บทที่ 3 วิธีวิจัย

3.1 สารเคมีและวัตถุดิบ

เอธิลเซลลูโลส (Ethyl Cellulose-EC) ซื้อจากบริษัท ALDRICH (ประเทศสหรัฐอเมริกา) CAS 9004–57-3 ความหนืด 100,000 cps (ความเข้มข้น 5 % ในตัวทำละลาย toluene/EtOH อัตราส่วน 80/20) เอธานอล 95% (Ethanol-EtOH) ซื้อจากบริษัท UV Holding (ประเทศไทย) ส่วนว่านหางจระเข้เป็นพันธุ์ BARBADENSIS ได้จากการปลูกเองภายในสถานที่ทำการวิจัย อายุประมาณ 2 ปี โดยปลูกในบริเวณที่ได้รับแดดวันละประมาณ 8 ชั่วโมงและทำการรดน้ำวันละประมาณ 1 ครั้งหรือตามแต่ความเหมาะสม

3.2 การเตรียมสารละลายเอธิลเซลลูโลส

สารละลายเอธิลเซลลูโลสมาตรฐาน

สารละลายเอธิลเซลลูโลสในเอธานอลถูกเตรียมโดยวิธีการดังนี้

1. ชั่งเอธิลเซลลูโลสในปริมาณที่ต้องการโดยใช้เครื่องชั่งดิจิตอลที่มีความละเอียด ±0.1 มิลลิกรัม เทเอธิลเซลลูโลสไว้ในขวด Duran Glass ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. เติมเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 โดยปริมาตรลงในขวดในปริมาณที่ต้องการเพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของเอธิลเซลลูโลสร้อยละ 2, 3, 4, 5.5, 7, 8.5, 10, 12 และ 14 โดยน้ำหนัก (wt%) ตามสูตรที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

3. วางขวดที่ใส่สารละลายบน Magnetic stirrer plate เพื่อกวนสารละลายเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะละลายเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ก่อนนำสารละลายไปใช้ จะต้องพักสารละลายไว้จนกระทั่งไม่มีฟองอากาศปนอยู่ในสารละลาย

ตารางที่ 3.1 สูตรการเตรียมสารละลายเอธิลเซลลูโลส

ความเข้มข้นของสารละลาย (%wt)	ปริมาตรของตัวทำละลาย (mL)	มวลของเอธิลเซลลูโลส (g)
2	10	0.167
3	10	0.254
4	10	0.342
5.5	10	0.477
7	10	0.617
8.5	10	0.762
10	10	0.911
12	10	1.118
14	10	1.335

สารผสมระหว่างสารละลายเอธิลเซลลูโลสมาตรฐานและเจลจากว่านหางจระเข้

1. เจลจากว่านหางจระเข้ถูกเตรียมโดยตัดใบว่านหางจระเข้สด ปอกเปลือกเพื่อแยกส่วนที่เป็นยางสีเขียวออกไปให้เหลือแต่ส่วนวุ้นใส ใช้มีดสะอาดที่ผ่านการล้างด้วยเอธานอลขูดวุ้น ทำการกรองเพื่อให้ได้เจลที่มีลักษณะเป็นเมือกใส

2. เติมเจลจากว่านหางจระเข้ลงในสารละลายเอธิลเซลลูโลสมาตรฐานในปริมาณที่ต้องการเพื่อให้อัตราส่วนโดยปริมาตรระหว่างเจลจากว่านหางจระเข้กับสารละลายเอธิลเซลลูโลสมาตรฐานเป็น 0.0:1.0, 0.1:0.9, 0.3:0.7 และ 0.5:0.5

3. คนให้ส่วนผสมเข้ากันโดยใช้ Magnetic stirrer plate จนกว่าจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.3 การวัดสมบัติทางกระแสวิทยาของสารละลาย

สมบัติทางกระแสวิทยาของสารละลายเอธิลเซลลูโลสในเอธานอลถูกวัดโดยใช้เครื่อง Rotational viscometer (Thermo HAAKE, RheoStress 1, ประเทศเยอรมนี) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำสารละลายเอธิลเซลลูโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ มาวัดความหนืดโดยใช้หัววัดแบบ Plate-Plate ขนาด 59.997 มิลลิเมตรใช้โหมดการวัดแบบ CR-Rotation Ramp ที่อัตราความเครียดตั้งแต่ 0.1 ถึง 1000 s^{-1} ความหนืดของสารละลายปรากฏ (η_{app}) สามารถคำนวณได้จากการค่าความเค้น (τ) และอัตราความเครียด ($\dot{\gamma}$) ตามสมการที่ (3-1)

$$\eta_{app} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \tag{3-1}$$

2. หาดัชนีความเกี่ยวพัน โดยนำค่าความหนืดของสารละลายที่ Shear rate 100 s^{-1} มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความเข้มข้น ในกราฟ log – log และหาช่วงของความหนืดที่เหมาะสมในการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต โดยค่าความหนืด (η_{app}) ความเข้มข้น (c) และดัชนีความเกี่ยวพัน (n) มีความสัมพันธ์ดังสมการที่ (2-1)

$$\eta_{app} \sim c^n \tag{2-1}$$

ดังนั้น จะได้ว่า

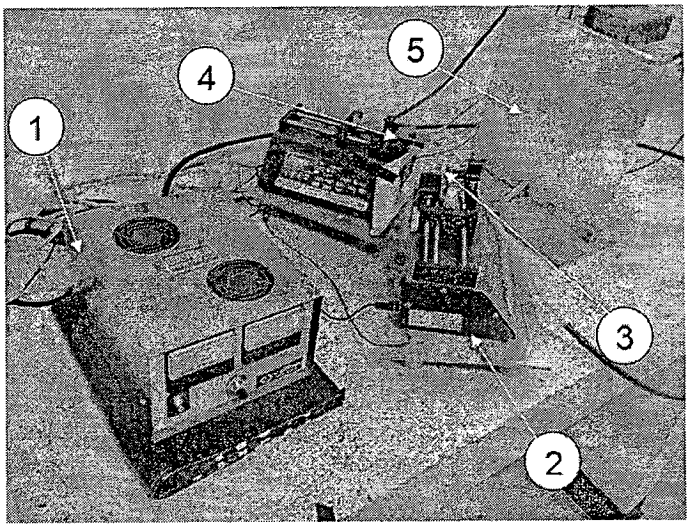
$$\eta_{app} = kc^n \tag{3-2a}$$

$$\log \eta_{app} = \log k + n \log c \tag{3-2b}$$

สมการที่ 3-2 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าความหนืดปรากฏและความเข้มข้นในเสกล log-log และแสดงให้เห็นว่า ค่าดัชนีความเกี่ยวพันก็คือความชันของเส้นกราฟนั่นเอง

3.4 การทดลองหาเงื่อนไขที่เหมาะสมของการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต

สำหรับวิธีการผลิตวัสดุปิดผิวเส้นใยนาโนด้วยวิธีอิเล็กโตรสปินนิ่งจะใช้เทคนิค Solvent Coating ที่เสนอโดย Kanjanapongkul และคณะ (Kanjanapongkul *et al.*, 2010a, 2010b) อุปกรณ์หลักที่ใช้ในการผลิตฟิล์มประกอบด้วย 1) แหล่งกำเนิดไฟฟ้าแรงดันสูง (Gamma High Voltage, ES60P-5W/DAM, ประเทศสหรัฐอเมริกา) 2) Syringe pump (Syringe Pump NE-300 ประเทศสหรัฐอเมริกา) และ 3) แผ่นเก็บเส้นใยทำจากเหล็กไร้สนิมขนาดประมาณ 300 x 300 มิลลิเมตร^2 โดยทำการจัดตำแหน่งของอุปกรณ์ต่างๆให้เหมาะแก่การผลิตฟิล์ม (ภาพที่ 3.1) ที่แผ่นรองรับจะมีการนำแผ่นฟอยล์มาติดไว้เพื่อทำให้สามารถเก็บฟิล์มได้ง่ายหลังจากการผลิต โดยเงื่อนไขในการผลิตฟิล์มด้วยกระบวนการการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต ได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 การจัดวางอุปกรณ์ต่างๆ ในกระบวนการการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต (1) แหล่งกำเนิดไฟฟ้าแรงดันสูง (2) Syringe pumps (3) กระบอกบรรจุสารละลาย (4) กระบอกบรรจุตัวทำละลาย (5) แผ่นรองรับที่หุ้มด้วยแผ่นฟอยล์

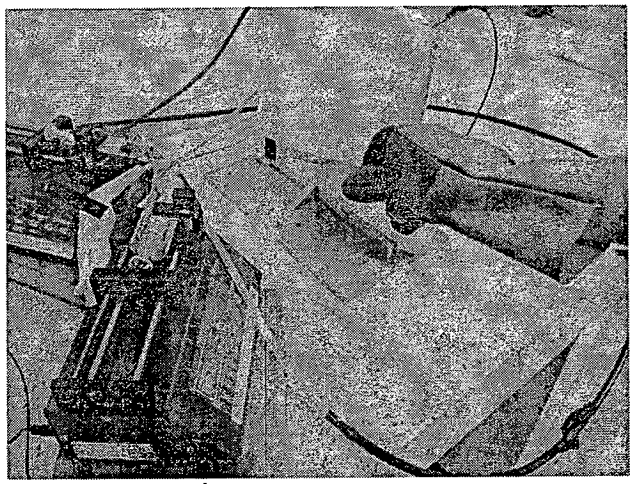
ตารางที่ 3.2 เงื่อนไขที่ใช้ในกระบวนการการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต

ความเข้มข้นของ	เงื่อนไขที่ใช้ในกระบวนการการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต			
สารละลาย (%wt)	แรงดันไฟฟ้า (kV)	ระยะห่าง (cm)	อัตราการไหลของสารละลาย (µl/min)	อัตราการไหลของตัวทำละลาย (µl/min)
2 - 14	8 – 20	5 – 20	20 - 130	5 - 10

3.5 การตรวจสอบสัณฐานของเส้นใย

3.5.1 การตรวจสอบสัณฐานของเส้นใยด้วยกล้อง Light microscope (LM)

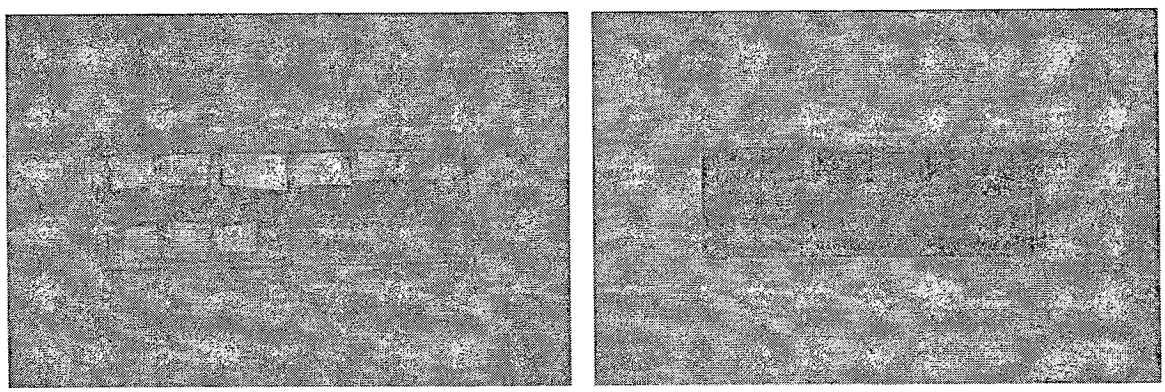
ทำการเก็บตัวอย่างเส้นใย โดยการนำแผ่นสไลด์มาติดกับแท่งโลหะ จากนั้นนำแท่งโลหะวางให้ติดกับแผ่นรองรับ เพื่อให้เกิดการนำไฟฟ้าได้ดี (ภาพที่ 3.2) ทำการเก็บตัวอย่างฟิล์มเป็นระยะเวลาประมาณ 1 นาที หลังจากนั้น นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการตรวจสอบสัณฐานของเส้นใยด้วยกล้อง LM (OLYMPUS, CHS, ประเทศญี่ปุ่น)



ภาพที่ 3.2 การเก็บตัวอย่างฟิล์ม

3.5.2 การตรวจสอบสัณฐานของเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

สำหรับการเตรียมวัสดุปิดผิวเพื่อนำไปตรวจสอบสัณฐานเส้นใยด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) สามารถทำโดยทำการผลิตวัสดุปิดผิวเส้นใยนาโนบนกระดาษฟอยล์เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นตัดฟิล์มให้มีขนาดใหญ่กว่า 5 x 5 มิลลิเมตร และนำไปพ่นเคลือบด้วยอนุภาคทองคำ (ภาพที่ 3.3) นำแผ่นฟิล์มไปแล้วตรวจสอบสัณฐานเส้นใยด้วย SEM (Camscan, MS2000, ประเทศอังกฤษ) ภาพ SEM ของเส้นใยที่ได้จะถูกตรวจสอบ ขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของขนาดของเส้นใยจะถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมชื่อ ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, รัฐแมรี่แลนด์)



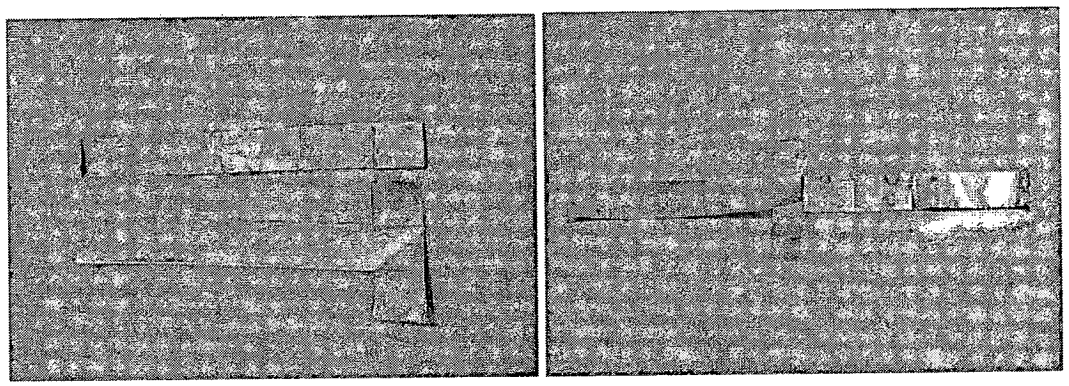
(ก) (ข)

ภาพที่ 3.3 ฟิล์มตัวอย่าง (ก) ก่อนเคลือบทอง (ข) หลังเคลือบทอง

3.6 การทดสอบความแข็งแรงของฟิล์ม

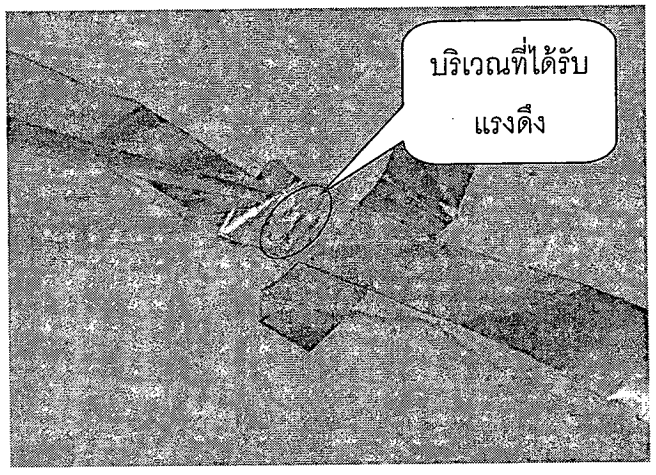
เนื่องจากฟิล์มที่ผลิตได้มีความอ่อนนุ่มเป็นพิเศษ การวัดสมบัติทางกลจึงจำเป็นต้องใช้วิธีที่เหมาะสม ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างฟิล์มเพื่อนำไปวัดสมบัติทางกลขึ้น โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ตัดฟอยล์ให้มีขนาด 10 x 80 มิลลิเมตร จำนวน 2 ชิ้น (ภาพที่ 3.4 ก) วางแผ่นฟอยล์ทั้งสองให้อยู่บนแผ่นรองรับและอยู่ในแนวเดียวกันให้เหลื่อมกัน 10 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3.4 ข) ทั้งนี้เพื่อให้ฟิล์มได้รับแรงกระทำโดยตรงในขณะทำการทดสอบความแข็งแรง ภาพที่ 3.5 แสดงลักษณะของแผ่นฟิล์มที่ผลิตบนแผ่นฟอยล์ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น



(ก) (ข)

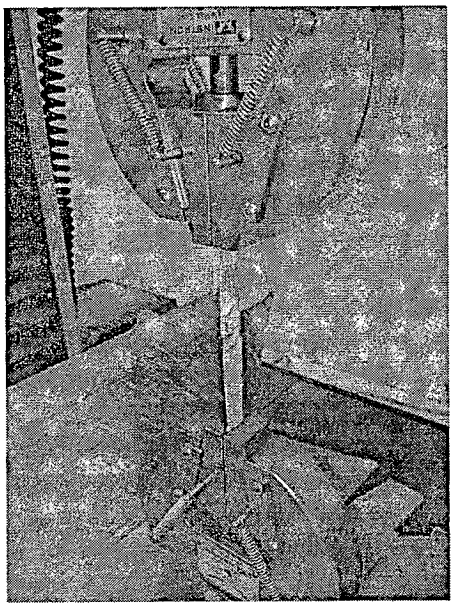
ภาพที่ 3.4 ฟอยล์ที่ใช้ในการเตรียมฟิล์มตัวอย่าง (ก) ฟอยล์ขนาด 80 มิลลิเมตร จำนวน 2 ชิ้น (ข) ว่างแผ่นฟอยล์ทั้ง 2 แผ่นให้เหลือมกัน 10 มิลลิเมตร



ภาพที่ 3.5 บริเวณที่ฟิล์มได้รับแรงดึงในขณะทำการทดสอบความแข็งแรง

2. ติดแผ่นฟอยล์บนแผ่นรองรับ และทำการหุ้มฉนวนบริเวณรอบๆแผ่นรองรับ เพื่อให้การเก็บฟิล์มมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ทำการผลิตฟิล์มด้วยกระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต และกำหนดระยะเวลาในการผลิตฟิล์ม เป็นเวลา 30 นาที

3. วัดความหนาของฟิล์มที่ผลิตด้วยไมโครมิเตอร์ แล้วนำไปทำการทดสอบความแข็งแรงของฟิล์มโดยเครื่อง Universal Testing Machine (Instron, 5569, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่อัตราเร็วในการดึง 10 มิลลิเมตร/นาที ค่า Load cell 0.5 กิโลนิวตัน และระยะห่างระหว่างหัวยึด 100 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3.6)



ภาพที่ 3.6 หัวยึดแผ่นฟิล์มที่ใช้ในการทดสอบความแข็งแรงของฟิล์ม

4. คำนวณค่า Young's Modulus จากค่าความเค้นดึง และความเครียดโดยใช้สมการที่ 3-3

Young's Modulus = ความเค้นดึง / ความเครียด (3-3)

3.7 **การทดสอบ** Cytotoxicity **โดยวิธี** MTT assay

ในงานวิจัยนี้ เซลล์ที่ใช้ทดสอบคือเซลล์ผิวหนังมนุษย์ Normal human skin fibroblast: CRL 2522 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) with 10% Fetal bovine serum และ 3. 0.25% Trypsine-EDTA สารทดสอบที่ใช้ในการวิจัยนี้ ได้แก่ เอธิลเซลลูโลส, ว่านหางจระเข้สด ฟิล์มที่เตรียมบนแผ่นอลูมินัมฟอยล์ และฟิล์มที่เตรียมบนแผ่นกระจก โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. เตรียมเซลล์ที่ต้องการทดสอบ โดยการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ 0.25% Trypsine – EDTA จากนั้น ทำการปรับปริมาณเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 1 x 105 cells/ml ด้วย DMEM+ แล้วนำเซลล์มาเลี้ยงเซลล์ใน 96-well TC plate หลุมละ 100 µl (=10,000 cells/well) บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง

2. ทดสอบเซลล์กับสารทดสอบ โดยการใส่สารทดสอบลงในเซลล์ Column แรก ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 µg/mL ทำการเจือจางแบบ Two fold serial dilution จาก Column แรกที่ใส่สาร จนถึง column ที่ 11 ส่วน Column สุดท้าย ใช้เป็น Control

3. เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการทดสอบหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตบนแผ่นกรองโดย MTT assay โดยใส่สารละลาย MTT (5 mg/mL) หลุมละ 25 µL แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลทออกจากตู้แล้วดูดของเหลวออกจนหมด ละลายตะกอน MTT formazan ด้วย DMSO หลุมละ 100 µL จากนั้น ดูดสารละลายสีที่ได้ออกมาใส่หลุมที่ไม่มีตัวอย่าง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 nm. คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตโดยใช้สมการ (3-4)

$$\%\text{Cell viability} = 100\% \times (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / \text{OD}_{\text{control}} \qquad (3\text{-}4)$$