บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาผ้าฝ้ายปิดแผลที่เคลือบด้วยกระบวนการโซล-เจล
2. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆในกระบวนการเคลือบผ้าต่อคุณสมบัติของผ้าที่ได้
3. เพื่อประเมินความเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นผ้าฝ้ายปิดแผลจากคุณสมบัติต่างๆ ของผ้าที่ได้
4. เพื่อสร้างองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์สำหรับการต่อยอดต่อไป

3.2 ขอบเขตงานวิจัย

- เพื่อศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผ้าปิดแผลที่เคลือบด้วยซิลิกา (SiO_2) ซีโรเจลซึ่งสามารถปลดปล่อยสารเคอร์คูมินโดยใช้กระบวนการโซล-เจลในการสังเคราะห์
- ศึกษาจลนศาสตร์การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากผ้าฝ้ายที่เคลือบซิลิกาจากกระบวนการโซล-เจล
- ศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากผ้าปิดแผล เช่น การต้านเชื้อแบคทีเรีย การต้านอนุมูลอิสระ
- ศึกษาสมบัติทางกายภาพอื่นๆที่สำคัญของผ้าปิดแผล อันได้แก่ ความเป็นรูพรุน ความแข็งแรง มุมสัมผัสกับน้ำ
- ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ 2 กรกฎาคม 2555 ถึง 1 กรกฎาคม 2557

3.3 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.3.1 สารเคมี

1. ผ้าฝ้ายทอลายขัด (น้ำหนักต่อพื้นที่ 76 กรัมต่อตารางเมตร เส้นด้ายยืน 108 เส้นต่อนิ้วและด้ายพุ่ง 88 เส้นต่อนิ้ว
2. Absolute Ethanol บริษัท Merck KGaA ,Germany
3. Absolute Methanol บริษัท Merck KGaA ,Germany
4. Hydrochloric acid (37%) บริษัท Merck KGaA ,Germany
5. Acetic acid (glacial) บริษัท Merck KGAA ,Germany

6. Sodium acetate (anhydrous) บริษัท Sigma-Aldrich Co., USA
7. Tetraethyl orthosilicate บริษัท Sigma-Aldrich Co., USA
8. TWEEN®80 บริษัท Sigma-Aldrich Co., USA
9. สารเคอร์คูมิน (ความบริสุทธิ์ 95%) บริษัท Changsha Kang Rong Biological Technology Co., China
10. DPPH radical บริษัท Sigma-Aldrich Co., USA

3.3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงช่วงยูวี-วิสิเบิล (UV/Vis Spectrometer: Perkin Elmer Lambda 25)
2. ลูกกลิ้งจุ่มอัด (Padding mangle: Labtec, Newave Lab, Equipments, Co., Ltd.)
3. เครื่องทดสอบความคงทนต่อการฉีกขาดของผ้า (Elmendorf tearing tester) จากบริษัท James H.Heal & Co. Ltd. Halifax, England
4. เครื่องทดสอบการต้านทานแรงดึง (Tensile tester Instron 5567)
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath shaker Dye Plus DL-2003)
6. เครื่องล้างความถี่สูง (Sonicator VGT-2013HTD Portfolio)
7. เครื่องอบแห้ง (Laboratory mini-dryer, Model M-3 No.4151 Labtec, Taiwan)
8. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM: JEOL JSM-5410LV)
9. เครื่องวิเคราะห์หาพื้นที่ผิวและรูพรุน (Quantachrome Autosorb iQ automated gas sorption system)

3.3.3 สถานที่ทำวิจัย

การวิจัยส่วนใหญ่ดำเนินการในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต

รายการต่อไปนี้ส่งวิเคราะห์นอกสถานที่

การวิเคราะห์	**ผู้ให้บริการวิเคราะห์ทดสอบ**
การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา	ศูนย์เครื่องมือกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พื้นที่ผิว ปริมาตรและขนาดรูพรุน	วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี
สมบัติการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย	ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
ความเป็นพิษต่อเซลล์	ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.4 วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การเตรียมผ้าฝ้ายก่อนการเคลือบผิว

ทำความสะอาดและฟอกขาวผ้าฝ้ายด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิวเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัมต่อลิตร ที่อัตราส่วนน้ำต่อผ้า 30:1 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C พร้อมคนตลอดเวลา เป็นเวลา 30 นาที นำขึ้นล้างน้ำและผึ่งให้แห้ง

ตอนที่ 2 การเคลือบผิวผ้าฝ้ายด้วยกระบวนการโซล-เจล

สำหรับขั้นตอนนี้ เริ่มแรกจะเป็นการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบผิวผ้าฝ้ายด้วยกระบวนการโซล-เจล โดยปัจจัยที่ศึกษาคือ กระบวนการเคลือบ (จุ่มอัด หรือจุ่มแช่) ปริมาณน้ำและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้ผ้าแห้ง เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงเลือกมาดำเนินการทดลองต่อดังในย่อหน้าถัดไป

การเตรียมสารละลายโซลสามารถทำได้โดยผสม TEOS กับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.01 M เอทานอล และ เคอร์คูมินที่ปริมาณต่างๆดังตารางที่ 1 สารละลายโดยรวมปริมาตร 25 มิลลิลิตรทุกสภาวะ จากนั้นนำสารละลายโซลไปเขย่าเพื่อทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องล้างความถี่สูงเป็นเวลา 30 วินาที จะได้สารละลายสีเหลืองใส จุ่มผ้าฝ้ายขนาดกว้าง 4 ซม. × 10 ซม. จุ่มลงในสารละลายโซลนี้เป็นเวลา 10 นาที นำขึ้นและอัดด้วยความดัน 2 kg/cm^2 ด้วยลูกกลิ้งบีบอัด บันทึกค่าน้ำหนักทั้งก่อนจุ่มและหลังจุ่ม เพื่อนำไปคำนวณ % wet pickup นำผ้าฝ้ายที่ได้ไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณค่า % add-on

รายละเอียดของผ้าตัวอย่างที่เคลือบด้วยสารละลายโซลที่มีองค์ประกอบต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตอนที่ 3 การทดสอบการปลดปล่อยสารสกัดจากขมิ้นชัน

ตัวกลางที่ใช้ทดสอบการปลดปล่อยสารสมุนไพรเป็นสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ผสม 10% Tween80 โดยปริมาตร ซึ่งสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์สามารถเตรียมได้โดยผสม sodium acetate 150 กรัมเข้ากับน้ำกลั่น 250 มล. เติม glacial acetic acid 15 มล. ลงไปช้าๆ จะได้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.5 นำสารละลายบัฟเฟอร์นี้ผสมกับสารลดแรงตึงผิวชนิด

Tween 80 ในอัตราส่วน 10% โดยปริมาตรก็จะได้สารละลายที่ใช้เป็นตัวกลางทดสอบการปลดปล่อยยาสำหรับการทดสอบนี้) การทดสอบการปลดปล่อยสารเคอร์คูมินทำได้โดยนำผ้าตัวอย่างที่เตรียมได้จากตอนที่ 1 ขนาด 4 ซม. × 5 ซม. แช่ในเอทานอลปริมาตร 50 มล. และเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายตัวกลางปริมาตร 100 มล. ที่ 32°C เขย่าด้วยความถี่ 60 รอบต่อนาที เก็บสารละลายตัวกลางปริมาตร 4 มล. ออกมาที่ช่วงเวลาต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ 426 นาโนเมตร และทุกครั้งต้องแทนที่ด้วยสารละลายตัวกลางใหม่ลงไปเพื่อให้ได้ปริมาตรโดยรวมของระบบคงที่เสมอ ทำการทดลองซ้ำ 3 ตัวอย่างเพื่อรายงานผล ส่วนน้ำหนักเคอร์คูมินทั้งหมดในผ้าคำนวณจากการนำผ้าไปแช่เอทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เขย่าด้วยเครื่องล้างความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาทีและใช้แรงกลบีบอัด

ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบของผ้าตัวอย่าง

ตัวอย่าง	TEOS (mmol)	Curcumin (mg)	0.01 M HCl (ml)	EtOH (ml)
C-30	-	30	7.50	17.50
T10-30	10	30	7.50	15.25
T20-30	20	30	7.50	12.50
T30-30	30	30	7.50	10.75
C-50	-	50	7.50	17.50
T10-50	10	50	7.50	15.25
T20-50	20	50	7.50	12.50
T30-50	30	50	7.50	10.75
C-70	-	70	7.50	17.50
T10-70	10	70	7.50	15.25
T20-70	20	70	7.50	12.50
T30-70	30	70	7.50	10.75

ตอนที่ 4 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา (Morphology)ของผ้าฝ้ายที่เตรียมได้

ตรวจสอบพื้นผิวของเส้นใยในตัวอย่างผ้าด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่ความต่างศักย์ 15 kV และขยายภาพ 100 เท่า ก่อนการทดสอบ ตัดชิ้นผ้าแปะบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ด้วยเทปกาวและเคลือบด้วยทองเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 10 นาที

ตอนที่ 5 วิเคราะห์พื้นที่ผิว ปริมาตรและขนาดของรูพรุนด้วยเทคนิคการดูดซับแก๊สไนโตรเจน

พื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area) ปริมาตร และขนาดของรูพรุนในชิ้นตัวอย่างสามารถวิเคราะห์ได้จากเทคนิคการดูดซับแก๊ส (gas sorption analysis) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์หาพื้นที่ผิวและรูพรุน และผ่านแก๊สไนโตรเจนเข้าในตัวอย่าง ก่อนการทดสอบตัวอย่างถูกกำจัดน้ำและสารปนเปื้อนอื่นๆ (outgas) ที่อุณหภูมิ 80°C จนกระทั่งไม่มีความชื้น แล้วจึงทำการวิเคราะห์การดูดซับแก๊สไนโตรเจนโดยบันทึกไอโซเทอร์มทั้งช่วงดูดซับ (adsorption) และปลดปล่อย (desorption) ทำการวิเคราะห์ค่าพื้นที่ผิวจำเพาะจากสมการ Brunauer-Emmett-Teller (BET) ในช่วงความดันสัมพัทธ์ที่ 0.05-0.30 ซึ่งให้ค่าไอโซเทอร์มเป็นเส้นตรง ส่วนค่าการกระจายขนาดของรูพรุน (pore size distribution) จะใช้สมการของ Barrett-Joyner-Halenda (BJH) โดยใช้ไอโซเทอร์มในช่วงการปลดปล่อยในการคำนวณ

ตอนที่ 6 วิเคราะห์สมบัติเชิงกลของผ้า

การวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของผ้าเป็นไปตามมาตรฐานการทดสอบ โดยการทดสอบการต้านทานการดึงยืด ใช้เครื่องทดสอบแรงดึงยืดและสภาวะการทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D035 ตั้งค่า gauge length ที่ 7.5 ซม. และ cross-head speed 300 มม./นาที ส่วนการทดสอบการต้านทานแรงฉีกขาดนั้นใช้เครื่องทดสอบการต้านทานการฉีกขาดตามมาตรฐาน ASTD D 1424 ทำการรายงานผลทำโดยใช้ค่าเฉลี่ยจากผลการทดสอบอย่างน้อย 5 ค่าสำหรับทั้งสองการทดสอบ

ตอนที่ 7 วิเคราะห์มุมสัมผัสของหยดน้ำบนพื้นผิวผ้า

นำผ้าที่ผ่านการตกแต่งสำเร็จด้วยกระบวนการโซล-เจลและผ้าที่ชุบสารเคอร์คูมินแต่ไม่ผ่านกระบวนการโซล-เจล มาหามุมสัมผัสของน้ำกับผ้า โดยใช้เครื่องทดสอบ contact angle meter รุ่น CAM-PLUS Tantac

ตอนที่ 8 วิเคราะห์สมบัติการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

การวิเคราะห์สมบัติการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย เป็นไปตามมาตรฐาน AATCC 100-1999 ในการทดสอบนี้ ชิ้นตัวอย่างผ่านการฆ่าเชื้อก่อนการทดสอบโดยการฉายแสงยูวีเป็นเวลา 15 นาที ทั้ง 2 ด้าน จากนั้นตัดชิ้นตัวอย่างเป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8 เซนติเมตร ซ้อนกันเป็นจำนวน 4 ชั้น แล้วนำมาทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* เริ่มต้น 3.27×10^5 CFU หรือเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ *E. coli* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.25×10^5 CFU ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ 24 ชั่วโมงที่ $37^{\circ}C$ จากนั้นคำนวณปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ลดลง (% R) เทียบกับผ้าที่ไม่ผ่านการตกแต่ง ตามสมการดังต่อไปนี้

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

เมื่อ A และ B เป็นจำนวนแบคทีเรียที่เหลืออยู่จากชิ้นตัวอย่างผ้าที่ไม่ผ่านการเคลือบผิวและผ่านการเคลือบผิวตามลำดับ

ตอนที่ 9 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นไปตามมาตรฐาน ISO 10993-5 : Test on Extraction ตัวอย่างผ้าเป็นรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มม. ใช้วิธีการฆ่าเชื้อบนชิ้นตัวอย่างด้วยรังสียูวีด้านละครึ่งชั่วโมง และทดสอบความเป็นพิษตัวอย่างกับเซลล์ Normal human skin fibroblast (ATCC CRL 2522, P14) ที่เวลา Extraction period 24 ชั่วโมง สารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 2 มล. ต่อตัวอย่างผ้าพื้นที่ผิว 6 ตร.ซม. และทดสอบเซลล์กับสารเลี้ยงเซลล์ที่สกัดจากชิ้นตัวอย่างนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบเพื่อหาค่าเซลล์มีชีวิตโดยวิธี MTT assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (absorbance) ซึ่งจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยจะบอก mitochondrial activity ของเซลล์ที่มีชีวิต สามารถคำนวณ %cell viability จากสมการ

%cell viability = 100 × (Absorbance of treated cell/ Absorbance of control cell)

เมื่อ control cell หรือเซลล์ชุดควบคุมคือเซลล์ที่เลี้ยงในสาร DMEM ปกติ ขณะที่ treated cell คือเซลล์ที่เลี้ยงในสารที่สกัดออกมาจากตัวอย่างหลังการแช่ 24 ชั่วโมง

ตอนที่ 10 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

การเตรียมสาร DPPH ความเข้มข้น 100 μM ทำได้โดยการชั่งสาร DPPH 0.0197 กรัม ละลายใน methanol และปรับปริมาตรให้ได้ 500 ml. ควรเก็บไว้ในตู้เย็นและพันแสง สามารถเก็บสารไว้ใช้ได้ไม่เกิน 3 วันหลังจากการเตรียม

ปิเปตสาร DPPH ปริมาณ 3 มล. ผสมลงในตัวอย่างเคอร์คูมิน 3 มล. ที่เก็บมาจากการปลดปล่อยของผ้าที่ผ่านการตกแต่งด้วยกระบวนการโซล-เจลในชั่วโมงที่ 24 เขย่าให้สารเข้ากัน แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นจึงนำไปวัดด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยใช้ Blank เป็น Acetate buffer อ่านค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

การทำชุดควบคุม (control) ปิเปตสาร DPPH ปริมาณ 3 มล. ผสมลงใน Acetate buffer 3 มล. แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นจึงนำไปวัดด้วยเครื่อง UV/VIS spectrometer โดยใช้ Blank เป็น Acetate buffer โดยอ่านค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

สูตรที่ใช้คำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ คือ

$$\% \text{ Radical Scavenging activity} = \frac{(Abs_{Control} - Abs_{Sample}) \times 100}{Abs_{Control}}$$

โดย AbsControl คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม ส่วนAbs Sample คือค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH ที่ผสมกับสารตัวอย่างเคอร์คูมิน