอัลจินเตกับ silver nitrate และนำสารละลายดังกล่าวมาละลายกับ PVA หรือ PVP หลังจากนั้นนำมาหยดในสารละลาย แคลเซียมไนเตรทเพื่อให้เกิดเป็นเม็ดบีด สำหรับการเตรียมเป็นแผ่นดิสก์นั้น นำสารละลายข้างต้นมาใส่ใน 6- หรือ 12-well plate และทำให้แห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และตามด้วยการเติมสารละลาย แคลเซียมไนเตรท เพื่อให้เกิดเป็นไฮโดรเจลอย่างสมบูรณ์ ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* พบว่า เม็ดบีดซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล/อัลจินเต/PVA สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* จากความเข้มข้น $1.45 \pm 0.18 \times 10^6$ CFU/ml ลงจนเหลือความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* เป็น $3.61 \pm 2.13 \times 10^4$ และ $1.58 \pm 0.67 \times 10^3$ หลังจากเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ [36]

Hebeish และคณะ (2013) ได้เตรียมคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยมีวิธีเตรียม 2 วิธีด้วยกัน โดยวิธีแรกได้เตรียมแผ่นคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสไฮโดรเจลก่อนแล้วแช่แผ่นคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสไฮโดรเจลในสารละลาย silver nitrate และตามด้วยสารละลาย sodium citrate โดยการเกิดซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจะเกิดโดยปฏิกิริยาระหว่าง silver nitrate และ sodium citrate ในแผ่นคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสไฮโดรเจล ส่วนวิธีที่สองเตรียมโดย ละลายคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสกับ silver nitrate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จนได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งเป็นการยืนยันการเกิดซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล และหลังจากนั้นนำสารละลายข้างต้นมาเตรียมเป็นแผ่นคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสไฮโดรเจล นอกจากนี้พบว่า การเตรียมแผ่นคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลโดยวิธีที่สอง ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้สูง และมีขอบเขตการยับยั้งเป็น 13, 15, 14 และ 13 mm ตามลำดับ [14]

Sharma และคณะ (2014) ได้เตรียมตัวพาระดับนาโนของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล/อัลจินเต/ไคโตซาน (silver nanoparticles impregnated alginate-chitosan-blended nanocarrier) ซึ่งตัวพาระดับนาโนที่เตรียมได้นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง U87MG (human glioblastoma) ได้ โดยค่า IC_{50} ของตัวพาระดับนาโนของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล/อัลจินเต/ไคโตซาน มีค่าเป็น $2.4 \mu\text{g/ml}$ ของความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการตายของเซลล์หรืออะพอโทซิส (apoptosis) จะเกิดขึ้นที่ความเข้มข้นของตัวพาระดับนาโนของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล/อัลจินเต/ไคโตซานที่ต่ำ เมื่อเทียบกับของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเดี่ยว ๆ ดังนั้นตัวพาระดับนาโนของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล/อัลจินเต/ไคโตซานที่เตรียมได้นี้สามารถนำมาใช้ในการรักษามะเร็งได้ [37]

Sacco และคณะ (2015) ได้เตรียมไคโตซานเมมเบรนที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ซึ่งเตรียมโดยการเตรียมสารละลายไคโตซานและซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลก่อน และหลังจากนั้นเตรียมแผ่นเมมเบรนโดยใช้เทคนิคการแพร่ผ่าน (ions diffusion technique) ของสารละลายไตรโพลิฟอสเฟสเข้าไป เพื่อให้เกิดเป็นไฮโดรเจล และทำให้แห้งโดยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งผลการต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล นอกจากนี้ยังพบว่า ไคโตซานเมมเบรนที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลไม่มีพิษต่อเซลล์ keratinocytes (HaCaT) และเซลล์ fibroblasts (NIH-3T3) [38]

Wang และคณะ (2015) ได้เตรียมอนุภาคร่างแหไคโตซาน (chitosan matrix particles) ที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยใช้การสังเคราะห์แบบขั้นตอนเดียว (one-step synthesis) ในขั้นตอนการเตรียม ได้เริ่มจากการผสม silver nitrate ลงในสารละลายไคโตซาน และหยดลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่ได้มีค่าเป็น 1.7 mm ถึง 2.5 mm โดยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ถูกฝังอยู่ในอนุภาคร่างแหไคโตซานมีขนาดเป็น 15 ± 3.3 nm จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. militaris* ของอนุภาคร่างแหไคโตซานที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้พบว่า โชนการยับยั้งเชื้อราของอนุภาคร่างแหไคโตซานและอนุภาคร่างแหไคโตซานที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีค่าเป็น 3.2 ± 0.1 cm และ 3.5 ± 0.2 cm หลังจากบ่มเป็นเวลา 9 วัน และ 2.7 ± 0.2 cm และ 3.2 ± 0.1 cm หลังจากบ่มเป็นเวลา 18 วัน ตามลำดับ จากการศึกษานี้ได้แนะนำว่า ทั้งอนุภาคร่างแหไคโตซานและอนุภาคร่างแหไคโตซานที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. militaris* โดยฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของอนุภาคร่างแหไคโตซานที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีค่าสูงกว่าของอนุภาคร่างแหไคโตซานเดี่ยว ๆ (วันที่ 9, $p < 0.05$; วันที่ 18, $p < 0.01$) [39]

Martins และคณะ (2015) ได้เตรียมสารประกอบไคโตซาน (*N,N,N*-trimethyl chitosan) และอัลจินตที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ซึ่งเตรียมได้จากการผสมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเข้ากับสารละลายอัลจินต (0.5 %w/v) หลังจากนั้นหยดสารผสมลงในสารละลายไคโตซาน (1.0 %w/v) หลังจากนั้นศึกษาการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนใน PBS (pH 7.4) และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* (ATCC 26922) ใน PBS (pH 7.4) จากผลการทดลองพบว่า มีการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนปริมาณ 3.3 mg ต่อ 1 mg เม็ดปิด นอกจากนี้ ยังพบการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกมา 61% เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง โดยไม่พบว่าการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลออกมาจากเม็ดปิดเลยเมื่อตรวจสอบโดยใช้ UV-Vis spectrophotometer การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกมาจากเม็ดปิดอาจเนื่องจาก เม็ดปิดเกิดการพองตัว เนื่องจากมีการแพร่ของโมเลกุลน้ำเข้าไปเม็ดปิดทำให้เกิดการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกมา นอกจากนี้ อาจเนื่องจาก ค่า pKa ของ M- และ G-residue

ของอัลจินตมีค่าเป็น 3.38 และ 3.65 ตามลำดับ ส่งผลให้หมู่ $-COOH$ บนอัลจินตยังคงถูกไอออนไนซ์ (ionized) ที่ pH 7.4 ทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่าง carboxylate anions บนอัลจินตกับโมเลกุลน้ำ ส่งผลให้เกิดการแพร่ผ่านของโมเลกุลน้ำเข้าไปในเม็ดบีด ทำให้เม็ดบีดเกิดการพองตัว และมีการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนในที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า เม็ดบีดที่ไม่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แต่เม็ดบีดที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ความเข้มข้น 3.3 mg/ml ใน PBS (pH 7.4) สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ถึง 91% นอกจากนี้ยังพบว่า เม็ดบีดที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ความเข้มข้น 3.3 mg/ml สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกมาได้ 10.9 $\mu\text{g/ml}$ ที่ pH 7.4 เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ดังนั้นผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของเม็ดบีดที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ 91% อาจเนื่องมาจากซิลเวอร์ไอออนที่ถูกปลดปล่อยออกมา [40]

Yadollahia และคณะ (2015) ได้เตรียมโคโตซานไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ซึ่งเตรียมโดยหยดสารละลายโคโตซาน และ silver nitrate ลงในสารละลายของไตรโพลีฟอสเฟต และ sodium borohydride นอกจากนี้ยังพบว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ขึ้นกับความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในโคโตซานไฮโดรเจล ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลสูงขึ้น จะสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าโคโตซานไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล มีความสามารถในการพองตัว (swelling capacity) มากกว่าโคโตซานไฮโดรเจลเดี่ยว ๆ ทั้งนี้เนื่องจากซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในโคโตซานไฮโดรเจlnั้นมีความเป็นประจุกอยู่ ทำให้เพิ่มการแพร่ผ่านของน้ำเข้ามา เนื่องจากผลของความแตกต่างระหว่างปริมาณไอออนภายในและภายนอกโคโตซานไฮโดรเจล (ion osmotic pressure) [41]

Narayanan และ Han (2017) ได้เตรียมเม็ดบีด PVA/อัลจินต/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยใช้อัตราส่วนของ PVA/อัลจินต เป็น 90/10 (F1), 70/30 (F2), 50/50 (F3), 30/70 (F4) และ 10/90 (F5) และบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ความเข้มข้น 5%w/v ซึ่งเตรียมเม็ดบีดได้โดย หยดสารผสมระหว่าง PVA, อัลจินต และซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลลงในสารผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์และ โซเดียมโบโรไฮไดรด์ หลังจากนั้นตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* O157: H7 โดยวิธีการนับโคโลนี (colony count method) โดยบ่มเม็ดบีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย UV กับเชื้อ *E. coli* O157: H7 ($\sim 10^{11}$ CFU/ml) ในอาหาร M9 minimal medium (25 ml) นาน 6, 12 หรือ 24 ชั่วโมง ที่ 37°C และนับจำนวนโคโลนีบนอาหาร NA จากผลการทดลองพบว่า เม็ดบีด PVA/อัลจินต/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลทั้งหมด (F1-F5) ที่น้ำหนักแห้งปริมาณ 20 และ 50 mg สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* O157: H7 ที่มีชีวิตลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 24 ชั่วโมง โดยเม็ดบีดที่มีความเข้มข้น

ของอัลจินตสูงกว่า สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* O157: H7 ที่มีชีวิตลงได้มากกว่า ทั้งนี้เนื่องจาก เม็ดบีดที่มีความเข้มข้นของอัลจินตสูงกว่า จะมีปริมาณของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมากกว่า [42]

2.3 การนำอัลจินต/ไคโตซานไปใช้ในทางการแพทย์

ในการศึกษานี้ ได้เตรียมเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ เพื่อในอนาคตจะนำเม็ดบีดที่เตรียมได้มาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ เพื่อนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในวัสดุหรืออุปกรณ์ที่ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป นอกจากการนำอัลจินตและไคโตซานมาใช้ในการนำส่งซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลแล้ว ยังมีการนำอัลจินตและไคโตซานไปใช้ประโยชน์ในการนำส่งยาหรือสารต่าง ๆ รวมทั้งศึกษาทั้งฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งที่เป็นเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง ดังนี้

Baysal และคณะ (2004) ได้เตรียมอัลจินต/ไคโตซานไฮโดรเจล (alginate/chitosan hydrogel) เพื่อใช้ในการเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) ซึ่งพบว่าอัลจินต/ไคโตซานไฮโดรเจลที่เตรียมได้ มีความคงตัวในน้ำ และใน phosphate buffer saline (PBS) และพบว่า อัลจินต/ไคโตซานไฮโดรเจลที่ความเข้มข้นของไคโตซานต่ออัลจินตเป็น 2:1 สามารถเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์ L929 (mouse fibroblast) และเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นของไคโตซานต่ออัลจินตเป็น 1:1 [16]

Dai และคณะ (2008) ได้เตรียมเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน 2 รูปแบบคือ (i) เตรียมเม็ดบีดโดยการผสมอัลจินตและไคโตซานเข้าด้วยกัน (mixed beads) และ (ii) เตรียมเม็ดบีดอัลจินตก่อน และเคลือบด้วยไคโตซาน (coated beads) เพื่อใช้ในการนำส่งยา nifedipine จากผลการปลดปล่อยยา nifedipine ออกจากเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานแบบ mixed beads พบว่า การปลดปล่อยยา nifedipine ออกมาได้ค่อนข้างน้อย (42%) ในสารละลายที่จำลองสภาวะในกระเพาะของร่างกาย (pH 1.5) สำหรับที่สารละลาย PBS ที่ pH ที่แตกต่างกัน (pH 2.5, 5.0, 6.8, 7.4, and 8.0) นั้นพบว่า สามารถปลดปล่อยยา nifedipine ออกมาได้สูงถึง 99% ที่ pH 6.8 สำหรับเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานแบบ coated beads นั้น การปลดปล่อยยา nifedipine ที่ pH 1.5 เป็น 18% และที่ pH 6.8 เป็นประมาณ 99% ซึ่งการศึกษานี้ได้แนะนำว่า เม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานแบบ coated beads สามารถปลดปล่อยยา nifedipine ได้ดีกว่าเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานแบบ mixed beads ที่ pH ต่ำ ดังนั้น เม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานแบบ coated beads นั้น เหมาะสมในการนำมาใช้ในการนำส่งยา nifedipine ผ่านทางทางเดินอาหาร [43]

Mujtaba และคณะ (2014) ได้พัฒนาและศึกษาคุณลักษณะของเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน เพื่อใช้ในการนำส่งยา cefpodoxime proxetil (CFP) ซึ่งเม็ดบีดประกอบด้วยอัลจินต 4.38 %w/v, ไคโตซาน 1.39 %w/v และแคลเซียมคลอไรด์ 6.82 %w/v จากการศึกษาการปลดปล่อยยา CFP ออกจากเม็ดบีดพบว่า สามารถ

ปลดปล่อยยา CFP ออกมาได้ยาวนานถึง 24 ชั่วโมง และปริมาณยา CFP ที่ปลดปล่อยออกมาจากเม็คบิดอัลจินต/ไคโตซาน/CFP ภายในเวลา 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibition concentration) ได้ [44]

Martins และคณะ (2015) ได้เตรียมเม็คบิดที่ประกอบด้วยไคโตซาน (*N,N,N*-trimethyl chitosan) และอัลจินต เพื่อใช้ในการนำส่งโกลด์นาโนพาร์ติเคิล (gold nanoparticles) จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 (Caco-2 colon cancer cells) และเซลล์ไตของลิงแอฟริกัน VERO (VERO cells) พบว่า เม็คบิดที่ไม่มีโกลด์นาโนพาร์ติเคิลสามารถเข้ากันได้ดีกับเซลล์ Caco-2 และเซลล์ VERO แต่เม็คบิดที่มีโกลด์นาโนพาร์ติเคิลมีความเป็นพิษเล็กน้อยต่อเซลล์ Caco-2 และเซลล์ VERO [45]

Li และคณะ (2016) ได้เตรียมระบบนำส่งยาต้านมะเร็ง doxorubicin hydrochloride (DOX) โดยวิธีการให้ยาทางปาก (oral delivery) ด้วยเม็คบิดอัลจินตที่ประกอบด้วยไคโตซานนาโนพาร์ติเคิล (chitosan nanoparticles) หลังจากให้ยาทางปากพบว่า เม็คบิดอัลจินตสามารถปลดปล่อยไคโตซานนาโนพาร์ติเคิลที่ประกอบด้วยยา DOX ออกมาได้ และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยา DOX ในลำไส้เล็กได้ นอกจากนี้ จากผลการทดลองในหนูพบว่า สามารถดูดซึมยา DOX ผ่านลำไส้เล็กของหนูได้ ดังนั้น เม็คบิดอัลจินต/ไคโตซานนาโนพาร์ติเคิล สามารถใช้เป็นระบบนำส่งยาต้านมะเร็ง DOX ได้ [46]

Vasile และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของกัมที่ได้จากยาง (exudate gum) ของต้นไม้ในแถบทวีปแอฟริกาใต้ (*Prosopis alba*) ต่อการเพิ่มความคงตัวของน้ำมันปลา (fish oil) ที่บรรจุในเม็คบิดอัลจินต/ไคโตซาน จากผลการศึกษาพบว่า กัมที่ได้จากยางพืช สามารถช่วยลดการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันปลาที่อยู่ในเม็คบิดอัลจินต/ไคโตซานในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาได้ นอกจากนี้ กัมที่ได้จากยางพืชยังช่วยเพิ่มการคงอยู่ของน้ำมันปลาในระหว่างกระบวนการทำแห้ง รวมทั้งในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา ดังนั้น ในการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของกัมที่ได้จากยางพืชต่อความคงตัวของน้ำมันปลาที่บรรจุอยู่ในเม็คบิดอัลจินต/ไคโตซาน [47]

Chen และคณะ (2017) ได้เตรียมแผ่นนาโนไฟเบอร์ (nanofiber mat) จากพอลิเมอร์ชีวภาพที่แตกต่างกัน ได้แก่ เพคติน อัลจินต และไคโตซาน เพื่อนำมาใช้เป็นแผ่นปิดแผล จากผลการทดลองพบว่า แผ่นนาโนไฟเบอร์ที่เตรียมจากเพคตินสามารถดูดซับสารละลายที่จำลองน้ำหนอง (simulated exudate solution; 142 mmol/L โซเดียมคลอไรด์ และ 2.5 mmol/L แคลเซียมคลอไรด์) ได้ดีกว่าแผ่นนาโนไฟเบอร์ที่เตรียมจากอัลจินตและไคโตซาน ถึง 1.2 และ 3.6 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ แผ่นนาโนไฟเบอร์ที่เตรียมจากเพคตินมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ได้สูงถึง 73.1% และมากกว่าแผ่นนาโนไฟเบอร์ที่เตรียมจากอัลจินต (11.8%) และไคโตซาน (17.1%) [18]

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	ประเทศผู้ผลิต	ยี่ห้อ/รุ่น
UV-Visible spectrophotometer	China	Thermo Scientific /EVOLUTION 201
หม้อนึ่งไอน้ำ	Japan	TOMY SX-700
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Germany	ROTINA 420R
เครื่องวัด pH	U.S.A	CyberScan pH 510
เครื่องทำน้ำปราศจากไอออน	China	Thermo Scientific/Barnstead Easypure II
ตู้อบเพาะเชื้อ	Germany	Binder
Rotary evaporator	Germany	Heidolph
ตู้ดูดความชื้น	Taiwan	WEIFO/DRY-70
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM)	Japan	JEOL/JEM-2010
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)	Japan	FEI Quanta 400 (SEM-Quanta)
NanoBrook ZetaPALS Potential Analyzer	USA	Brookhaven/ZetaPALS
Optical microscopy	Japan	Nikon/ECLIPSE Ci-S
ICP-OES	-	Perkin Elmer Optima 4300 DV

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Nutrient broth (NB)	HiMedia Laboratories
Nutrient agar (NA)	HiMedia Laboratories
Silver nitrate	Sigma
Sodium citrate	Sigma
Sodium borohydride	Sigma

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Chitosan	Sigma
Phosphate buffer saline (PBS, 10X)	Hyclone laboratories
Alginate	Carlo Erba reagents
Calcium nitrate	Loba Chemie

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

3.2.1.1 การเตรียมสารแขวนลอยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

ซึ่งจะเตรียมตามวิธีของ Jana และคณะ [48] ดังนี้

ผสม silver nitrate (0.25 mM) และ sodium citrate (0.25 mM) ในน้ำปราศจากไอออน (600 ml) ภายใต้ magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น ผสม sodium borohydride (18 ml, 10 mM) ลงในสารละลายข้างต้น และทิ้งไว้ภายใต้ magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำสารแขวนลอยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ได้ให้เข้มข้นขึ้นโดยการใช้ rotary evaporator ที่ 40 rpm อุณหภูมิ 37°C โดยให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 50 ml สารแขวนลอยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล กรองสารแขวนลอยที่ได้ด้วย cellulose acetate membrane (0.22 μ m) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะใช้งาน

3.2.1.2 การเตรียมเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

(1) การเตรียมเม็ดปิดอัลจินต/ไคโตซาน กลุ่มควบคุม

สารละลายอัลจินต, ไคโตซาน และแคลเซียมไนเตรท สำหรับเม็ดปิด C1, C2 และ C3 แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นสารละลายอัลจินต ไคโตซาน และแคลเซียมไนเตรท

ตัวอย่าง	อัลจินต (25 ml), %w/v	ไคโตซาน (25 ml), %w/v	แคลเซียมไนเตรท (300 ml), %w/v
C1	1	0.05	1
C2	2	0.1	2
C3	3	0.15	3

ผสมสารละลายอัลจินตและสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นและปริมาตรดังแสดงในตารางที่ 3.3 เข้าด้วยกัน หยดสารละลายอัลจินต/ไคโตซานลงในสารละลายแคลเซียมไนเตรทด้วย syringe ทิ้งไว้ 30 นาที กรองเอาเฉพาะเม็ดปิด C1, C2 และ C3 มาทำให้แห้ง โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บเม็คปิด C1, C2 และ C3 ที่แห้งแล้วในตู้ดูดความชื้น

(2) การเตรียมเม็คปิดอัลจินेट/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

สารละลายอัลจินेट ไคโตซาน และแคลเซียมไนเตรท สำหรับเม็คปิด S1, S2 และ S3 แสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้นสารละลายอัลจินेट ไคโตซาน แคลเซียมไนเตรท และซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

ตัวอย่าง	อัลจินेट (12.5 ml), %w/v	ไคโตซาน (25 ml), %w/v	สารแขวนลอย ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล (12.5 ml)	แคลเซียมไนเตรท (300 ml), %w/v
S1	2	0.05	-	1
S2	4	0.1	-	2
S3	6	0.15	-	3

นำสารแขวนลอยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.1.1 ผสมกับสารละลายไคโตซานดังแสดงในตารางที่ 3.4 ภายใต้ magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เทสารผสมของไคโตซานและซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ลงในสารละลายอัลจินेटที่ความเข้มข้นดังแสดงในตารางที่ 3.4 ภายใต้ magnetic stirring ที่อุณหภูมิห้อง และทิ้งไว้ภายใต้ magnetic stirring เป็นเวลา 30 นาที หยดสารผสมของอัลจินेट ไคโตซาน และซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ลงในสารละลายแคลเซียมไนเตรท โดยใช้ syringe ที่อุณหภูมิห้อง กรองเอาเฉพาะเม็คปิด S1, S2 และ S3 มาทำให้แห้ง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บเม็คปิด S1, S2 และ S3 ที่แห้งแล้วในตู้ดูดความชื้น และความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็คปิด S1, S2 และ S3 ที่แห้งแล้ว สามารถวิเคราะห์ได้โดยการใช้เครื่อง ICP-OES

3.2.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

3.2.2.1 การตรวจสอบรูปร่าง ขนาด และศักย์ซีต้าของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

รูปร่างและขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.1.1 ตรวจสอบด้วยกล้อง TEM นอกจากนี้ รูปร่าง ขนาด การกระจายขนาด และศักย์ซีต้าของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล สามารถตรวจสอบได้ด้วยเครื่อง NanoBrook ZetaPALS Potential Analyzer

3.2.2.2 การตรวจสอบสเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

สเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลตรวจสอบด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 190 ถึง 1100 nm

3.2.3 การตรวจสอบคุณลักษณะของเม็ดปิด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

3.2.3.1 การศึกษารูปร่างและขนาดของเม็ดปิด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

รูปร่างและขนาดขนาดของเม็ดปิดอย่างน้อย 50 เม็ดปิด ตรวจสอบด้วย optical microscopy และถ่ายรูปด้วย microscope camera (Lanoptik, MDX1003, China) โดยค่าที่ได้แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย (mean) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) นอกจากนี้รูปร่างและพื้นผิวของเม็ดปิด สามารถตรวจสอบด้วยกล้อง SEM

3.2.3.2 การศึกษาความสามารถในการบรรจุ (%) ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดปิด S1, S2 และ S3

ความสามารถในการบรรจุ (loading capacity, %; สมการที่ 3.1) [49,50] ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดปิด S1, S2 และ S3 สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ความสามารถในการบรรจุ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักซิลเวอร์ไอออน}}{(\text{น้ำหนักพอลิเมอร์} + \text{น้ำหนักซิลเวอร์ไอออน})} \times 100$$

สมการที่ 3.1

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็น ค่าเฉลี่ย (mean) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

3.2.3.3 การหาค่าการสูญเสียน้ำของเม็ดปิด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

นำเม็ดปิด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 ที่มีปริมาตรน้ำหนักเปียก (M1) เป็น 3.5 g มาทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแห้ง (M2) โดยค่าการสูญเสียน้ำ (%) ของเม็ดปิด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{การสูญเสียน้ำ (\%)} = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

สมการที่ 3.2

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และรายงานผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) โดยทำตามวิธีการของ Li และคณะ [27,31] ดังนี้

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* ใน nutrient broth (NB) ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เจือจางเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* ใน NB และวัดค่า OD ที่ 600 nm (OD_{600}) ให้ได้ปริมาณเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* เป็น 10^8 CFU/ml โดยค่า OD_{600} เป็น 0.1 จะสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อเป็น 10^8 CFU/ml [27,31] นำเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* ใน NB (10^5 CFU/ml) ปริมาตร 1 ml และ PBS (1X, pH 7.4) ปริมาตร 9 ml ใส่ใน plastic petri dish ขนาด 60×15 mm โดยในแต่ละ petri dish ประกอบด้วยเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น (1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$) โดยเทียบกับเม็ดบีด C1, C2 และ C3 (กลุ่มควบคุม) หลังจากนั้นเลี้ยงเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* ที่ 37°C ที่ 50 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาณเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* ที่มีชีวิตอยู่สามารถหาได้โดยวิธี viable count ดังนี้

เจือจางเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* แบบ serial dilution โดยใช้ PBS (1X, pH 7.4) ที่ความเข้มข้น 1:10, 1:100, 1:1000 และ 1:10000 หลังจากนั้น กระจาย (spread) เชื้อที่เจือจางที่แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 ml ให้ทั่วผิวหน้าของ nutrient agar (NA) และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเฉพาะ petri dish ที่มีจำนวนโคโลนีเป็น 25-250 โคโลนี และคำนวณจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด โดยการคูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วยค่า dilution factor ซึ่งค่าที่คำนวณได้มีหน่วยเป็น colony forming unit/ml หรือ CFU/ml

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และรายงานผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2.5 การศึกษาการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3

การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ทำการทดลอง ดังนี้ บ่มเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ในตัวกลางที่ประกอบด้วย PBS (1X, pH 7.4) ปริมาตร 9 ml และ NB ปริมาตร 1 ml ใน plastic petri dish ขนาด 60×15 mm ที่ 37°C , 50 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น วิเคราะห์หาปริมาณซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยออกมาจากเม็ดบีด ด้วยเครื่อง ICP-OES ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้ แสดงผลเป็น ปริมาณซิลเวอร์ไอออน ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยออกมาจากเม็ดบีด

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และรายงานผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

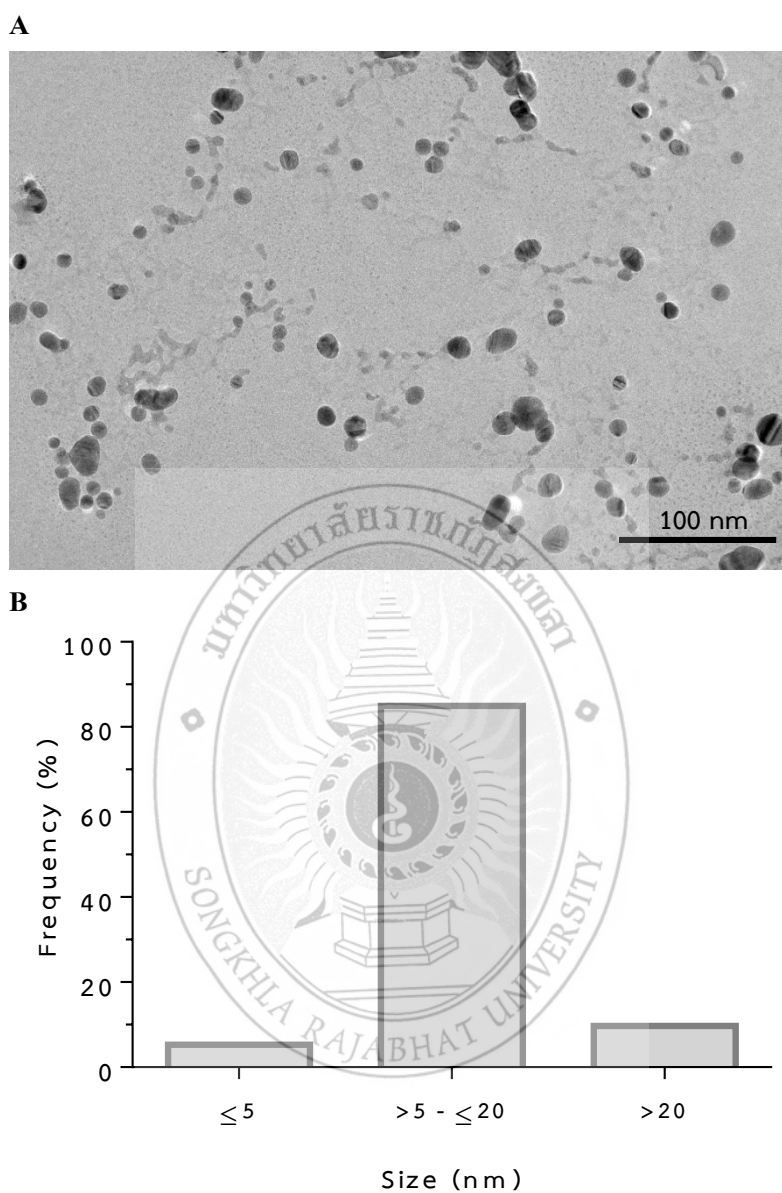
4.1 การตรวจสอบคุณลักษณะของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

4.1.1 การศึกษารูปร่าง ขนาด และศักย์รีดิวซ์ของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

การเตรียมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล สามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น วิธีทางเคมี (chemical method) วิธีการใช้สารที่ไม่ส่งผลเสียต่อสภาวะแวดล้อม (green method) เป็นต้น ซึ่งในการศึกษานี้ ได้เตรียมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลโดยวิธีทางเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้บ่อยที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การเตรียมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลด้วยวิธีนี้ สามารถเตรียมได้โดยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของเกลือซิลเวอร์ ด้วยตัวรีดิวซ์ (reducing agent) [34] ซึ่งตัวรีดิวซ์ที่นิยมใช้มีหลายตัว ได้แก่ sodium borohydride [51], gallic acid [8], ascorbic acid [20], sodium citrate [52] และ citric acid [53] การใช้ตัวรีดิวซ์ที่แรง (strong reducing agent) เช่น sodium borohydride จะทำให้ได้ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาดเล็ก (~5-20 nm) และมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ (monodisperse) [52] ส่วนการใช้ตัวรีดิวซ์ที่อ่อน (weak reducing agent) เช่น sodium citrate จะทำให้ได้ปฏิกิริยารีดักชันที่ช้าลง ส่งผลให้เกิดซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่มีการกระจายตัวที่กว้าง (polydisperse) มีขนาด ~50-100 nm และมีรูปร่างที่หลากหลาย [52] นอกจากนี้ตัวรีดิวซ์ที่แตกต่างกันจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาที่ต่างกัน เช่น sodium borohydride สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ได้ที่อุณหภูมิในอ่างน้ำแข็ง (ice bath temperature) [54] และที่อุณหภูมิห้อง [48] ส่วน sodium citrate จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ได้ที่อุณหภูมิสูง เช่น 70°C [55] และที่จุดเดือด (boiling temperature) [52] เป็นต้น นอกจากนี้ เพื่อป้องกันการตกตะกอนของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล จึงมีการนำสารให้ความคงตัว (stabilizer) เช่น สารเคมี พอลิเมอร์ และเปปไทด์ (peptide) มาใช้ โดยสารเคมีที่นำมาใช้เป็นสารให้ความคงตัว เช่น sodium citrate [56] เป็นต้น ซึ่ง sodium citrate สามารถทำหน้าที่เป็นได้ทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว โดย sodium citrate จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ได้ที่อุณหภูมิสูง เช่น 70°C และเป็นสารให้ความคงตัวได้ที่อุณหภูมิห้อง [55,56] ในการศึกษานี้ ได้เตรียมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น เฉพาะ sodium borohydride ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ สำหรับ sodium citrate ทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัว โดย citrate anions เกิดอันตรกิริยากับผิวของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ทำให้ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลคงตัวได้ [52]

จากการทดลองในการศึกษานี้ ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมส่วนใหญ่มีรูปร่างค่อนข้างกลม (รูปที่ 4.1A) และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเป็น 11.8 ± 7.1 nm ($n = 845$; รูปที่ 4.1B) หลังจากตรวจสอบด้วยกล้อง TEM โดยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลส่วนใหญ่จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 5 nm ถึง 20 nm

(~85%) และพบว่ามีเพียงประมาณ 15% ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 5 nm (~5%) และมากกว่า 20 nm (~10%) ดังแสดงในรูปที่ 4.1B

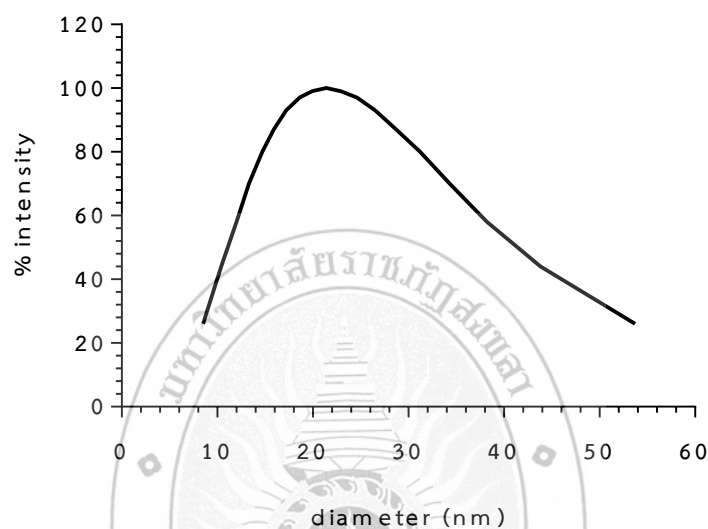


รูปที่ 4.1 รูปร่าง ขนาด และการกระจายขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลตรวจสอบด้วยกล้อง TEM

(A) รูปร่างและขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลตรวจสอบด้วยกล้อง TEM หลังจากเตรียมภายใน 48 ชั่วโมง (scale bar = 100 nm) (B) การกระจายของขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล (n = 845)

เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค DLS (รูปที่ 4.2) พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค DLS มีขนาดใหญ่กว่า (22.3 nm) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ตรวจสอบด้วยกล้อง TEM (11.8 ± 7.1 nm) Cumberland และ Lead (2009) ได้เตรียมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยมี sodium citrate เป็นสารให้ความคงตัวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลหลังจากตรวจสอบด้วยกล้อง TEM เป็น 13.7 ± 6.2

nm ($n = 266$) และหลังจากตรวจสอบด้วยเทคนิค DLS เป็น 25.0 ± 8.5 nm [57] ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า การวัดขนาดซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลด้วยกล้อง TEM เป็นการวัดขนาดทางกายภาพ (physical size) ซึ่งไม่รวม citrate anions ซึ่งอยู่บนผิวของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล แต่การวัดขนาดซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลด้วยเทคนิค DLS นั้นเป็นการวัดขนาดอนุภาคที่เคลื่อนที่อยู่ในตัวกลางที่เป็นของเหลว (hydrodynamic size) ซึ่งรวมถึงขนาดของ citrate anions ที่อยู่บนผิวของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลด้วย [57] ดังนั้น ทำให้ขนาดอนุภาคที่วัดด้วยกล้อง TEM มีขนาดเล็กกว่าการใช้เทคนิค DLS



รูปที่ 4.2 ขนาด และการกระจายขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลตรวจสอบด้วยเทคนิค DLS

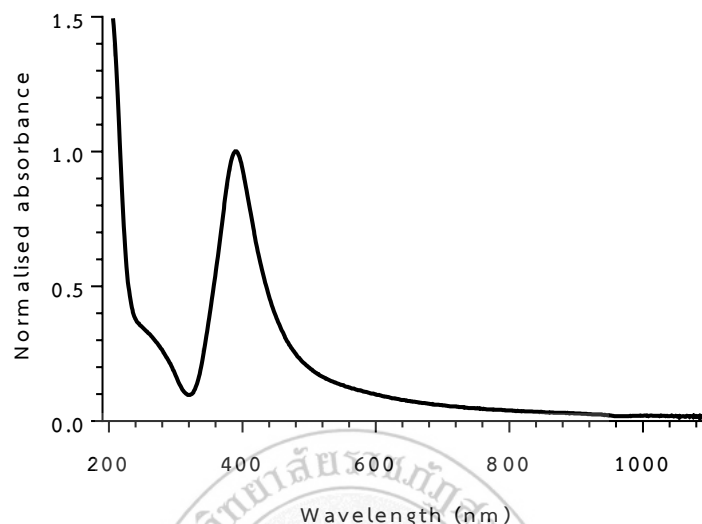
นอกจากนี้ ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ในการศึกษานี้ มีค่าศักย์ซีต้าเป็น -27.16 mV ซึ่งค่าศักย์ซีต้าเป็นค่าที่บ่งบอกถึงประจุที่ผิว (surface charge) ของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล Cumberland และ Lead (2009) ได้เตรียมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยมี sodium citrate เป็นสารให้ความคงตัว ซึ่งค่าศักย์ซีต้าของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้มีค่าเป็น -25.8 ± 5.0 mV โดย Cumberland และ Lead (2009) สรุปว่า ค่าศักย์ซีต้าที่เป็นค่าลบนี้ สามารถบ่งบอกถึงการมี citrate anions ที่ผิวของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล [57]

4.1.2 การตรวจสอบสเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

สเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลตรวจสอบด้วย UV-Visible spectrophotometer (จาก 190 ถึง 1100 nm) หลังจากเตรียมภายใน 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3)

ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้มีความกว้างของสเปกตรัมค่อนข้างแคบ และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 390 nm โดยมีรายงานว่า รูปร่างและค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสเปกตรัมของนาโนพาร์ติเคิลชนิดโลหะ (metal nanoparticles) ขึ้นกับขนาดของนาโนพาร์ติเคิล ตัวกลางที่ใช้กระจายนาโนพาร์ติเคิล และชนิดของสารให้ความคงตัว [58] ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ขนาดของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยเฉลี่ย

เป็น 11.8 ± 7.1 nm ($n = 845$) และขนาดอนุภาคส่วนใหญ่จะกระจายตัวอยู่ในช่วง 5 nm ถึง 20 nm (~85%) ซึ่งมีการกระจายตัวที่ค่อนข้างแคบ โดยขนาดความกว้างของสเปกตรัมที่ค่อนข้างแคบที่ได้ สัมพันธ์กับการกระจายตัวของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลดังแสดงในรูปที่ 4.1B (5-20 nm, ~85%) [58]



รูปที่ 4.3 สเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล

4.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

4.2.1 รูปร่างและขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

หลังจากเตรียมเม็ดบีด (รูปที่ 4.4A) ได้ทำเม็ดบีดให้แห้ง โดยวางบนกระดาษทิชชูที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.4B) และอบแห้งเม็ดบีดที่ 80°C นาน 2 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เม็ดบีดแบบแห้งที่สามารถเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้อง และสามารถนำมาใช้งานได้ง่าย (รูปที่ 4.4C) Martins และคณะ (2015) ได้เตรียมสารประกอบไคโตซาน (*N,N,N*-trimethyl chitosan) และอัลจินตที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยทำเม็ดบีดให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และใช้เม็ดบีดที่เตรียมได้ ในการนำส่งซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล เพื่อใช้ในการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนเพื่อฆ่าเชื้อ *E. coli* [40]

ในเบื้องต้น รูปร่างและขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 อย่างน้อย 50 เม็ด ตรวจสอบด้วยกล้อง optical microscope (รูปที่ 4.5) รูปร่างของเม็ดบีด C1 และ C2 (รูปที่ 4.5A และ 4.5C ตามลำดับ) มีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular shape) ส่วนเม็ดบีด C3 (รูปที่ 4.5E) มีรูปร่างค่อนข้างกลม (spherical shape) แต่เมื่อเติมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลลงในเม็ดบีดพบว่า รูปร่างของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 (รูปที่ 4.5B, 4.5D และ 4.5F ตามลำดับ) มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน นอกจากนี้จะเห็นว่า สีของเม็ดบีด C1, C2 และ C3 มีสีเหลืองอ่อนและโปร่งแสง ส่วนเม็ดบีด S1, S2 และ S3 มีสีน้ำตาลเข้มและทึบแสง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของเม็ดบีดที่เกิดขึ้นหลังการ

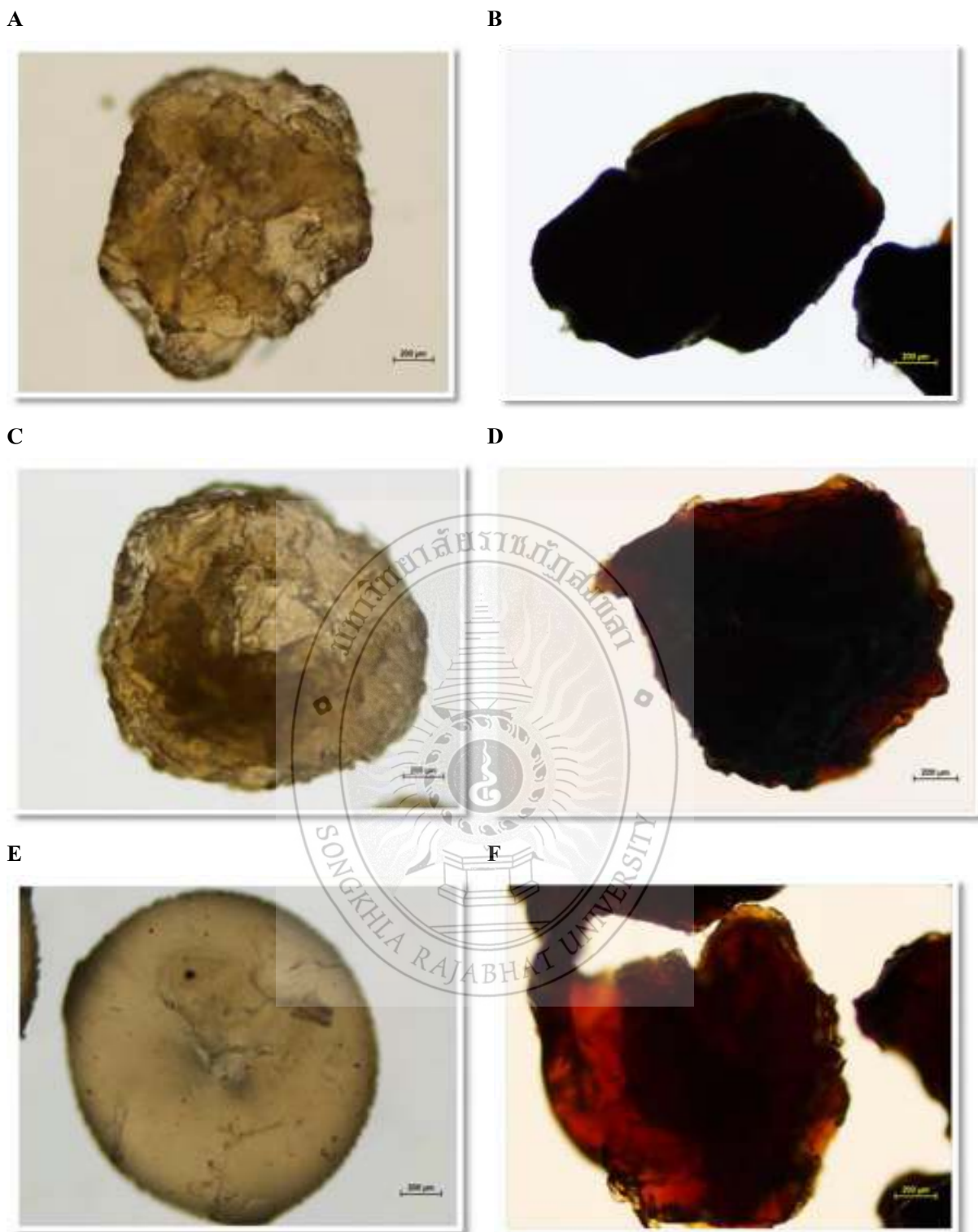
เดิมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลลงไปในช่วงตอนการเตรียมเม็ดบีดนั้น สามารถยืนยันการมีอยู่ของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีดได้



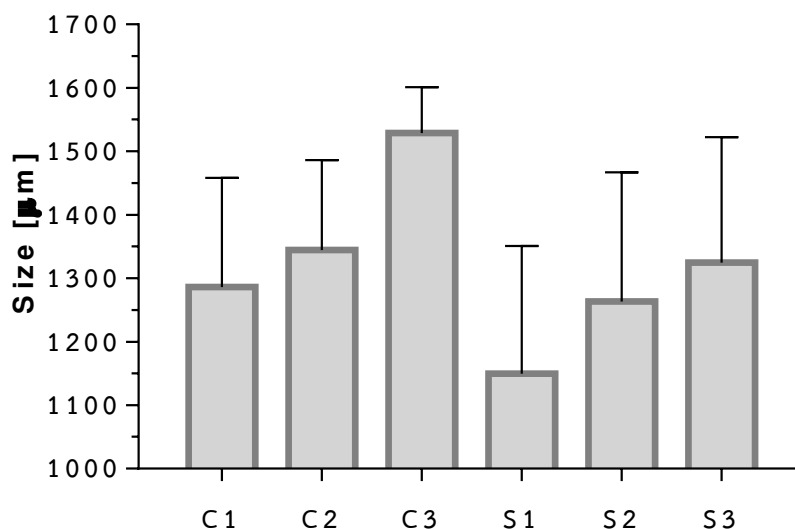
รูปที่ 4.4 ลักษณะของเม็ดบีดในระหว่างการทำแห้ง

(A) การเกิดเม็ดบีดหลังจากหยดสารผสมระหว่างอัลจินต ไคโตซาน และซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลลงในสารละลายแคลเซียมไนเตรท; (B) เม็ดบีดในระหว่างทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; (C) เม็ดบีดหลังจากอบที่ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 (รูปที่ 4.6) มีขนาดดังนี้ เม็ดบีด C1 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเป็น $1,286.06 \pm 172.05 \mu\text{m}$ ($n = 60$) เม็ดบีด C2 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเป็น $1,344.26 \pm 142.23 \mu\text{m}$ ($n = 60$) เม็ดบีด C3 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเป็น $1,528.82 \pm 72.50 \mu\text{m}$ ($n = 60$) เม็ดบีด S1 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเป็น $1,149.76 \pm 201.27 \mu\text{m}$ ($n = 60$) เม็ดบีด S2 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเป็น $1,263.18 \pm 203.71 \mu\text{m}$ ($n = 60$) และ เม็ดบีด S3 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเป็น $1,324.50 \pm 197.80 \mu\text{m}$ ($n = 50$) โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างเม็ดบีด C1 และ S1, ระหว่างเม็ดบีด C2 และ S2 และระหว่างเม็ดบีด C3 และ S3 ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซานเพิ่มมากขึ้น ค่าเฉลี่ยของขนาดของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 4.6) จากผลการทดลองพบว่า ขนาดของเม็ดบีด C1, C2 และ C3 มีขนาดใหญ่กว่าเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ในการเตรียมซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลได้ใช้ sodium citrate ซึ่งมีประจุลบและมีคุณสมบัติเป็นทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว ทำให้ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ในการศึกษานี้ มีประจุโดยรวมเป็นลบ ซึ่งสามารถยืนยันได้ด้วยผลค่าศักย์ซีต้า (-27.16 mV) ดังนั้น การที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลชนิดที่มีประจุบอยู่ในเม็ดบีด จะช่วยเสริมแรงดูดของแรงทางไฟฟ้า (electric force) ของประจุลบของอัลจินตกับประจุบวกของทั้งไคโตซานและแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในช่วงตอนการเกิดเม็ดบีด ทำให้เม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลมีขนาดเล็กกว่าเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานที่ไม่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล [59,60]



รูปที่ 4.5 รูปร่างและขนาดของเมล็ดบิต C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 ตรวจสอบด้วยกล้อง optical microscope
รูปร่างและขนาดของเมล็ดบิต C1 (A) เม็ดบิต S1 (B) เม็ดบิต C2 (C) เม็ดบิต S2 (D) เม็ดบิต C3 (E) และ เม็ดบิต S3 (F) หลังจาก
ตรวจสอบโดยใช้กล้อง optical microscope



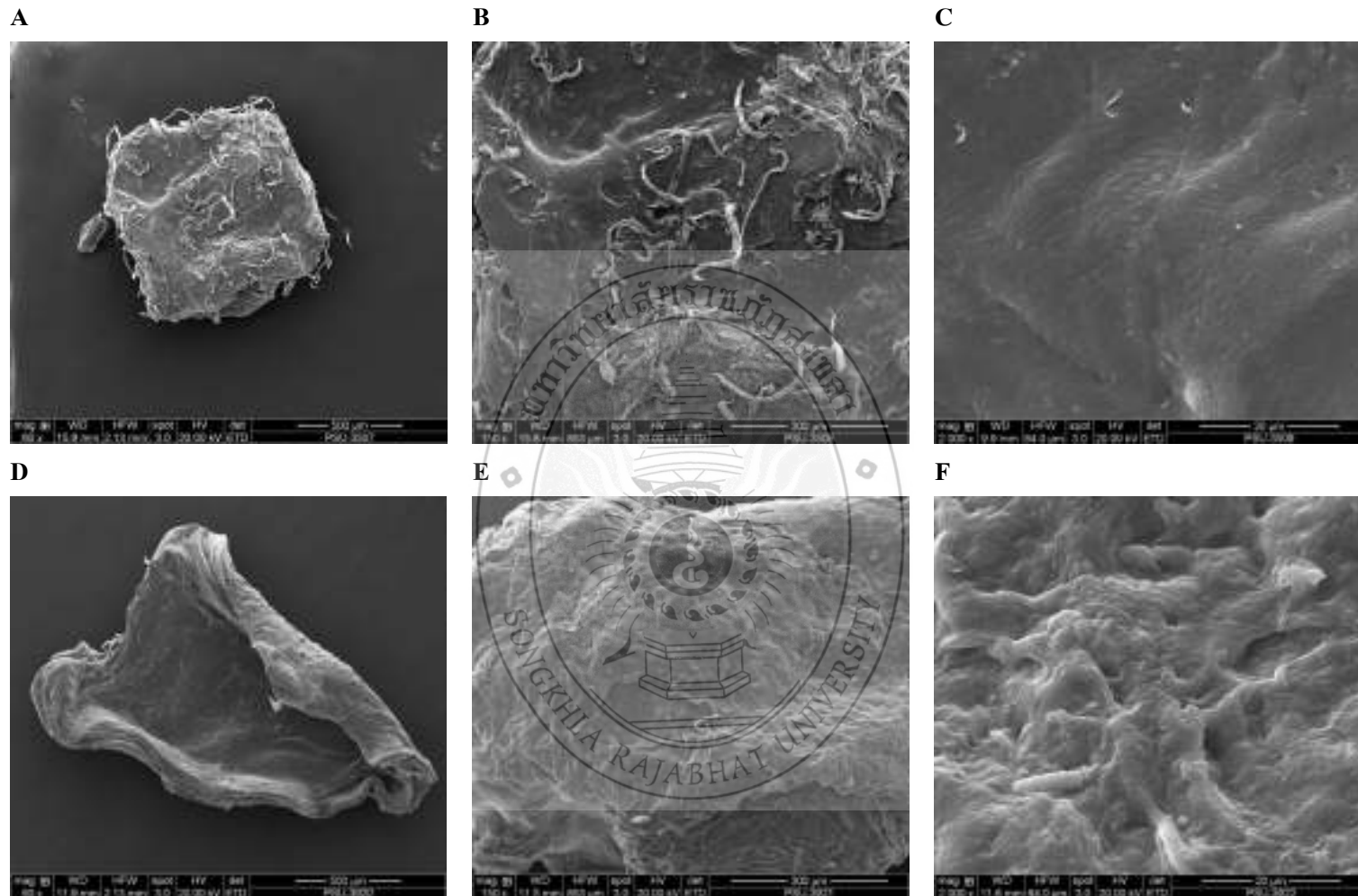
รูปที่ 4.6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดบีด C1 เป็น $1,286.06 \pm 172.05 \mu\text{m}$ ($n = 60$) เม็ดบีด C2 เป็น $1,344.26 \pm 142.23 \mu\text{m}$ ($n = 60$) เม็ดบีด C3 เป็น $1,528.82 \pm 72.50 \mu\text{m}$ ($n = 60$) เม็ดบีด S1 เป็น $1,149.76 \pm 201.27 \mu\text{m}$ ($n = 60$) เม็ดบีด S2 เป็น $1,263.18 \pm 203.71 \mu\text{m}$ ($n = 60$) และเม็ดบีด S3 เป็น $1,324.50 \pm 197.80 \mu\text{m}$ ($n = 50$) หลังจากตรวจสอบด้วยกล้อง optical microscope

หลังจากตรวจสอบเม็ดบีดเบื้องต้นด้วยกล้อง optical microscope (รูปที่ 4.5) ตรวจสอบรูปร่างและพื้นผิวของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 อีกครั้งด้วยกล้อง SEM ดังแสดงในรูปที่ 4.7

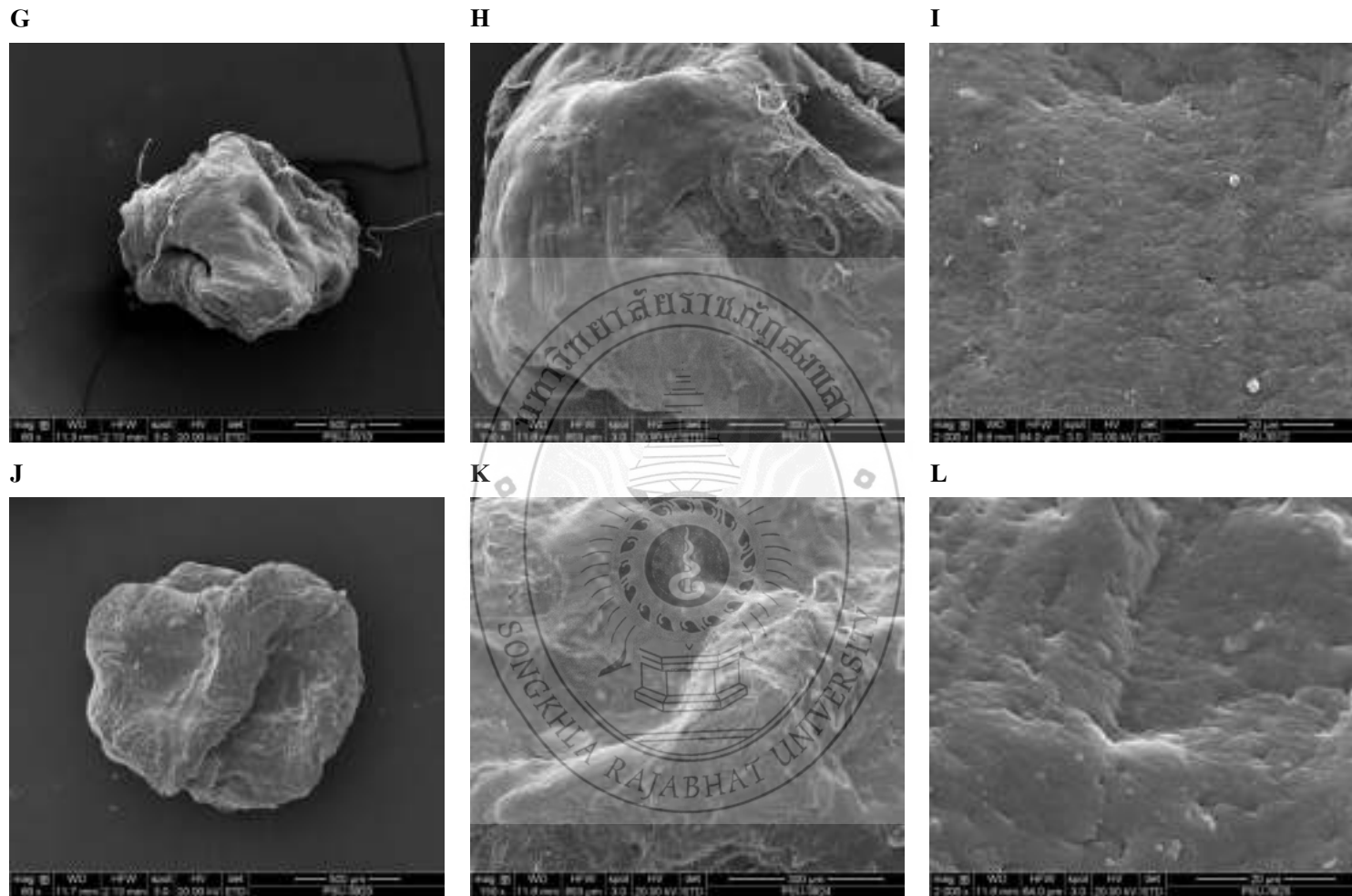
จากการทดลองพบว่า รูปร่างของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน โดยเฉพาะเม็ดบีด C1 (รูปที่ 4.7A) และ S1 (รูปที่ 4.7D) ซึ่งมีลักษณะแฟบ (collapse) เช่นเดียวกับที่ตรวจสอบโดยใช้กล้อง optical microscope (รูปที่ 4.5) แต่เมื่อความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซานเพิ่มขึ้น ลักษณะรูปร่างของเม็ดบีดค่อนข้างเป็นทรงกลมมากขึ้นตามลำดับ โดยเม็ดบีด C2 (รูปที่ 4.7G) และเม็ดบีด S2 (รูปที่ 4.7J) ค่อนข้างกลมมากกว่า สำหรับเม็ดบีด C3 (รูปที่ 4.7M) และเม็ดบีด S3 (รูปที่ 4.7P) ค่อนข้างกลมมากที่สุด Shu และ Zhu (2002) ได้เตรียมเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน โดยหยดสารละลายอัลจินตลงในสารผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์และไคโตซาน จากการทดลองพบว่า เม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานจะสูญเสียรูปทรงกลมหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแบบสูญญากาศ (vacuum) ที่อุณหภูมิห้อง และลักษณะของเม็ดบีดจะค่อนข้างกลม เมื่อความเข้มข้นของอัลจินตเพิ่มสูงขึ้น [61]

นอกจากนี้ เม็ดบีด C1 (รูปที่ 4.7B และ 4.7C), เม็ดบีด S1 (รูปที่ 4.7E และ 4.7F), เม็ดบีด C2 (รูปที่ 4.7H และ 4.7I), เม็ดบีด S2 (รูปที่ 4.7K และ 4.7L), เม็ดบีด C3 (รูปที่ 4.7N และ 4.7O) และเม็ดบีด S3 (รูปที่ 4.7Q และ 4.7R) มีพื้นผิวขรุขระและมีรูพรุนกระจาย โดยเม็ดบีด C1 (รูปที่ 4.7C) ซึ่งมีความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซานน้อยกว่า มีพื้นผิวเรียบกว่าเม็ดบีด C2 (รูปที่ 4.7I) และเม็ดบีด C3 (รูปที่ 4.7O) ซึ่งมี



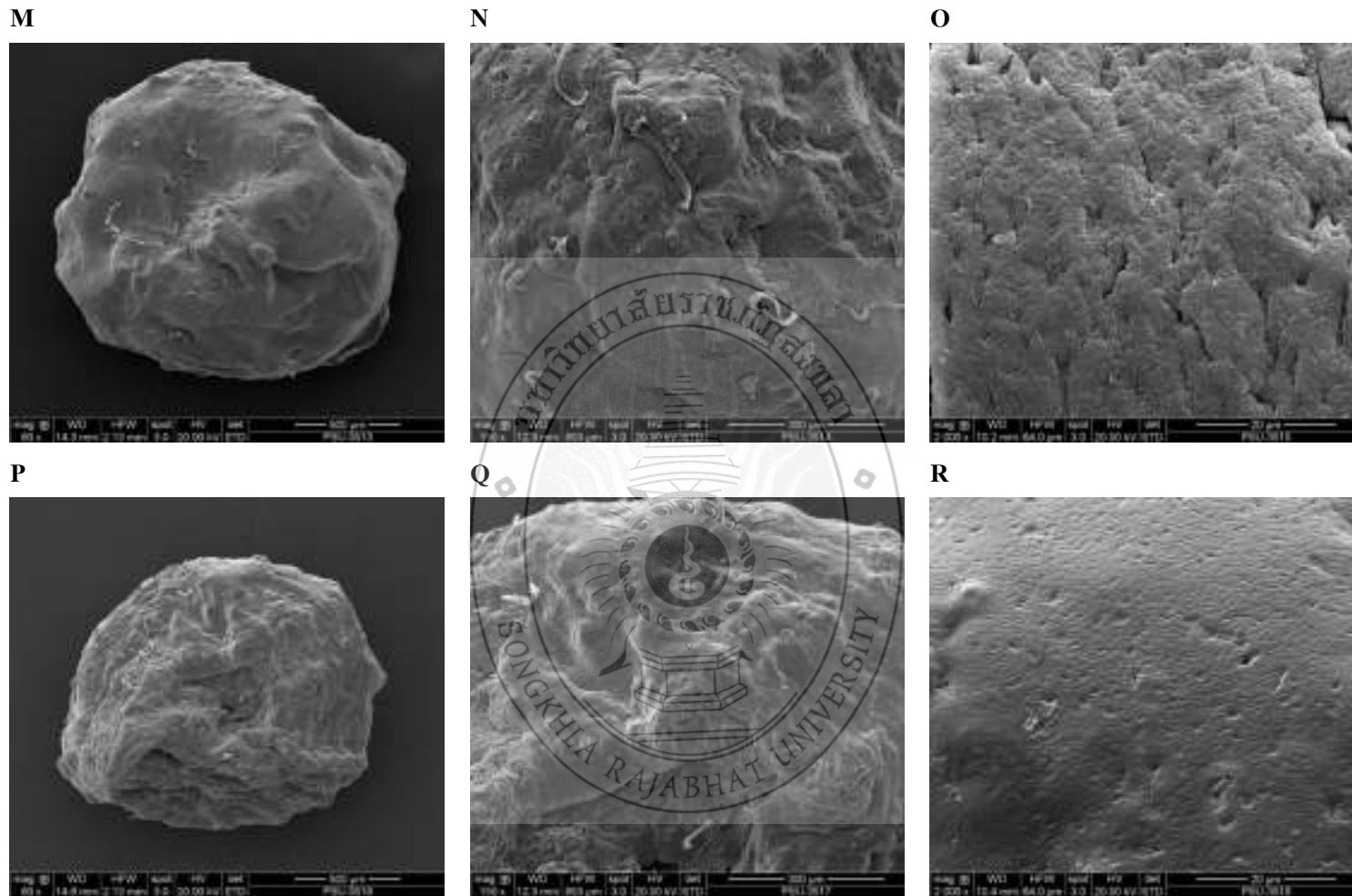
รูปที่ 4.7 รูปร่างและพื้นผิวของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 ตรวจสอบด้วยกล้อง SEM

รูปร่างและพื้นผิวของเม็ดบีด C1 (A, B และ C) เม็ดบีด S1 (D, E และ F) เม็ดบีด C2 (G, H และ I) เม็ดบีด S2 (J, K และ L) เม็ดบีด C3 (M, N และ O) และ เม็ดบีด S3 (P, Q และ R) หลังจากตรวจสอบด้วยกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 60x (A, D, G, J, M และ P), 150x (B,E, H, K, N และ Q) และ 2,000x (C, F, I, L, O และ R)



รูปที่ 4.7 รูปร่างและพื้นผิวของเมล็ดบัต C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 ตรวจสอบด้วยกล้อง SEM (ต่อ)

รูปร่างและพื้นผิวของเมล็ดบัต C1 (A, B และ C) เมล็ดบัต S1 (D, E และ F) เมล็ดบัต C2 (G, H และ I) เมล็ดบัต S2 (J, K และ L) เมล็ดบัต C3 (M, N และ O) และ เมล็ดบัต S3 (P, Q และ R) หลังจากตรวจสอบด้วยกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 60x (A, D, G, J, M และ P), 150x (B, E, H, K, N และ Q) และ 2,000x (C, F, I, L, O และ R)



รูปที่ 4.7 รูปร่างและพื้นผิวของเมล็ดพืช C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 ตรวจสอบด้วยกล้อง SEM (ต่อ)

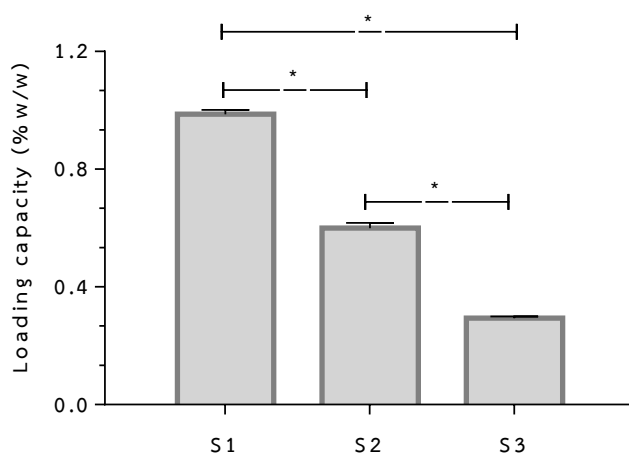
รูปร่างและพื้นผิวของเมล็ดพืช C1 (A, B และ C) เมล็ดพืช S1 (D, E และ F) เมล็ดพืช C2 (G, H และ I) เมล็ดพืช S2 (J, K และ L) เมล็ดพืช C3 (M, N และ O) และ เมล็ดพืช S3 (P, Q และ R) หลังจากตรวจสอบด้วยกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 60x (A, D, G, J, M และ P), 150x (B,E, H, K, N และ Q) และ 2,000x (C, F, I, L, O และ R)

ความเข้มข้นของอัลจินเตและไคโตซานมากกว่า ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจินเตและไคโตซานเพิ่มขึ้น ปริมาณประจุในสารละลายก็เพิ่มขึ้น ส่งผลให้แรงดึงดูดระหว่างประจุลบของอัลจินเตและประจุบวกของไคโตซาน เพิ่มขึ้น [62] ทำให้ขนาดรูและการสานเป็นร่างแหภายในเม็บบิดลดลง [17] ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า เม็บบิด C1 อาจมีขนาดรูของการสานเป็นร่างแหภายในเม็บบิดใหญ่กว่าเม็บบิด C2 และเม็บบิด C3 ตามลำดับ ส่งผลให้โมเลกุลน้ำที่อยู่ในเม็บบิด ไม่สามารถระเหยออกมาได้หมดในขั้นตอนการทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น หลังจากขั้นตอนการทำแห้งที่ 80°C ซึ่งใช้อุณหภูมิสูง ทำให้โมเลกุลน้ำพยายามแทรกตัวออกมาจากเม็บบิด ส่งผลให้เม็บบิด C3 มีพื้นผิวขรุขระ และมีรูพรุนกระจายอยู่บนพื้นผิวมากกว่าเม็บบิด S1 และ S2 นอกจากนี้ เม็บบิด S1 ยังมีพื้นผิวขรุขระมากกว่าเม็บบิด C1 ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานว่ามีพื้นผิวของเม็บบิดไคโตซานไฮโดรเจลที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล จะมีลักษณะขรุขระและพบมีรูพรุนมาก หลังจากตรวจสอบด้วยกล้อง SEM ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นเหล่านี้อาจเนื่องมาจากการทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศเป็นเวลา 24 ชม. [41] ในการศึกษาที่ยังพบอีกว่า เม็บบิด S1 (รูปที่ 4.7F) ซึ่งประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล และมีความเข้มข้นของอัลจินเตและไคโตซานน้อยกว่าเม็บบิด S2 และเม็บบิด S3 นั้น มีพื้นผิวขรุขระและมีขนาดของรูพรุนที่ค่อนข้างใหญ่กว่าเม็บบิด S2 (รูปที่ 4.7L) และเม็บบิด S3 (รูปที่ 4.7R) ตามลำดับ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่แทรกตัวอยู่ในเม็บบิดอัลจินเต/ไคโตซานนั้น ส่งผลต่อขนาดรูและการสานเป็นร่างแหภายในเม็บบิด Narayanan และ Han (2017) ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจินเตสูงขึ้น เม็บบิดโพลีไวนิลแอลกอฮอล์/อัลจินเต/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล มีความขรุขระและขนาดของรูของเม็บบิดลดลง [42]

4.2.2 การศึกษาความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็บบิด S1, S2 และ S3

ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็บบิด S1, S2 และ S3 (%) ตรวจสอบด้วยเครื่อง ICP-OES ซึ่งค่าที่ได้แสดงในรูปที่ 4.8

จากการทดลองพบว่า ความสามารถในการบรรจุของเม็บบิด S1 มีค่าเป็น 0.99 ± 0.02 %w/w เม็บบิด S2 มีค่าเป็น 0.6 ± 0.02 %w/w และเม็บบิด S3 มีค่าเป็น 0.29 ± 0.01 %w/w โดยความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็บบิด S1 มากกว่าเม็บบิด S2 และมากกว่าเม็บบิด S3 ตามลำดับ ($p < 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากอัตราส่วนความเข้มข้นของอัลจินเตและไคโตซานที่ใช้แตกต่างกัน โดยเม็บบิด S1 ใช้ความเข้มข้นของอัลจินเตและไคโตซานน้อยกว่าเม็บบิด S2 และ S3 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4) ทำให้โอกาสที่ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจะแทรกตัวเข้าไปอยู่ในเม็บบิด S1 ได้มากกว่าเม็บบิด S2 และ S3 ตามลำดับ ส่งผลให้ความสามารถในการบรรจุของเม็บบิด S1 ดีกว่าเม็บบิด S2 และ S3 ตามลำดับ

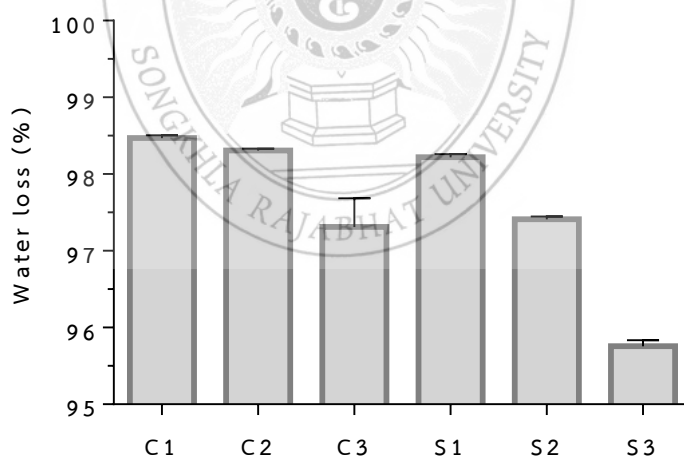


รูปที่ 4.8 ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3

ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ตรวจสอบด้วยเครื่อง ICP-OES ซึ่งค่าที่ได้รายงานผลเป็น ปริมาณซิลเวอร์ไอออน (%w/w) ในเม็ดบีดโคโคซาน/อัลจินต (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$)

4.2.3 การหาค่าการสูญเสียน้ำของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ค่าการสูญเสียน้ำ (water loss; %) ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 หาได้จากการทำเม็ดบีดทั้งหมดให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งค่าการสูญเสียน้ำ (%) แสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ค่าการสูญเสียน้ำของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ค่าการสูญเสียน้ำของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 หาได้โดยทำเม็ดบีดให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่า ค่าการสูญเสียน้ำของเม็ดบีด C1 มีค่าเป็น $98.47 \pm 0.04\%$ เม็ดบีด C2 มีค่าเป็น $98.31 \pm 0.03\%$ เม็ดบีด C3 มีค่าเป็น $97.31 \pm 0.37\%$ เม็ดบีด S1 มีค่าเป็น $98.22 \pm 0.04\%$ เม็ดบีด S2 มีค่าเป็น $97.41 \pm 0.04\%$ และเม็ดบีด S3 มีค่าเป็น $95.76 \pm 0.08\%$ ซึ่งเม็ดบีดทั้งหมดนั้น มีค่าการสูญเสียน้ำมากกว่า 95% Torres และคณะ (2005) แสดงให้เห็นว่า เม็ดบีดอัลจินตที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า

การสูญเสียน้ำเป็น 95% และเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเคลือบอัลจินเตจะลดลงจาก 3 mm เป็น 1.3 mm หลังจากทำให้แห้งแล้ว [63]

4.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

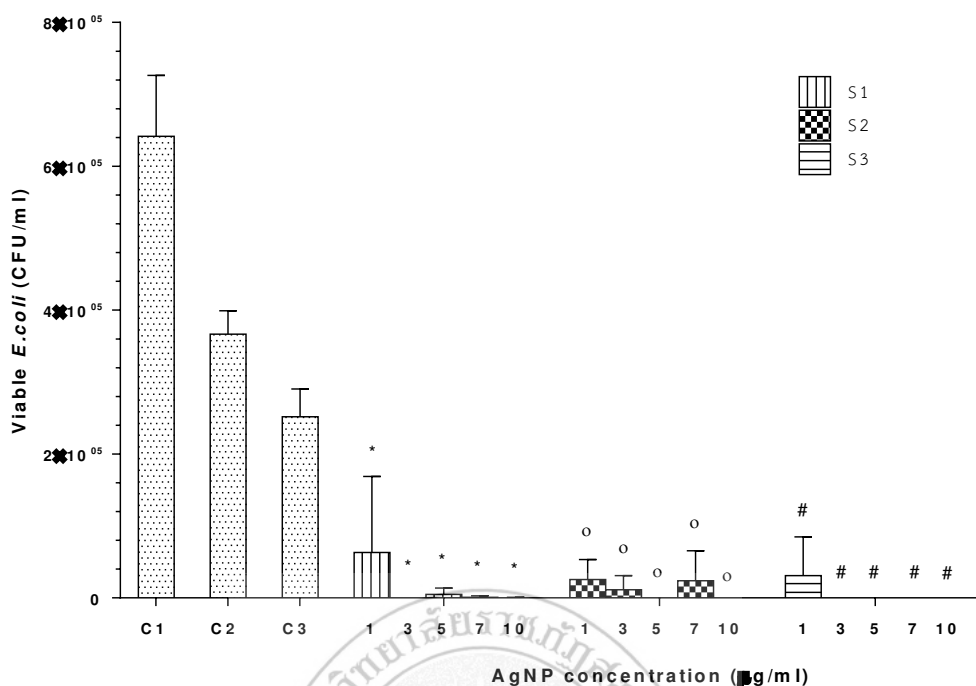
ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 แสดงดังรูปที่ 4.10A และ 4.10B ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีชีวิตใน PBS (pH 7.4) ลดลง อีกทั้งปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีชีวิตหลังจากสัมผัสกับเม็ดบีด S1 น้อยกว่าเม็ดบีด C1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับหลังจากสัมผัสกับเม็ดบีด S2 และเม็ดบีด S3 เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดบีด C2 และเม็ดบีด C3 ตามลำดับ ($p < 0.05$) Martin และคณะ (2015) รายงานว่า ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* ของเม็ดบีดไคโตซาน/อัลจินเตที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลอาจเนื่องมาจาก ซิลเวอร์ไอออนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเม็ดบีดไคโตซาน/อัลจินเตที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ซึ่งยืนยันได้จากปริมาณซิลเวอร์ไอออนที่ตรวจพบใน PBS (pH 7.4) และการตรวจไม่พบซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลหลังจากตรวจสอบด้วย UV-Vis spectrophotometer [40]

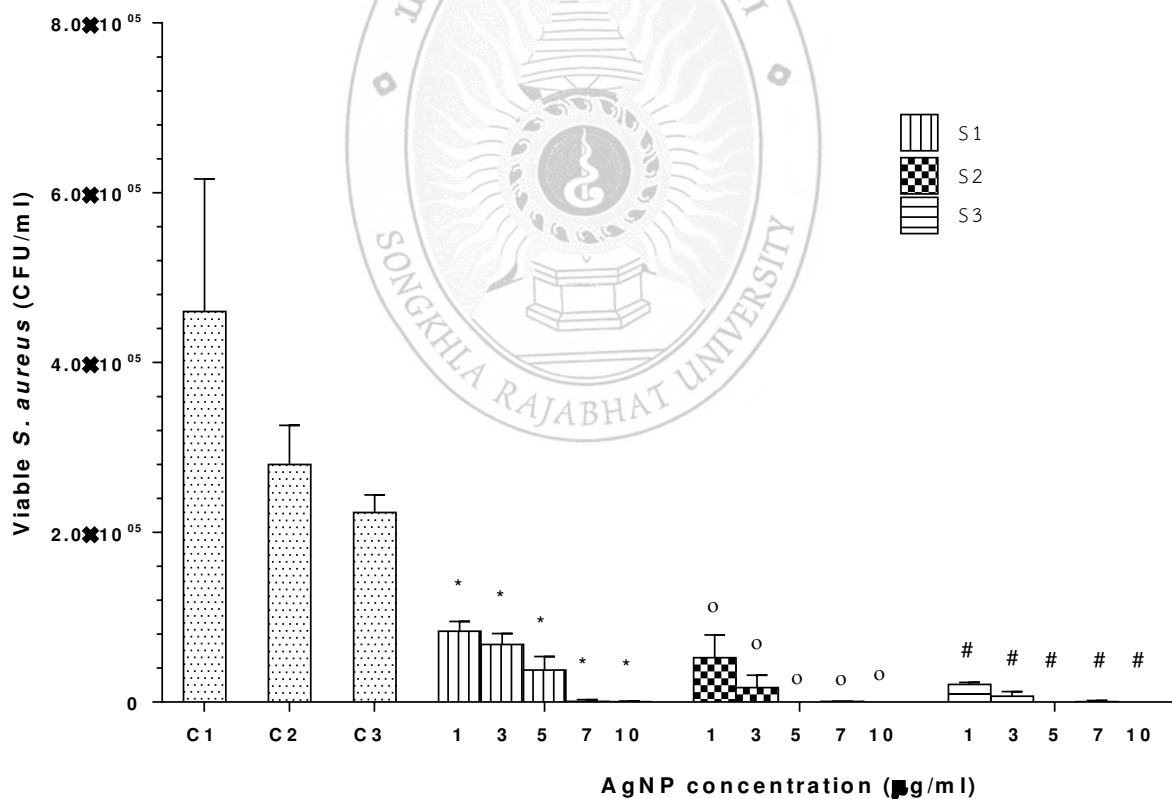
นอกจากนี้พบว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 มีค่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ใช้ค่อนข้างต่ำ (1-10 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งจากผลความสามารถในการบรรจุ (รูปที่ 4.8) ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1 มีค่าเทียบเท่าปริมาณซิลเวอร์ไอออนเป็น 0.99 g (0.99 ± 0.02 %w/w) เม็ดบีด S2 มีค่าเป็น 0.6 g (0.6 ± 0.02 %w/w) และเม็ดบีด S3 มีค่าเป็น 0.29 g (0.29 ± 0.01 %w/w) โดยผลดังกล่าว เป็นการหาค่าเฉลี่ยของปริมาณซิลเวอร์ไอออนต่อเม็ดบีด S1, S2 และ S3 น้ำหนัก 100 g ซึ่งปริมาณซิลเวอร์ไอออนในเม็ดบีดแต่ละเม็ดมีความแตกต่างกัน ทำให้ในการชั่งเม็ดบีดแต่ละครั้ง ได้ปริมาณซิลเวอร์ไอออนที่ค่อนข้างแตกต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณซิลเวอร์ไอออนที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อแช่มีค่าแตกต่างกันสูง และส่งผลให้ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* จากการทำการทดลองในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันสูงในที่สุด

หลังจากตรวจสอบปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่มีชีวิตด้วยวิธี viable count (รูปที่ 4.10A) พบว่า ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่มีชีวิตหลังจากสัมผัสกับเม็ดบีด C1, C2 และ C3 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าสูงถึง $\sim 6.4 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$, $\sim 3.7 \times 10^5 \pm 3.5 \times 10^4$ และ $\sim 2.5 \times 10^5 \pm 3.6 \times 10^4$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนเม็ดบีด S1 ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ถึง 90.05%, 100%, 99.21%, 99.84% และ 99.95% ตามลำดับ (รูปที่ 4.11A) เม็ดบีด S2 ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ถึง 93%, 96.91%, 100%, 93.45% และ 100% ตามลำดับ (รูปที่ 4.11A) และเม็ดบีด S3 ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ

A



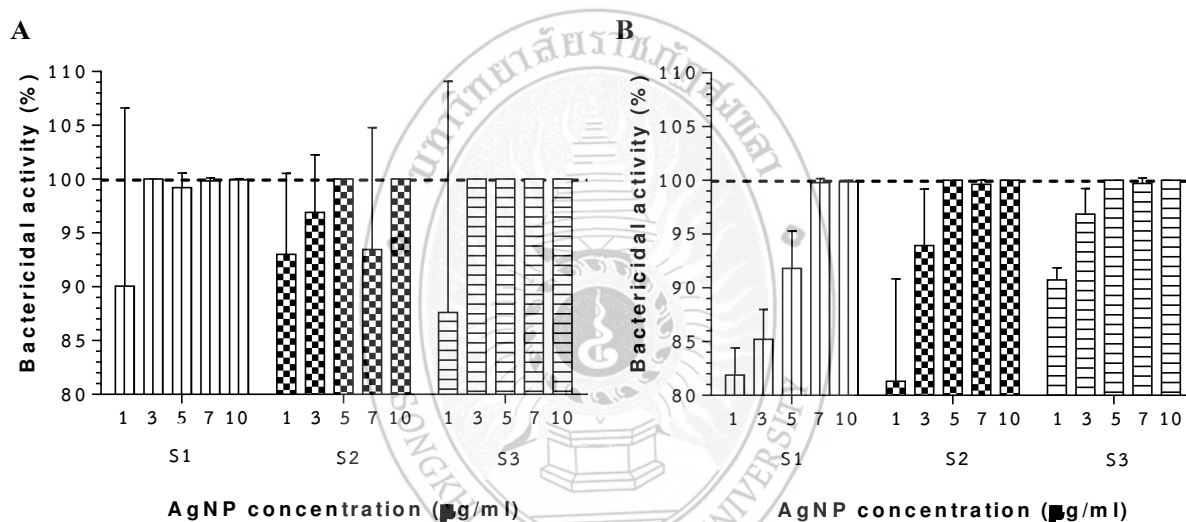
B



รูปที่ 4.10 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ปริมาณเชื้อ *E. coli* (A) และ *S. aureus* (B) ที่มีชีวิต (CFU/ml; mean \pm S.D.) ตรวจสอบด้วยวิธี viable count หลังจากบ่มเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 1×10^5 CFU/ml กับเม็ดบีด S1, S2 และ S3 (1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเม็ดบีด C1, C2 และ C3 ที่น้ำหนักเท่ากับน้ำหนักของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (*, ° และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดบีด C1, C2 และ C3 ตามลำดับ)

10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ถึง 87.6%, 100%, 100%, 100% และ 100% ตามลำดับ (รูปที่ 4.11A) นอกจากนี้หลังจากตรวจสอบปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่มีชีวิตด้วยวิธี viable count (รูปที่ 4.10B) พบว่า ปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่มีชีวิตหลังจากสัมผัสกับเม็คบิด C1, C2 และ C3 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าสูงถึง $\sim 4.6 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$, $\sim 2.8 \times 10^5 \pm 4.6 \times 10^4$ และ $\sim 2.2 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^4$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนเม็คบิด S1 ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ถึง 81.88%, 85.22%, 91.81%, 99.78% และ 99.86% ตามลำดับ (รูปที่ 4.11B) เม็คบิด S2 ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ถึง 81.31%, 93.93%, 100%, 99.64% และ 100% ตามลำดับ (รูปที่ 4.11B) และเม็คบิด S3 ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ถึง 90.75%, 96.87%, 100%, 99.7% และ 100% ตามลำดับ (รูปที่ 4.11B)



รูปที่ 4.11 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็คบิด S1, S2 และ S3

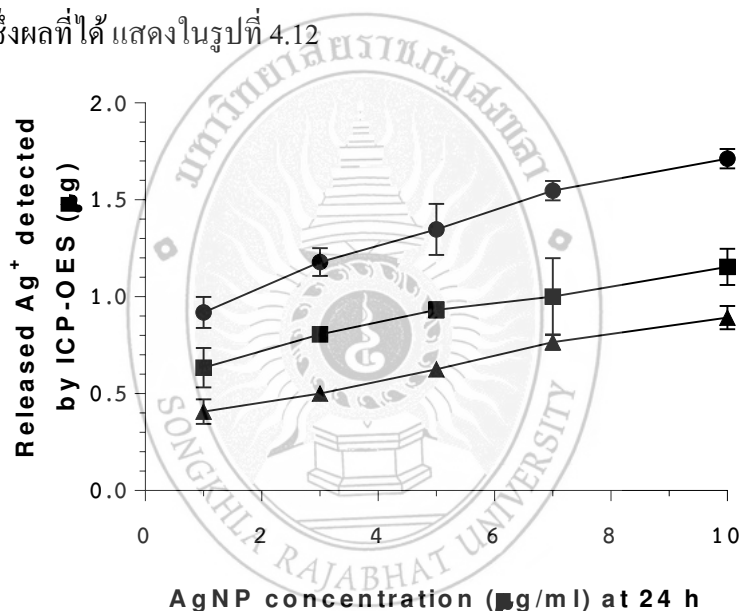
ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* (A) และ *S. aureus* (B) หลังจากตรวจสอบด้วยวิธี viable count โดยบ่มเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* กับเม็คบิด S1, S2 และ S3 ที่ความเข้มข้นเป็น 1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เส้นประคือ ค่าความเข้มข้นที่สารต้านจุลชีพสามารถฆ่าจุลินทรีย์ที่มีชีวิตได้ $\geq 99.9\%$

จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเม็คบิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล เกิดจากทั้งซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ผสมอยู่ในเม็คบิดอัลจินต/ไคโตซาน และจากตัวเม็คบิดอัลจินต/ไคโตซานเอง เนื่องจากเม็คบิด C1, C2 และ C3 สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้บางส่วน เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงดังปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ลดลง เมื่อความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซานเพิ่มขึ้น (ปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีชีวิตของเม็คบิด C1 < C2 < C3 ตามลำดับ) และปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีชีวิต ยังลดลงไปอีก เมื่อบ่มเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* กับเม็คบิดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ดังนั้น จึงเป็นการบ่งบอกว่า ถึงแม้จะตรึงซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลกับ

เม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน แต่ฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลยังคงอยู่ และสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า 80% ที่ความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ และเนื่องจากค่า MBC ของสารต้านจุลชีพคือ ค่าความเข้มข้นที่สารต้านจุลชีพสามารถฆ่าจุลินทรีย์ที่มีชีวิตได้ $\geq 99.9\%$ [64] ดังนั้นค่า MBC ที่ทำได้ในการศึกษานี้ สำหรับฆ่าเชื้อ *E. coli* ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 มีค่าเป็น 10, 10 และ 3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (รูปที่ 4.11A) และค่า MBC ที่ทำได้ในการศึกษานี้สำหรับฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 มีค่าเป็น >10 , 10 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (รูปที่ 4.11B)

4.4 การศึกษาการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3

การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ได้ศึกษาโดยการบ่มเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวกลางที่ประกอบด้วย PBS (pH 7.4) ปริมาตร 9 ml และ NB ปริมาตร 1 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้ แสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3

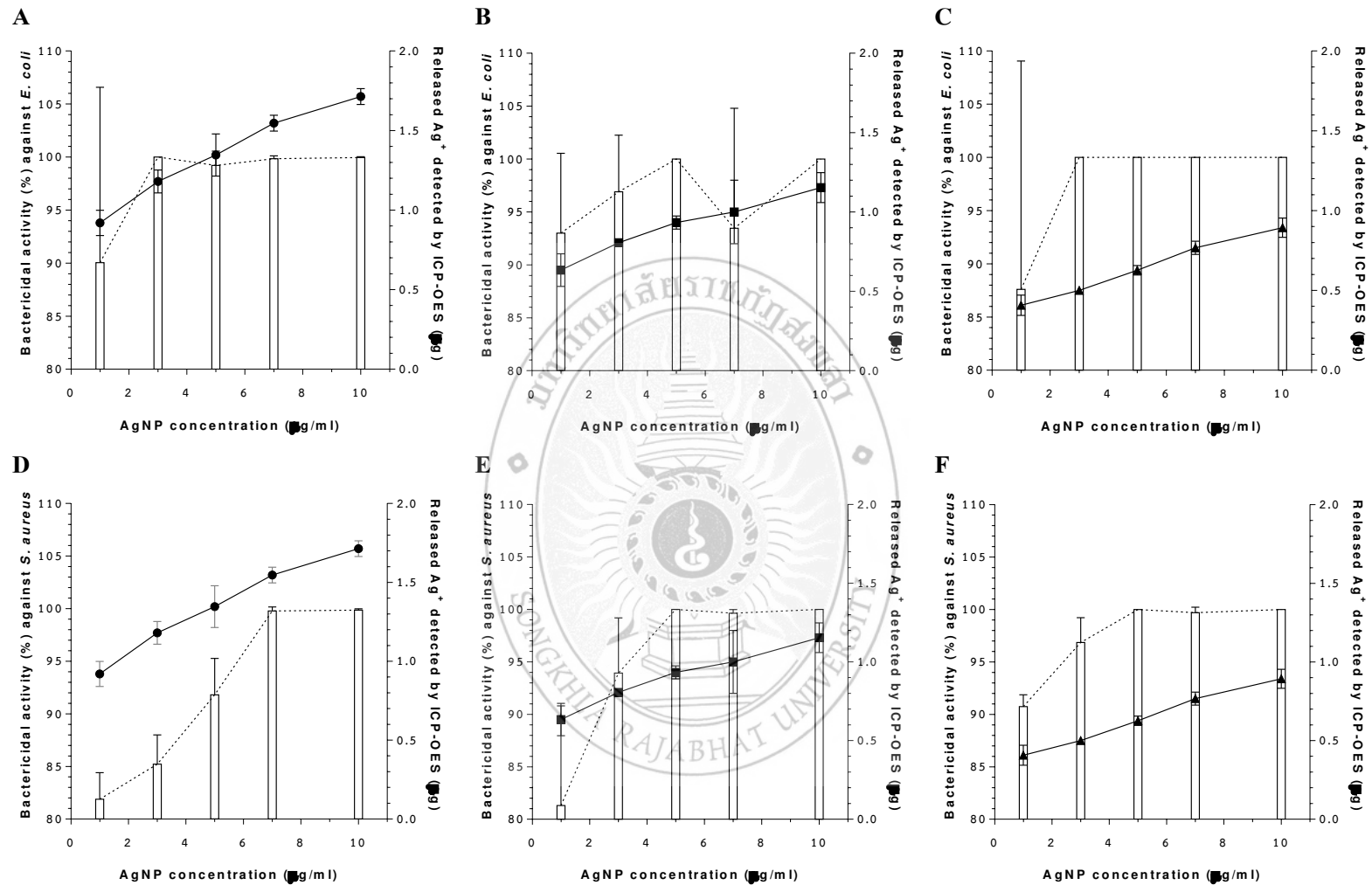
การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1 (●), S2 (■) และ S3 (▲) ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ หลังจากบ่มในตัวกลางที่ประกอบด้วย PBS (pH 7.4) ปริมาตร 9 ml และ NB ปริมาตร 1 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยเครื่อง ICP-OES และค่าที่วิเคราะห์ได้ แสดงผลเป็นปริมาณซิลเวอร์ไอออนซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ที่ปลดปล่อยออกมาจากเม็ดบีด

จากการทดลองพบว่า การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ 24 ชั่วโมง ขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ใช้ โดยเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเพิ่มขึ้น ปริมาณซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยจากเม็ดบีดจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1 มากกว่าเม็ดบีด S2 และ S3 ตามลำดับ จากรูปที่ 4.7 เม็ดบีด S1 (รูปที่ 4.7F) ซึ่งมีความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซานน้อยกว่า มีพื้นผิวขรุขระและมีขนาดของรูพรุนที่ค่อนข้างใหญ่กว่าเม็ดบีด S2 (รูปที่ 4.7L) และเม็ด

บีด S3 (รูปที่ 4.7R) ตามลำดับ จึงอาจส่งผลให้ เม็ดบีด S1 สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลได้มากกว่าเม็ดบีด S2 และ S3 ซึ่งมีความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซานมากกว่า และมีขนาดของรูพรุนค่อนข้างเล็กกว่า Hebeish และคณะ (2013) ได้เตรียม CMC ไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยไฮโดรเจลที่เตรียมได้มีรูพรุนที่ใหญ่ ส่งผลให้โมเลกุลของน้ำสามารถแพร่เข้าไปในไฮโดรเจล ทำให้ไฮโดรเจลพองตัว และปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเพื่อฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ในที่สุด [14]

นอกจากนี้ ความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3 กับฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* แสดงดังรูปที่ 4.13

จากการทดลองข้างต้นพบว่า ค่า MBC สำหรับฆ่าเชื้อ *E. coli* ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 มีค่าเป็น 10, 10 และ 3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (รูปที่ 4.11A) และค่า MBC สำหรับฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 มีค่าเป็น >10 , 10 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (รูปที่ 4.11B) โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าว เม็ดบีด S1, S2 และ S3 สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลได้เป็น 0.92 ± 0.08 , 0.63 ± 0.10 และ 0.41 ± 0.06 μg ตามลำดับ Martins และคณะ (2015) ได้เตรียมสารประกอบไคโตซาน (*N,N,N*-trimethyl chitosan) และอัลจินตที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* (ATCC 26922) ใน PBS (pH 7.4) จากผลการทดลองพบว่า เม็ดบีดที่ไม่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แต่เม็ดบีดที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ความเข้มข้น 3.3 mg/ml สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ใน PBS (pH 7.4) ได้ถึง 91% โดยเม็ดบีดที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ความเข้มข้น 3.3 mg/ml สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกมาได้ 10.9 $\mu\text{g/ml}$ ที่ pH 7.4 เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ดังนั้นผลการฆ่าเชื้อ *E. coli* ของเม็ดบีดที่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ 91% อาจเนื่องมาจากซิลเวอร์ไอออนที่ปลดปล่อยออกมา [40] แต่ในการศึกษานี้พบว่า เม็ดบีด S1 ซึ่งสามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลได้มากกว่า เม็ดบีด S2 และ S3 ตามลำดับ แต่มีค่า MBC ที่สูงกว่าเม็ดบีด S2 และ S3 ตามลำดับ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 นั้น ไม่ได้ขึ้นกับซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยออกมาเพียงอย่างเดียว อาจขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของอัลจินต/ไคโตซานด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ซึ่งเม็ดบีด C1 สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้น้อยกว่าเม็ดบีด C2 และ C3 ตามลำดับ จึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 อาจเนื่องมาจากทั้งซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยออกมาและความเข้มข้นของอัลจินต/ไคโตซานที่ใช้



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล จากเมดบิต S1, S2 และ S3 กับฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

ความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล จากเมดบิต S1 (A และ D), S2 (B และ E) และ S3 (C และ F) กับฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* (A, B และ C) และ *S. aureus* (D, E และ F) หลังจากบ่มเมดบิต S1, S2 และ S3 กับเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เตรียมเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล โดยมีขั้นตอนการเตรียม 2 ขั้นตอนด้วยกัน คือ (i) การเตรียมสารแขวนลอยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล และ (ii) การเตรียมเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล หลังจากนั้น ตรวจสอบคุณลักษณะของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ โดยศึกษารูปร่าง ขนาด ศักย์ซีต้า และสเปกตรัมของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล และตรวจสอบคุณลักษณะของเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ โดยศึกษารูปร่าง ขนาด ความสามารถในการบรรจุ (%) และค่าการสูญเสียของเม็ดบีด หลังจากนั้น ศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด และการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลออกจากเม็ดบีด จากผลการทดลองสรุปได้ว่า เม็ดบีด S1 ($1,149.76 \pm 201.27 \mu\text{m}$) มีขนาดเล็กกว่าเม็ดบีด S2 ($1,263.18 \pm 203.71 \mu\text{m}$) และเม็ดบีด S3 ($1,324.50 \pm 197.80 \mu\text{m}$) ตามลำดับ ($p > 0.05$) ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1 ($0.99 \pm 0.02 \text{ \%w/w}$) มากกว่าเม็ดบีด S2 ($0.6 \pm 0.02 \text{ \%w/w}$) และ S3 ($0.29 \pm 0.01 \text{ \%w/w}$) ตามลำดับ ($p < 0.05$) อีกทั้ง เม็ดบีด S1, S2 และ S3 สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีชีวิตใน PBS (pH 7.4) ได้มากกว่าเม็ดบีด C1, C2 และ C3 อย่างมีนัยสำคัญ ตามลำดับ ($p < 0.05$) โดยค่า MBC ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ต่อเชื้อ *E. coli* มีค่าเป็น 10, 10 และ 3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และค่า MBC ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ต่อเชื้อ *S. aureus* มีค่าเป็น >10 , 10 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเพิ่มขึ้น ปริมาณซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยจากเม็ดบีดเพิ่มขึ้นเช่นกัน ถึงแม้ว่า เม็ดบีด S1 สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลได้มากกว่าเม็ดบีด S2 และ S3 ตามลำดับ ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด S3 มีแนวโน้มยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าเม็ดบีด S2 และ S1 ตามลำดับ จึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด S1, S2 และ S3 นั้น ไม่ได้ขึ้นกับปริมาณซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่ปลดปล่อยออกมาเพียงอย่างเดียว แต่อาจขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอัลจินตและไคโตซานด้วย ดังนั้นเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ในการศึกษานี้ สามารถนำไปใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากเม็ดบีดที่เตรียมได้จากการศึกษานี้ สามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในวัสดุทางการแพทย์เพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ต่อไป ดังนั้น จึงควรศึกษาผลความเป็นพิษต่อเซลล์และความเป็น

พิษต่อยีนของเซลล์มนุษย์ เช่น เซลล์ผิวหนัง เป็นต้น ด้วย เพื่อให้แน่ใจว่า เม็ดบีดที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลที่จะนำไปใช้ ไม่มีความเป็นพิษ และสามารถใช้อย่างปลอดภัย

5.2.2 ในการศึกษา นี้ ได้เตรียมเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซานที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลเพียงขนาดเดียว และได้แสดงให้เห็นว่า ตัวเม็ดบีดเดี่ยว ๆ ที่ไม่มีซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล ก็สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ดังนั้น จึงสามารถนำเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน ที่เตรียมได้ มาใช้บรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลขนาดอื่น ๆ อีก เพื่อศึกษาผลของขนาดต่อความสามารถในการบรรจุ ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลออกจากเม็ดบีด



เอกสารอ้างอิง

- [1] S. W. P. Wijnhoven, W. J. G. M. Peijnenburg, C. A. Herberts, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. V. D. Meent, S. Dekkers, W. H. D. Jong, M. V. Zijverden, A. J. A. M. Sips, and R. E. Geertsma, Nano-silver- a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*, 3 (2009) 109-138.
- [2] B. S. Atiyeh, M. Costagliola, S. N. Hayek, and S. A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, *Burns*, 33 (2007) 139-148.
- [3] L. J. Wilkinson, R. J. White, and J. K. Chipman, Silver and nanoparticles of silver in wound dressing: A review of efficacy and safety, *J Wound Care*, 20 (2011) 543-549.
- [4] A. Lencastre, M. Lobo, and A. Joao, Argyria - Case report, *An Bras Dermatol*, 88 (2013) 413-416.
- [5] R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D. A. Dang, H. J. Hoffmann, and H. Autrup, PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes, *Toxicol Lett*, 190 (2009) 156-162.
- [6] N. Miura and Y. Shinohara, Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in Hela cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 390 (2009) 733-737.
- [7] S. Kim, J. E. Choi, J. Choi, K. H. Chung, K. Park, J. Yi, and D. Y. Ryu, Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells, *Toxicol In Vitro*, 23 (2009) 1076-1084.
- [8] F. Martinez-Gutierrez, P. L. Olive, A. Banuelos, E. Orrantia, N. Nino, E. M. Sanchez, F. Ruiz, H. Bach, and Y. Av-Gay, Synthesis, characterisation, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles, *Nanomedicine*, 6 (2010) 681-688.
- [9] G. A. Martinez-Castanon, N. Nino-Martinez, F. Martinez-Gutierrez, J. R. Martinez-Mendoza, and F. Ruiz, Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes, *J Nanopart Res*, 10 (2008) 1343-1348.
- [10] Z. Lu, K. Rong, J. Li, H. Yang, and R. Chen, Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria, *J Mater Sci: Mater Med*, 24 (2013) 1465-1471.
- [11] J. Fabrega, S. N. Luoma, CR. Tyler, T. S. Galloway, and J. R. Lead, Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment, *Environ Int*, 37 (2011) 517-531.
- [12] W. Liu, Y. Wu, C. Wang, H. C. Li, T. Wang, C. Liao, L. Cui, Q. F. Zhou, B. Yan, and G. B. Jiang, Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size, *Nanotoxicology*, 4 (2010) 319-330.

- [13] A. Travan, C. Pelillo, I. Donati, E. Marsich, M. Benincasa, T. Scarpa, S. Semeraro, G. Turco, R. Gennaro, and S. Paoletti, Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 1429-1435.
- [14] A. Hebeish, M. Hashem, M. M. A. El-Hady, and S. Sharaf, Development of CMC hydrogels loaded with silver nano-particles for medical applications, *Carbohydr Polym*, 92 (2013) 407-413.
- [15] A. F. Martins, H. D. M. Follmann, J. P. Monteiro, E. G. Bonafe, S. Nocchi, C. T. P. Silva, C. V. Nakamura, E. M. Giroto, A. F. Rubira, and E. C. Muniz, Polyelectrolyte complex containing silver nanoparticles with antitumor property on Caco-2 colon cancer cells, *Int J Biol Macromol*, 79 (2015) 748-755.
- [16] K. Baysal, A. Z. Aroguz, Z. Adiguzel, and B. M. Baysal, Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes, *Int J Biol Macromol*, 59 (2013) 342-348.
- [17] L. L. Hyland, M. B. Taraban, B. Hammouda, and Y. B. Yu, Mutually reinforced multicomponent polysaccharide networks, *Biopolymers*, 95 (2011) 840-851.
- [18] S. Chen, S. Cui, J. Hu, Y. Zhou, and Y. Liu, Pectinate nanofiber mat with high absorbency and antibacterial activity: A potential superior wound dressing to alginate and chitosan nanofiber mats, *Carbohydr Polym*, 174 (2017) 591-600.
- [19] E. Myhrman, J. Hakansson, K. Lindgren, C. Bjorn, V. Sjostrand, and M. Mahlapuu, The novel antimicrobial peptide PXL150 in the local treatment of skin and soft tissue infections, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97 (2013) 3085-3096.
- [20] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *J Colloid Interface Sci*, 275 (2004) 177-182.
- [21] Z. M. Xiu, Q. B. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, and P. J. J. Alvarez, Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles, *Nano Lett*, 12 (2012) 4271-4275.
- [22] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *J Colloid Interface Sci*, 275 (2004) 177-182.
- [23] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong, and M. H. Cho, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine*, 3 (2007) 95-101.
- [24] O. Choi, K. K. Deng, N. J. Kim, L. R. Jr, R. Y. Surampalli, and Z. Hu, The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Res*, 42 (2008) 3066-3074.

- [25] B. U. Lee, S. H. Yun, J. H. Ji, and G. N. Bae, Inactivation of *S. epidermidis*, *B. subtilis* and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilising airborne silver nanoparticles, *J Microbiol Biotechnol*, 18 (2008) 176-182.
- [26] M. Raffi, F. Hussain, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed, and M. M. Hasan, Antibacterial characterisation of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224, *J Mater Sci Technol*, 24 (2008) 192-196.
- [27] W. R. Li, X. B. Xie, Q. S. Shi, H. Y. Zeng, Y. S. Ou-Yang, and Y. B. Chen, Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 85 (2010) 1115-1122.
- [28] T. Silva, L. R. Pokhrel, B. Dubey, T. M. Tolaymat, K. J. Maier, and X. Liu, Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity, *Sci Total Environ*, 468 (2014) 968-976.
- [29] A. Ivask, I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova, V. Aruoja, S. Suppi, H. Vija, A. Kakinen, T. Titma, M. Heinlaan, M. Visnapuu, D. Koler, V. Kisand, and A. Kahru, Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells *in vitro*, *PLoS One*, 9 (2014) 1-14.
- [30] C. M. Santoro, N. L. Duchsherer, and D. W. Grainger, Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles, *Nanobiotechnology*, 3 (2007) 55-65.
- [31] W. R. Li, X. B. Xie, Q. S. Shi, S. S. Duan, Y. S. Ou-Yang, and Y. B. Chen, Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, *Biometals*, 24 (2011) 135-141.
- [32] M. Potara, E. Jakab, A. Damert, O. Popescu, V. Canpean, and S. Astilean, Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*, *Nanotechnology*, 22 (2011) 135101-135109.
- [33] L. F. Espinosa-Cristobal, G. A. Martinez-Castanon, R. E. Martinez-Martinez, J. P. Loyola-Rodriguez, N. Patino-Marin, J. F. Reyes-Macias, and F. Ruiz, Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*, *Mater Lett*, 63 (2009) 2603-2606.
- [34] K. Chaloupka, Y. Malam, and A. M. Seifalian, Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications, *Trends Biotechnol*, 28 (2010) 580-588.
- [35] T. Maneerung, S. Tokura, and R. Rujiravanit, Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing, *Carbohydrate Polymers*, 72 (2008) 51.
- [36] B. Obradovic, J. Stojkowska, Z. Jovanovic, and V. Miskovic-Stankovic, Novel alginate based nanocomposite hydrogels with incorporated silver nanoparticles, *J Mater Sci*, 23 (2012) 99-107.

- [37] S. Sharma, S. Chockalingam, P. Sanpui, A. Chattopadhyay, and S. S. Ghosh, Silver nanoparticles impregnated alginate-chitosan-blended nanocarrier induces apoptosis in human glioblastoma cells, *Adv Healthcare Mater*, 3 (2014) 106-114.
- [38] P. Sacco, A. Travan, M. Borgogna, S. Paoletti, and E. Marsich, Silver-containing antimicrobial membrane based on chitosan-TPP hydrogel for the treatment of wounds, *J Mater Sci: Mater Med*, 26 (2015) 128-139.
- [39] L. S. Wang, C. Y. Wang, C. H. Yang, C. L. Hsieh, S. Y. Chen, C. Y. Shen, J. J. Wang, and K. S. Huang, Synthesis and anti-fungal effect of silver nanoparticles-chitosan composite particles, *Int J Nanomedicine*, 10 (2015) 2685-2696.
- [40] A. F. Martins, J. P. Monteiro, E. G. Bonate, A. P. Gerola, C. T. P. Silva, E. M. Giroto, A. F. Rubira, and E. Muniz, Bactericidal activity of hydrogel beads on *N,N,N*-trimethyl chitosan/alginate complexes loaded with silver nanoparticles, *Chin J Chem*, 26 (2015) 1129-1132.
- [41] M. Yadollahi, S. Farhoudian, and H. Namazi, One-pot synthesis of antibacterial chitosan/silver bio-nanocomposite hydrogel beads as drug delivery systems, *Int J Biol Macromol*, 79 (2015) 37-43.
- [42] K. B. Narayanan and S. S. Han, Dual-crosslinked poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/silver nanocomposite beads - A promising antimicrobial material, *Food Chem*, 234 (2017) 103-110.
- [43] Y. N. Dai, P. Li, J. P. Zhang, A. Q. Wang, and Q. Wei, Swelling characteristics and drug delivery properties of nifedipine-loaded pH sensitive alginate-chitosan hydrogel beads, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 86 (2008) 493-500.
- [44] A. Mujtaba, M. Ali, and K. Kohli, Formulation of extended release cefpodoxime proxetil chitosan-alginate beads using quality by design approach, *Int J Biol Macromol*, 69 (2014) 420-429.
- [45] A. F. Martins, S. P. Facchi, J. P. Monteiro, S. R. Nocchi, C. T. P. Silva, C. V. Nakamura, E. M. Giroto, A. F. Rubira, and E. C. Muniz, Preparation and cytotoxicity of *N,N,N*-trimethyl chitosan/alginate beads containing gold nanoparticles, *Int J Biol Macromol*, 72 (2015) 466-471.
- [46] J. Li, C. Jiang, X. Lang, M. Kong, X. Cheng, Y. Liu, C. Feng, and X. Chen, Multilayer sodium alginate beads with porous core containing chitosan based nanoparticles for oral delivery of anticancer drug, *Int J Biol Macromol*, 85 (2016) 1-8.
- [47] F. E. Vasile, A. M. Romero, M. A. Judis, and M. F. Mazzobre, *Prosopis alba* exudate gum as excipient for improving fish oil stability in alginate-chitosan beads, *Food Chem*, 190 (2016) 1093-1101.
- [48] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio, *Chem Commun*, (2001) 617-618.

- [49] B. Chu, Y. Qu, Y. Huang, L. Zhang, X. Chen, C. Long, Y. He, C. Ou, and Z. Qian, PEG-derivatized octacosanol as micellar carrier for paclitaxel delivery, *Int J Pharm*, 500 (2016) 345-359.
- [50] W. T. Zhu, S. Y. Liu, L. Wu, H. L. Xu, J. Wang, G. X. Ni, and Q. B. Zeng, Delivery of curcumin by directed self-assembled micelles enhances therapeutic treatment of non-small-cell lung cancer, *Int J Nanomedicine*, 12 (2017) 2621-2634.
- [51] J. Farkas, P. Christina, J. A. G. Urrea, N. Roos, M. Hasselov, K. E. Tolefsen, and K. V. Thomass, Effect of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquat Toxicol*, 96 (2010) 44-52.
- [52] Z. S. Pillai and P. V. Kamat, What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method, *J Phys Chem B*, 108 (2004) 945-951.
- [53] X. C. Jiang, C. Y. Chen, W. M. Chen, and A. B. Yu, Role of citric acid in the formation of silver nanoplates through a synergistic reduction approach, *Langmuir*, 26 (2010) 4400-4408.
- [54] X. Dong, X. Ji, J. Jing, M. Li, J. Li, and W. Yang, Synthesis of triangular silver nanoprisms by stepwise reduction of sodium borohydride and trisodium citrate, *J Phys Chem C*, 114 (2010) 2070-2074.
- [55] A. M. E. Badawy, T. P. Luxton, R. G. Silva, K. G. Scheckel, M. T. Suidan, and T. M. Tolaymat, Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticle suspension, *Environ Sci Technol*, 44 (2010) 1260-1266.
- [56] A. Henglein and M. Giersig, Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of citrate, *J Phys Chem B*, 103 (1999) 9533-9539.
- [57] S. A. Cumberland and J. R. Lead, Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions, *J Chromatogr A*, 1216 (2009) 9099-9105.
- [58] S. Pal, Y. K. Tak, and M. Song, Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol*, 73 (2007) 1712-1720.
- [59] P. Shi, P. He, T. K. H. Teh, Y. S. Morsi, and J. C. H. Goh, Parametric analysis of shape changes of alginate beads, *Powder Technol*, 210 (2011) 60-66.
- [60] P. Pankongadisak, U. R. Ruktanonchai, P. Supaphol, and O. Suwanton, Development of silver nanoparticles-loaded calcium alginate beads embedded in gelatin scaffolds for use as wound dressings, *Polym Int*, 64 (2015) 275-283.
- [61] X. Z. Shu and K. J. Zhu, The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect, *Eur J Pharm Biopharm*, 53 (2002) 193-201.

- [62] P. Pankongadisak, U. R. Ruktanonchai, P. Supaphol, and O. Suwantong, Preparation and characterization of silver nanoparticles-loaded calcium alginate beads embedded in gelatin scaffolds, *AAPS Pharm Sci Tech*, 15 (2014) 1105-1115.
- [63] E. Torres, Y. N. Mata, M. L. Blazquez, J. A. Munoz, F. Gonzalez, and A. Ballester, Gold and silver uptake and nanoprecipitation on calcium alginate beads, *Langmuir*, 2005 (2005) 7951-7958.
- [64] A. Munoz-Bonilla, M. L. Cerrada, and M. Fernandez-Garcia, Introduction to antimicrobial polymeric materials, in: A. Munoz-Bonilla, M. L. Cerrada, and M. Fernandez-Garcia (Eds.), *Polymeric Materials with Antimicrobial Activity*, RSC Publishing, Cambridge, 2014, pp. 1-19.



ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทดลอง

ก1. ขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกึ่งกลางของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3 อย่างน้อย 50 เม็ดบีด ได้แสดงในตารางที่ ก1

ตารางที่ ก1 ขนาดของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ขนาด (μm)					
C1	C2	C3	S1	S2	S3
1960.72	1248.59	1433.12	881.92	1081.31	1934.5
1370.69	1456.73	1503.55	1414.66	1903.67	1203.7
1515.03	1486.63	1474.04	1096.71	1032.54	1276.9
941.83	1190.06	1455.28	1441.25	1742.93	1478.98
1066.55	1319.22	1611.49	1037.32	1096.13	1264.05
1297.61	1204.04	1593.41	1159.76	989.96	1404.07
1122.73	1214.34	1578.55	1210.06	1037.69	1697.76
1204.63	1392.95	1604.15	1147.74	1253.16	1352.92
1535.65	1229.2	1629.16	1043.08	1606.15	1367.07
1157.12	1488.05	1613.79	1203.86	1300.36	1235.41
1376.93	934.14	1630.85	1147.61	1263.99	1333.99
1075.04	1578.73	1625.49	1064.39	1537.33	1201.58
1496.87	1327.36	1587.92	1339.21	1183.75	1155.31
1160.48	1362.03	1517.05	749.79	1675.22	1423.95
1258.24	1264.66	1615.51	1348.24	1422.49	1666.74
1439.6	1357.95	1483.8	965.51	1529.87	1110.5
1213.52	1570.54	1526.53	1189.86	1406.7	1226.59
1198.63	1300.98	1514.13	887.62	1405.87	976.9
1224.79	1427.46	1484.47	1091.5	1425.93	1462.33
1030.42	1261.41	1534.33	1203.73	1458.29	1562.63
1293.45	1265.84	1603.02	1345.07	1172	1404.38
1479.33	1318.16	1599.08	931.78	1353.1	1160.42

ขนาด (μm)						
C1	C2	C3	S1	S2	S3	
1145.29	1348.67	1597.27	1585.83	1334.03	1472.68	
1567.76	1278.12	1586.84	959.6	1213.93	1098.22	
1055.2	1248.11	1549.96	949.32	1438.81	1479.27	
1414.91	1127.97	1481.93	1373.55	978.18	1442.34	
1259.27	1163.66	1536.88	1147.47	1492.42	1183.37	
1081.78	1174.1	1474.12	1406.05	1142.65	972.62	
1477.13	1267.25	1532.48	1119.72	1063.65	1189.13	
1476.79	1426.63	1531.83	1610.94	1224.2	1278.56	
1585.01	1362.91	1588.78	1155.7	794.24	1387.95	
1373.76	1379.55	1520.62	1530.06	1577.07	1061.04	
1406.64	1570.49	1448.17	1242.44	1149.28	1327.5	
1312.05	1192.49	1456.3	1604.92	1160.2	1304.59	
1336.56	1724.41	1657.52	1324.08	1256.5	1055.47	
1433.68	1163.52	1309.55	1672.16	1282.75	1321.95	
1477.55	1213.92	1541.22	1221.82	1274.76	1425.37	
1353.25	1347.2	1532.17	957.71	1282.77	1122.32	
1457.19	1094.19	1641.54	1002.83	1204.13	1438.62	
1392.26	1451.72	1468.32	921.04	1025.31	1434.23	
1386.67	1360.77	1444.72	1248.19	1234.02	1420.21	
1233.39	1398.08	1368.59	995.9	1090.13	1348.95	
1187.39	1332.78	1499.36	1176.65	1132.14	1383.67	
1252.41	1321.66	1367.35	935.02	1448.95	1124.88	
993.27	1386.13	1560.75	1122.19	1248.3	1782.6	
1578.73	1180.43	1604.3	1145.12	1277.56	1458.76	
1050.99	1328.88	1630.3	1025.17	1201.85	1182.04	
1385.13	1371.65	1540.78	1107.01	1100.22	1031.49	
1361.04	1425.43	1485.5	902.43	1116-38	1332.25	
1107.1	1471.87	1484.83	1139.39	1303.26	1264.09	
1220.9	1515.11	1496.25	1001.44	1320.35	-	
1475.99	1423.06	1476.96	1033.6	1369.5	-	
1234.53	1360.04	1470.96	1119.29	1157.38	-	

ขนาด (μm)					
C1	C2	C3	S1	S2	S3
1115.92	1277.87	1596.51	1004.57	1136.33	-
1284.07	1448.55	1515.45	1033.82	1065.84	-
1084.38	1203.23	1468.69	1238.93	1205.36	-
1304.11	1474.83	1491.85	1081.23	1186.87	-
1210.14	1590.66	1534.62	1013.32	1001.62	-
1585.17	1501.6	1531.96	1012.81	1104.47	-
983.71	1548.95	1484.95	963.36	1170.33	-
Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.
1,286.06 \pm	1,344.26 \pm	1,528.82 \pm	1,149.76 \pm	1,263.18	1,324.50
172.05	142.23	72.50	201.27	\pm 203.71	\pm 197.80



ก2. ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3

ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3 ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แสดงดังตารางที่ ก2

ตารางที่ ก2 ความสามารถในการบรรจุซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลในเม็ดบีด S1, S2 และ S3

ตัวอย่าง	ความสามารถในการบรรจุ (%w/w)			Mean \pm S.D.
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
S1	1	0.99	0.97	0.99 \pm 0.02
S2	0.59	0.59	0.62	0.6 \pm 0.02
S3	0.29	0.29	0.3	0.29 \pm 0.01



ก3. ค่าการสูญเสียน้ำของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ตารางที่ ก3 ค่าการสูญเสียน้ำของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ตัวอย่าง	ค่าการสูญเสียน้ำ (%w/w)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean \pm S.D.
C1	98.45	98.44	98.51	98.47 \pm 0.04
C2	98.31	98.33	98.28	98.31 \pm 0.03
C3	97.06	97.13	97.74	97.31 \pm 0.37
S1	98.26	98.22	98.18	98.22 \pm 0.04
S2	97.42	97.37	97.44	97.41 \pm 0.04
S3	95.75	95.68	95.84	95.76 \pm 0.08



ก4. ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3ตารางที่ ก4 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ของเม็ดบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของซิด เวอร์นาโนพาร์ติเคิล ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนโคโลนี \times dilution factor*				การยับยั้ง (%)	100% - %การ ยับยั้ง
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean \pm S.D.		
C1	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	10	6.9×10^5	6.8×10^5	5.4×10^5	$6.4 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$	100 ± 13.17	0
C2	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	10	3.7×10^5	3.3×10^5	4.0×10^5	$3.7 \times 10^5 \pm 3.5 \times 10^4$	100 ± 9.58	0
C3	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	10	2.4×10^5	2.2×10^5	2.9×10^5	$2.5 \times 10^5 \pm 3.6 \times 10^4$	100 ± 14.42	0
S1	1	1.8×10^5	2.0×10^3	3.0×10^3	$6.3 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^5$	9.95 ± 16.55	90.05 ± 16.55
	3	0	0	0	0	0	100 ± 0
	5	0	0	1.5×10^4	$5.0 \times 10^3 \pm 8.7 \times 10^3$	0.79 ± 1.36	99.21 ± 1.36
	7	0	0	3.0×10^3	$1.0 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3$	0.16 ± 0.27	99.84 ± 0.27
	10	0	0	1.0×10^3	333 ± 577	0.05 ± 0.09	99.95 ± 0.09
S2	1	0	5.5×10^4	2.2×10^4	$2.6 \times 10^4 \pm 2.8 \times 10^4$	7 ± 7.55	93 ± 7.55
	3	0	3.4×10^4	0	$1.1 \times 10^4 \pm 2.0 \times 10^4$	3.09 ± 5.35	96.91 ± 5.35
	5	0	0	0	0	0	100 ± 0
	7	0	0	7.2×10^4	$2.4 \times 10^4 \pm 4.2 \times 10^4$	6.55 ± 11.34	93.45 ± 11.34
	10	0	0	0	0	0	100 ± 0
S3	1	0	0	9.3×10^4	$3.1 \times 10^4 \pm 5.4 \times 10^4$	12.40 ± 21.48	87.6 ± 21.48
	3	0	0	0	0	0	100 ± 0
	5	0	0	0	0	0	100 ± 0
	7	0	0	0	0	0	100 ± 0
	10	0	0	0	0	0	100 ± 0

หมายเหตุ* คือ ค่า dilution factor ของ C1, C2 และ C3 เป็น 10000 และค่า dilution factor ของ S1, S2 และ S3 เป็น 1000

- คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ ก5 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* เมื่อบีด C1, C2, C3, S1, S2 และ S3

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ ซิลเวอร์นาโนพาร์ ติเคิล ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนโคโลนี \times dilution factor*				การยับยั้ง (%)	100% - %การ ยับยั้ง
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean \pm S.D.		
C1	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	10	6.4×10^5	3.8×10^5	3.6×10^5	$4.6 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$	100 ± 33.96	0
C2	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	10	2.3×10^5	3.2×10^5	2.9×10^5	$2.8 \times 10^5 \pm 4.6 \times 10^4$	100 ± 16.37	0
C3	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	10	2.3×10^5	2.4×10^5	2.0×10^5	$2.2 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^4$	100 ± 9.32	0
S1	1	9.6×10^4	7.3×10^4	8.1×10^4	$8.3 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$	18.12 ± 2.54	81.88 ± 2.54
	3	7.9×10^4	5.4×10^4	7.1×10^4	$6.8 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$	14.78 ± 2.78	85.22 ± 2.78
	5	5.1×10^4	4.2×10^4	2.0×10^4	$3.8 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$	8.19 ± 3.47	91.81 ± 3.47
	7	3.0×10^3	0	0	$1.0 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3$	0.22 ± 0.38	99.78 ± 0.38
	10	1.0×10^3	0	1.0×10^3	667 ± 577	0.14 ± 0.13	99.86 ± 0.13
S2	1	7.2×10^4	6.3×10^4	2.2×10^4	$5.2 \times 10^4 \pm 2.7 \times 10^4$	18.69 ± 9.52	81.31 ± 9.52
	3	1.0×10^3	2.0×10^4	3.0×10^4	$1.7 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^4$	6.07 ± 5.26	93.93 ± 5.26
	5	0	0	0	0	0	100 ± 0
	7	1.0×10^3	2.0×10^3	0	$1.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$	0.36 ± 0.36	99.64 ± 0.36
	10	0	0	0	0	0	100 ± 0
S3	1	1.8×10^4	2.3×10^4	2.1×10^4	$2.1 \times 10^4 \pm 2.5 \times 10^3$	9.25 ± 1.13	90.75 ± 1.13
	3	1.1×10^4	1.0×10^3	9.0×10^3	$7.0 \times 10^3 \pm 5.3 \times 10^3$	3.13 ± 2.37	96.87 ± 2.37
	5	0	0	0	0	0	100 ± 0
	7	2.0×10^3	0	0	667 ± 1155	0.30 ± 0.52	99.7 ± 0.52
	10	0	0	0	0	0	100 ± 0

หมายเหตุ * คือ ค่า dilution factor ของ C1, C2 และ C3 เป็น 10000 และค่า dilution factor ของ S1, S2 และ S3 เป็น 1000

- คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

ก5. การปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3

ตารางที่ ก6 ปริมาณการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน และ/หรือซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลจากเม็ดบีด S1, S2 และ S3 หลังจากตรวจสอบด้วยเครื่อง ICP-OES

ความเข้มข้นของซิลเวอร์ นาโนพาร์ติเคิล ($\mu\text{g/ml}$)	เม็ดบีด S1 (μg)			เม็ดบีด S2 (μg)			เม็ดบีด S3 (μg)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	1	0.92	0.84	0.52	0.66	0.72	0.48	0.36	0.38
3	1.2	1.1	1.24	0.8	0.82	0.8	0.52	0.48	0.5
5	1.2	1.38	1.46	0.9	0.98	0.92	0.62	0.66	0.6
7	1.54	1.5	1.6	1	0.8	1.2	0.8	0.78	0.72
10	1.76	1.66	1.72	1.26	1.12	1.08	0.84	0.96	0.88



ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ – สกุล ภวิกา มาสวัตต์
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- สถานที่ทำงาน โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
- E-mail addresss pawika_mahasawat@hotmail.com
- ประวัติการศึกษา

ภ.บ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	พ.ศ. 2546
ภ.ม.	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	พ.ศ. 2551
Ph.D. (Medicine)	The University of Manchester	พ.ศ. 2558

- สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ Drug delivery systems, Nanotoxicity, Animal cell culture
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

ปี	ชื่อเรื่อง	แหล่งทุน
2558	การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>Escherichia coli</i> และการปลดปล่อยของเม็ดเคลือบเชื่อมอัลจินตที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
2559	การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเม็ดบีดอัลจินต/ไคโตซาน/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเชื้อ <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
2560	การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของเม็ดบีดอัลจินต/ซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิลต่อเซลล์ HaCaT	กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

7.2 งานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Mahasawat, P., Hlongkeaw, K., & Charoenrit, S. (2016). Effect of Chitosan and Alginate Concentration on Size and Bactericidal Activity against *Escherichia coli* of Chitosan/Alginate/Silver Nanoparticle Beads. *Applied Mechanics and Materials*, 855, 54-59.

- Alqahtani, S., Promtong, P., Oliver, A.W., He, X.T., Walker, T.D., Povey, A., Hampson, L. & Hampson, I.N. (2016). Silver nanoparticles exhibit size-dependent differential toxicity and induce expression of syncytin-1 in FA-AML1 and MOLT-4 leukaemia cell lines. *Mutagenesis*, 31, 695-702.
- Promtong, P., O'Brien, P. & Povey, A. (2013). Toxicity of different silver nanoparticle sizes on DNA repair-proficient and -deficient mouse embryonic fibroblasts mediated by intracellular release of silver ions. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54, S33-S33.
- Promtong, P., O'Brien, P. & Povey, A. (2012). Cytotoxic effects of silver nanoparticles on DNA repair proficient and deficient mouse embryonic fibroblasts. *Mutagenesis*, 27, 810-810.
- Ratanaphan, A., Canyuk, B., Wasiksiri, S., & Mahasawat, P. (2005). *In vitro* platination of human breast cancer suppressor gene1 (BRCA1) by the anticancer drug carboplatin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725, 145-151.

7.3 งานตีพิมพ์ใน Proceeding

- Mahasawat, P., Songkro, S., & Oungbho, K. (8-11 Sept, 2007). Controlled release and penetration of arbutin from water-in-oil-in-water emulsions containing chitosan and alginate, Conference of the European Chitin Society (EUCHIS'07), Antalya, Turkey
- Mahasawat, P., Hlongkeaw, K., & Charoenrit, S. (1-2 Aug, 2016). Effect of Chitosan and Alginate Concentration on Size and Bactericidal Activity against *Escherichia coli* of Chitosan/Alginate/Silver Nanoparticle Beads, URU International Conference on Science and Technology 2016“Celebrating 80 years of Uttaradit Rajabhat University”, UttaraditRajabhat University, Uttaradit, Thailand
- โสรญา หมุดตะเหล็ก ประทุมพร เอียดปราบ และ ภวิกา มหาสวัสดิ์. (2559). การศึกษาขนาด การสูญเสีย น้ำ และการฟองตัวของเม็ดเคลือบเชื่อมอัลจินตที่ประกอบด้วยซิลเวอร์นาโนพาร์ติเคิล.ประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 26, 26-29 พฤษภาคม 2559 โรงแรมบุรีศรีภู บูติก จังหวัดสงขลา.789-796.

ภาคผนวก ค

การเผยแพร่ผลงาน

Mahasawat, P., Hlongkeaw, K. and Charoenrit, S. (2016). Effect of chitosan and alginate concentration on size and bactericidal activity against *Escherichia coli* of chitosan/alginate/silver nanoparticle beads. *Applied Mechanics and Materials*. 855, 54-59.

