



รายงานฉบับสมบูรณ์

แผ่นปิดแผลต้านจุลินทรีย์ทำจากไคโตซาน/อะคริลิกที่ลามิเนตบนผ้าก๊อช
Antimicrobial Wound Dressing made from Chitosan/Acrylic Laminated
on Gauze Fabric

“งานวิจัยยังไม่ได้รับการตรวจประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง”

โดย ผศ. ดร. สิริรัตน์ จารุจินดา และคณะ
ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธันวาคม 2561

สัญญาเลขที่ RDG60T0077

รายงานฉบับสมบูรณ์

แผ่นปิดแผลต้านจุลินทรีย์ทำจากไคโตซาน/อะคริลิกที่ลามิเนตบนผ้าก๊อซ
Antimicrobial Wound Dressing made from Chitosan/Acrylic Laminated
on Gauze Fabric

“งานวิจัยยังไม่ได้รับการตรวจประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง”

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ. ดร. สิริรัตน์ จารุจินดา	ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. รศ. ดร. กาวี ศรีกุลกิจ	ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดโครงการ “การพัฒนาอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อม” ปีงบประมาณ 2560

สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย วช. - สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

แผ่นปิดแผลที่มีอยู่ในทางการค้ามีมากมายหลายชนิด มักทำมาจากวัสดุสังเคราะห์ แนวคิดในการนำไคโตซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจึงเป็นแนวคิดที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแผ่นปิดแผลที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์และมีสมบัติอื่นๆใกล้เคียงกับแผ่นปิดแผลทางการค้า โดยทำการเตรียมฟิล์มไคโตซาน 2 ชนิด (ฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองและฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง) พบว่าชั้นฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองมีความเหนียวเหนอะหนะ แต่เมื่อนำไปلامิเนตกับผ้าฝ้ายก๊อชแล้วทำการพับ แผ่นจะติดกลับมาเหมือนเดิมทำให้ไม่เกาะติดอยู่บนผิวหนัง อย่างไรก็ตามฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และแสดงรัศมีการยับยั้งออกไปได้โดยรอบ เนื่องจากในชั้นฟิล์มไคโตซานมีการผสมกันของไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ โดยส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆจะแพร่ออกมาเพื่อทำหน้าที่แสดงรัศมีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ในกรณีของฟิล์มไคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรองมีความใส พับไปมาได้ไม่ติดกลับ เมื่อนำไปลามิเนตบนผ้าฝ้ายก๊อชก็สามารถแนบสนิทกับผิวหนังได้ จึงเหมาะสมสำหรับทำเป็นแผ่นปิดแผล อย่างไรก็ตามฟิล์มไคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรองแสดงสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ไม่ดีเทียบเท่าฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง นอกจากนี้ยังได้ทดสอบเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์มาตรฐาน L929 (fibroblast ของหนู) และเซลล์มาตรฐาน ATCC CRL222 (fibroblast ของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ส่วนหน้าผาก) พบว่าฟิล์มที่เตรียมได้มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าแผ่นปิดแผลทางการค้า อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอาจยังไม่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ สาเหตุอาจเนื่องมาจากยังมีสารมอนอเมอร์ตกค้างอยู่ในพีเอ็มเอ็มเออีมีลชันนั่นเอง

สรุปโครงการวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์พีเอ็มเอ็มเออีมีลชันเพื่อใช้เป็นฐานรองที่มีความใสของฟิล์มไคโตซานแล้วไปลามิเนตบนผ้าฝ้ายก๊อชได้ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยมีความเห็นว่า การทำวิจัยเรื่องผ้าปิดแผลสำหรับรักษาบาดแผลเรื้อรังนั้นไม่เพียงแต่การพัฒนาวัสดุให้มีสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม ให้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเท่านั้น แต่เพื่อให้วัสดุนั้นสามารถนำไปใช้ได้เชิงพาณิชย์ จำเป็นต้องมีการทดสอบฤทธิ์สมานแผลในหนูขาวที่เป็นเบาหวาน และสุดท้ายควรมีการนำผ้าปิดแผลไปใช้ในคนไข้จริง ดังนั้นหากต้องทำโครงการเกี่ยวกับผ้าปิดแผลสำหรับบาดแผลเรื้อรังควรมีคณะผู้วิจัยที่มาจากหลากหลายสาขา โดยเฉพาะจากคณะแพทยศาสตร์ คณะพยาบาลศาสตร์ เพื่อไม่ให้มีอุปสรรคในการขอโครงการผ่านคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์และคนทดลอง สามารถได้ผลการทดสอบกับคนป่วยจริง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมฟิล์มไคโตซาน 2 ชนิด (ฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองและฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง) พบว่าชั้นฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองมีความเหนียวเหนอะหนะ เมื่อนำไปประกอปกกับผ้าก๊อซแล้วทำการพับ แผ่นจะติดกลับมาเหมือนเดิมทำให้ไม่เกาะติดอยู่บนผิวหนัง อย่างไรก็ตามฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และแสดงรัศมีการยับยั้งออกไปได้โดยรอบ เนื่องจากในชั้นฟิล์มไคโตซานมีการผสมกันของไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ โดยส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆจะแพร่ออกมาเพื่อทำหน้าที่แสดงรัศมีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ในกรณีของฟิล์มไคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง มีความใส พับไปมาไม่ติดกลับ เมื่อนำไปติดบนผ้าก๊อซก็สามารถแนบสนิทกับผิวหนังได้ จึงเหมาะสมสำหรับทำเป็นแผ่นปิดแผล อย่างไรก็ตามฟิล์มไคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรองแสดงสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ไม่ดีเทียบเท่าฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เตรียมได้มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าแผ่นปิดแผลทางการค้า อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอาจยังไม่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ สาเหตุอาจเนื่องมาจากยังมีสารมอนอเมอร์ตกค้างอยู่ในพีเอ็มเอ็มเออีเอ็มลชันนั่นเอง

Abstract

In this study, two types of chitosan films were prepared (chitosan film coated EVA sheet and chitosan coated PMMA film). The chitosan film coated on EVA sheet itself exhibited tackiness but it exhibited flexibility when laminated on gauze fabric, resulting in the difficulty of application onto skin. However, its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* was excellent. In case of chitosan/PMMA film, it was thin and transparent. We were able to laminate the chitosan/PMMA film onto gauze fabric without any problem. It was easy to use when compared to chitosan film coated EVA sheet. Unfortunately, its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* was rather poor. Moreover, it exhibited cell toxicity which likely was associated with residual monomer in PMMA emulsion. However, the percentage of viability of the prepared chitosan/PMMA film laminated on gauze fabric is higher than that of the commercial wound dressing.

สัญญาเลขที่ RDG60T0077
แผนปิดแผลด้านจุลินทรีย์ทำจากไคโตซาน/อะคริลิกที่ลามิเนตบนผ้าก๊อช
สรุปรายงานฉบับสมบูรณ์

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการ

ชื่อผู้รับทุน : ผศ. ดร. สิริรัตน์ จารุจินดา

โครงการเริ่มเมื่อ

วันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2560 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม พ.ศ. 2561

รวมเวลาที่ทำวิจัยทั้งสิ้น 15 เดือน (ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาจาก 12 เดือน เป็น 15 เดือน)

ส่วนที่ 2 รายงานเนื้อหา

สารบัญ

หัวข้อ		หน้า
บทสรุปผู้บริหาร		i
บทคัดย่อภาษาไทย		ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		iii
ส่วนที่ 1 ข้อมูลของโครงการ		iv
ส่วนที่ 2 รายงานเนื้อหา		v
สารบัญ		v
สารบัญตาราง		viii
สารบัญรูป		ix
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา	2
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ	2
	1.5 กรอบแนวความคิดของการวิจัยและขั้นตอนการวิจัยในภาพรวม	3
	1.6 แผนงานโครงการ	4
บทที่ 2	การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	5
	2.1 ไคโตซาน	6
	2.1.1 สมบัติที่ยังแบคทีเรีย	7
	2.2 วัสดุฐานรอง	7
	2.2.1 อีวีเอ (EVA, ethylene vinyl acetate)	7
	2.2.2 พีเอ็มเอ็มเอ (PMMA, polymethylmethacrylate)	8
	2.3 วัสดุปิดแผล	8
	2.3.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวัสดุปิดแผล	8
	2.3.2 ชนิดของวัสดุปิดแผลที่ใช้ในปัจจุบัน	9
	2.4 งานวิจัยที่แสดงประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยในการต้านจุลินทรีย์	10
	2.5 ข้อมูลจากผู้ผลิตวัสดุปิดแผลในประเทศ	11
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	14
	3.1 วัสดุและสารเคมี	15
	3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในทดลอง	16
	3.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์และทดสอบ	17
	3.4 วิธีการทดลอง	17

3.4.1	การเตรียมแผ่นฟิล์มโคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช	17
3.4.2	การเตรียมฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอ ฐานรอง	17
3.4.3	การวิเคราะห์และทดสอบสมบัติของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์ม โคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง	18
3.4.3.1	การทดสอบการดูดซึมน้ำ (Water absorption)	18
3.4.3.2	การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Staphylococcus aureus</i> ของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและ ฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองด้วยวิธี agar diffusion	18
3.4.3.3	การทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพี เอ็มเอ็มเอฐานรองตามมาตรฐาน AATCC 100	19
3.4.3.4	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity) ด้วยเทคนิค MTT assay	20

บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
4.1	ลักษณะทางกายภาพของฟิล์ม	23
4.1.1	ลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มโคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช	23
4.1.2	ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง	24
4.2	ลักษณะสัณฐานวิทยาของฟิล์ม	25
4.2.1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของแผ่นฟิล์มโคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช	25
4.2.2	ลักษณะสัณฐานวิทยาของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง	25
4.3	การดูดซึมน้ำ	26
4.4	สมบัติความทนแรงดึง	27
4.5	สมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i>	28
4.6	ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง	29
4.7	ผลการต้านแบคทีเรียของฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าฝ้ายก๊อช	30
4.8	ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน L929	31
4.9	ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน AATCC CRL2522	31
บทที่ 5	สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	33
5.1	สรุปผลการทดลอง	34
5.2	ข้อเสนอแนะ	34
รายการเอกสารอ้างอิง		36
ภาคผนวก		38
ภาคผนวก ก ตารางเปรียบเทียบแผนงานตามข้อเสนอโครงการและที่ได้ทำจริง		39

ตารางเปรียบเทียบผลผลิต (Output) ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ดำเนินการได้จริง	40
ตารางเปรียบเทียบผลผลิต (Output) ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ดำเนินการได้จริง	40

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1	แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	14
ตารางที่ 3.1	วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	15
ตารางที่ 3.2	สูตรที่ใช้เตรียมฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง	17
ตารางที่ 4.1	ขนาดของ clear zone of inhibition ของฟิล์มโคโตซานและฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง	28
ตารางที่ 4.2	ร้อยละการลดลงของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ของฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่لامิเนตบนผ้าก๊อช	31
ตารางที่ 4.3	ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ของฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่لامิเนตบนผ้าก๊อช ด้วยเทคนิค MTT Assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน L929	31
ตารางที่ 4.4	เปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ของแผ่นปิดแผลทางการค้ากับฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่لامิเนตบนผ้าก๊อช ด้วยเทคนิค MTT Assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน ATCC CRL2522 ที่ incubation period 1, 7 และ 14 วัน	32

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	โครงสร้างเคมีของไคตินและไคโตซาน	6
รูปที่ 2.2	โครงสร้างของอีวีเอ (ซ้าย) และอีวีเออิมัลชัน (ขวา)	7
รูปที่ 2.3	โครงสร้างเคมีของพีเอ็มเอ็มเอ (ซ้าย) และฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอ (ขวา)	8
รูปที่ 4.1	ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซาน และฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช	23
รูปที่ 4.2	ลักษณะทางกายภาพของผ้าฝ้ายก๊อช ฟิล์มไคโตซาน และฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช ภายหลังผ่านการดูดซึมน้ำ	23
รูปที่ 4.3	ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง	24
รูปที่ 4.4	ลักษณะสัณฐานวิทยาของฟิล์มไคโตซาน เส้นใยเซลลูโลสของผ้าฝ้ายก๊อช และ ฟิล์มไคโตซานบน ผ้าฝ้ายก๊อชด้วยเทคนิค SEM	25
รูปที่ 4.5	ภาพ SEM แสดงการยึดติดระหว่างฟิล์มไคโตซานและแผ่นอีวีเอฐานรอง	25
รูปที่ 4.6	ความสามารถในการดูดซึมน้ำของฟิล์มไคโตซาน	26
รูปที่ 4.7	ร้อยละการดูดซึมน้ำของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองที่ปริมาณไคโตซานต่าง ๆ	27
รูปที่ 4.8	ความทนแรงดึงของฟิล์มไคโตซาน ผ้าฝ้ายก๊อช และ แผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช	27
รูปที่ 4.9	แบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> (A) และชุดควบคุมที่เป็นน้ำกลั่น (B)	28
รูปที่ 4.10	การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ของฟิล์มไคโตซาน (A) และ ฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง (B)	29
รูปที่ 4.11	ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง	29
รูปที่ 4.12	ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าฝ้ายก๊อช	30

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

เมื่อผิวหนังเกิดบาดแผลจากอุบัติเหตุ หรือจากโรคผิวหนังและโรคเบาหวาน วิธีการปกป้องบาดแผล ชั้นพื้นฐานคือ ใช้แผ่นปิดแผล (wound dressing) ผ้าก๊อซ (gauze) พลาสเตอร์ (plaster) หรือใช้ร่วมกับ ผ้าพันแผล (bandage) เป็นต้น ขึ้นอยู่กับชนิดของบาดแผล ซึ่งทำหน้าที่เพียงปกคลุมบาดแผลไว้เท่านั้น และเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า ไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางรวมทั้งการนำมาใช้เป็นแผ่นปิดแผล อย่างไรก็ตามฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอิวีเอและฟิล์มไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองไม่มีความแข็งแรง จึงฉีกขาดง่าย ไม่สะดวกในการใช้งาน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดแรงบันดาลใจ ในการพัฒนาผ้าพันแผลไคโตซานผสมสมุนไพรมะนาว ซึ่งเป็นการรวมเอาผ้าพันแผลและแผ่นปิดแผลมาไว้ด้วยกันทำให้สะดวกต่อการใช้งาน อีกทั้งมีการเติมสมุนไพรมะนาวที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ลงไป ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผ้าพันแผลดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผลได้เทียบเท่ากับแผ่นปิดแผลทางการค้า ในโครงการวิจัยนี้จะทำการเตรียมผ้าพันแผลไคโตซานด้วยวิธีการขึ้นรูปแบบ casting โดยการเทสารละลายไคโตซานลงบนผ้าก๊อซชนิดทำจากใยเซลลูโลส เมื่อสารละลายไคโตซานแห้งจะได้เป็นแผ่นฟิล์มไคโตซานบนแผ่นและฟิล์มไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองคอมพอสิตที่มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นได้ โดยสามารถเพิ่มสมบัติต้านจุลินทรีย์ได้โดยการเคลือบสารต้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสมุนไพรมะนาว ซึ่งคาดว่าจะทำให้เกิดทางเลือกใหม่ในการใช้ผ้าพันแผล และแผ่นปิดแผลที่ทำจากวัสดุท้องถิ่นที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสูง ทดแทนการใช้แผ่นปิดแผลจากวัสดุสังเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

พัฒนาแผ่นปิดแผลที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ และมีสมบัติอื่น ๆ ใกล้เคียงกับแผ่นปิดแผลทางการค้า

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เตรียมแผ่นปิดแผลไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองโดยใช้เทคนิค casting ผสม chitosan oligomer ทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นคอมพอสิตที่เตรียมได้ ทดสอบประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์ของแผ่นคอมพอสิตที่เตรียมได้ และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลทางการค้าโดยตั้งเป้าประสงค์ไว้ว่าจะได้แผ่นปิดแผลที่มีประสิทธิภาพต้านจุลินทรีย์และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ได้ใกล้เคียงแผ่นปิดแผลทางการค้า

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ

ได้แผ่นปิดแผลที่มีฤทธิ์ป้องกันการติดเชื้อของแผลที่ประกอบอยู่บนผ้าพันแผลที่มีประสิทธิภาพต้านจุลินทรีย์และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ได้ใกล้เคียงกับแผ่นปิดแผลทางการค้า

1.5 กรอบแนวความคิดของการวิจัยและขั้นตอนการวิจัยในภาพรวม

แผ่นปิดแผลที่มีขายอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่ทำจากแผ่นพลาสติกใสประเภทพอลิยูรีเทน มีสมบัติให้ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์แพร่ผ่านได้ แต่ป้องกันไม่ให้น้ำซึมผ่าน อย่างไรก็ตามแผ่นปิดแผลสังเคราะห์ไม่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นข้อด้อยของแผ่นปิดแผลสังเคราะห์ แผ่นปิดแผลทำจากวัสดุชีวภาพ เช่น ไคโตซาน พบว่ามีสมบัติต้านจุลินทรีย์และช่วยทำให้แผลสมานตัวเร็วขึ้น เป็นแผ่นที่สามารถขึ้นรูปได้ง่าย นอกจากนี้ยังสามารถเติมสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติลงไปในแผ่นปิดแผลไคโตซานได้ เช่น น้ำมันหอมระเหยจากขิง ข่า ใบฝรั่ง และตะไคร้ เป็นต้น แต่ปัญหาของแผ่นปิดแผลไคโตซาน คือมีความแข็งแรงทนทานต่ำ มีรูปร่างไม่คงรูป เช่น บิดเบี้ยวทำให้ไม่สะดวกในการนำไปใช้งานจริง ดังนั้นในงานวิจัยนี้ เสนอแนวทางในการแก้ไขปัญหาคือข้อด้อยของไคโตซานโดยการเตรียมแผ่นปิดแผลไคโตซานเสริมแรงด้วยผ้าก๊อซพันแผล ซึ่งลักษณะของแผ่นปิดแผลที่พัฒนาขึ้นได้เป็นการรวมเอาผ้าพันแผลและแผ่นปิดแผลไว้ในวัสดุเดียวกัน ในรูปของแผ่นไคโตซาน/ผ้าก๊อซคอมพอสิต ซึ่งคาดว่าจะได้แผ่นปิดแผลไคโตซานที่ความแข็งแรงทนทาน ใช้งานง่าย โดยไม่จำเป็นต้องใช้ผ้าพันแผลพันห่ออีกรอบ และได้แผ่นปิดแผลที่มีประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยขอบเขตของการทดลองมีดังนี้ เตรียมแผ่นปิดแผลไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองโดยใช้เทคนิค casting ผสม chitosan oligomer ทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นคอมพอสิตที่เตรียมได้ ทดสอบประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์ของแผ่นคอมพอสิตที่เตรียมได้ และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลทางการค้า

1.6 แผนงานโครงการ

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัยแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

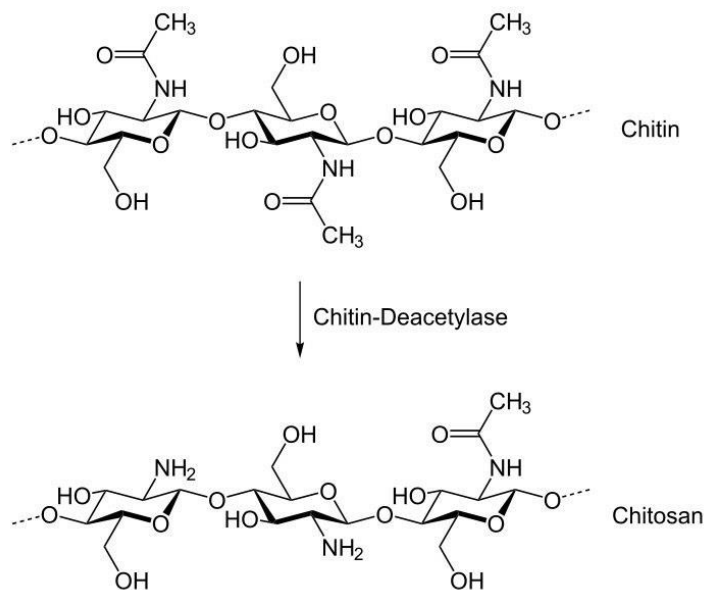
กิจกรรม	เดือนที่ 1 - 2	เดือนที่ 3 - 4	เดือนที่ 5 - 6	เดือนที่ 7 - 8	เดือนที่ 9 - 10	เดือนที่ 11 - 12
1. จัดหาอุปกรณ์และสารเคมี	-----					
2. 2.1 เตรียมแผ่นโคไคซาน/ผ้าก๊อชคอมพอสิต 2.2 เตรียมแผ่นโคไคซานบนอะคริลิกฐานรอง 2.3 เตรียมแผ่นโคไคซานบนอะคริลิกฐานรองที่มีการนำ chitosan oligomer มาใช้แทนสารสมุนไพรรองเนื่องจาก สารสมุนไพรมีความสามารถผสมเข้ากันได้กับโคไคซาน	-----	-----	-----	-----		
3. 3.1 ทดสอบสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลของ แผ่นโคไคซาน/ผ้าก๊อชคอมพอสิต 3.2 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของแผ่นโคไคซานบน อะคริลิกฐานรอง 3.3 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของแผ่นโคไคซานบน อะคริลิกฐานรองที่เติม chitosan oligomer	---	-----		-----		
4. 4.1 ทดสอบสมบัติด้านจุลินทรีย์ของแผ่นโคไคซานบน อะคริลิกฐานรอง 4.2 ทดสอบสมบัติด้านจุลินทรีย์ของแผ่นโคไคซานบน อะคริลิกฐานรองที่เติม chitosan oligomer			-----	-----		
5. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ของแผ่น โคไคซานบนอะคริลิกฐานรองและของแผ่นโคไคซานบน อะคริลิกฐานรองที่เติม chitosan oligomer				-----	-----	
6. 6.1 ประกอบแผ่นโคไคซานบนอะคริลิกฐานรองที่เติม chitosan oligomer กับผ้าพันแผลทางการค้า 6.2 ทดสอบการเกาะยึด และสมบัติเชิงกลของแผ่นโค ไคซานบนอะคริลิกฐานรองที่เติม chitosan oligomer ประกอบอยู่บนผ้าพันแผลทางการค้า				-----	-----	
7. ทดสอบฤทธิ์การสมานผิว (skin healing) ของแผ่นโคไค ซานบนอะคริลิกฐานรองที่เติม chitosan oligomer ประกอบอยู่บนผ้าพันแผลเปรียบเทียบกับแผ่นโคไคซาน ทางการค้า ด้วยวิธี Cell Migration Assay โดยไม่ใช้ สัตว์ทดลอง					-----	-----
8. สรุปลงและส่งรายงาน						-----

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไคโตซาน

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคติน ไคตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีคล้ายเซลลูโลส ที่ประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีคือ poly(β -(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) และมีมากเป็นอันดับสองรองลงมาจากเซลลูโลส เนื่องจากไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่พบได้ในธรรมชาติ เราจึงมักพบไคตินในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่อยู่ร่วมกับสารอื่นๆ ไคโตซานจะได้จากปฏิกิริยาการกำจัดส่วนที่เรียกว่า หมู่อะเซทิล (acetyl group) ของไคตินออกไปเรียกว่า ปฏิกิริยาดีอะเซทิลเลชัน (Deacetylation) ของไคตินในสารละลายต่างเข้มข้นทำให้โครงสร้างทางเคมีของไคตินเปลี่ยนไป โดยเอ็นอะเซทิลดีกลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) กลายเป็น ดีกลูโคซามีน (D-glucosamine) คือ หมู่อะเซทามิโด (-NHCOCH₃) เปลี่ยนเป็น หมู่อะมิโน (-NH₂) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างเคมีของไคตินและไคโตซาน

ตั้งนั้นชื่อทางเคมีของไคโตซานคือ poly(β -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose) ไคโตซานสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นเอวีเอได้ง่าย โดยวิธีการหล่อแบบ (casting) สามารถละลายในสารละลายกรดอินทรีย์เช่นกรดแอซิติค กรดฟอร์มิก กรดซिटริก เป็นต้น เมื่อนำสารละลายไคโตซานไปเทลงแบบ ปล่อยให้แห้งเองตามธรรมชาติจะได้ฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองที่มีลักษณะเหลืองใส แต่สมบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองยังไม่ดีพอในการนำไปใช้งานโดยตรง อย่างไรก็ตามเราสามารถปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองได้หลากหลายวิธี ซึ่งวิธีที่นิยมมากที่สุดคือ การเตรียมแผ่นเอวีเอคอมพอสิต โดยใช้สารเสริมแรงต่างๆ

2.1.1 สมบัติยับยั้งแบคทีเรีย [1, 2]

โคโตซานและอนุพันธ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้โดยมีกลไกการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งจำแนกได้เป็น 2 กลไก คือ

1) เนื่องจากโคโตซานมีประจุบวกจึงไปจับกับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบเป็นส่วนใหญ่ เช่น เอ็น-อะเซทิล (N-acetyl) กรดมิวเรมิก (muramic acid) กรดเซียลิก (sialic acid) และกรดนิวรามินิก (neuraminic acid) ทำให้การส่งผ่านสารอาหารและเกลือแร่ต่างๆเปลี่ยนแปลงไปทำให้สมดุลเคมีของเซลล์แบคทีเรียเสียไป

2) โคโตซานไปจับกับสารโลหะทรานซิชัน ซึ่งมีผลต่อปฏิกิริยาภายในเซลล์ ทำให้การสังเคราะห์สารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียหยุดลง และป้องกันการเจริญของเซลล์โดยเข้าไปป้องกันการเปลี่ยนจาก DNA ไปเป็น RNA

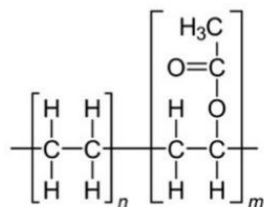
2.2 วัสดุฐานรอง (support materials)

เนื่องจากฟิล์มโคโตซานเปราะและไม่มีความยืดหยุ่น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำไปพลาสมิเนตบนวัสดุฐานรองสมบัติของวัสดุฐานรองที่ต้องการคือ มีความยืดหยุ่น ใส ดูดซึมน้ำได้ และมีความสามารถยึดเกาะติดกับฟิล์มโคโตซาน

วัสดุฐานรองที่ใช้มีหลายชนิดได้แก่

2.2.1 อีวีเอ (EVA, ethylene vinyl acetate)

อีวีเอ (EVA, ethylene vinyl acetate) มีสมบัติคล้ายยาง หรือกาว อีวีเอที่อยู่ในรูปอิมัลชัน (EVA emulsion) นิยมนำไปเคลือบผ้า ซึ่งในการทดลองนี้จะนำอีวีเออิมัลชันมาใช้เป็นแผ่นวัสดุฐานรองสำหรับฟิล์มโคโตซาน โครงสร้างของอีวีเอ และอีวีเออิมัลชันแสดงในรูปที่ 2.2



EVA structure

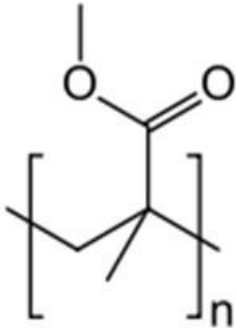


EVA emulsion

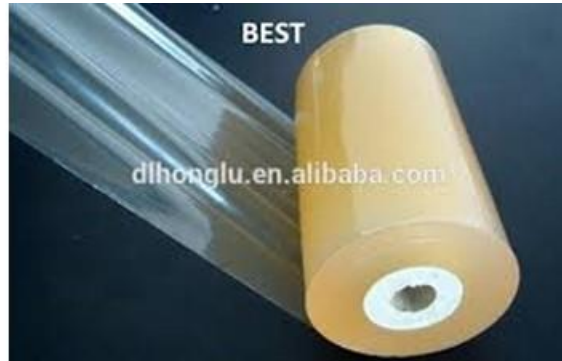
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของอีวีเอ (ซ้าย) และอีวีเออิมัลชัน (ขวา)

2.2.2 พีเอ็มเอ็มเอ (PMMA, polymethylmethacrylate)

ฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอ (PMMA, polymethylmethacrylate) พีเอ็มเอ็มเอซึ่งรู้จักอีกชื่อหนึ่งคือ อะคริลิก (acrylic) เป็นฟิล์มพลาสติกใสที่ไม่ยืดและไม่เหนอะหนะเหมือนอีวีเอ จึงมีความเหมาะสมในการนำมาเป็นวัสดุฐานรองให้กับฟิล์มโคโตนานได้ดีกว่าอีวีเอ โครงสร้างพีเอ็มเอ็มเอและฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอ แสดงในรูปที่ 2.3



PMMA structure



PMMA film

รูปที่ 2.3 โครงสร้างเคมีของพีเอ็มเอ็มเอ (ซ้าย) และฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอ (ขวา)

2.3 วัสดุปิดแผล (Wound dressing) [3, 4]

2.3.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวัสดุปิดแผล

ปัจจุบันได้มีการผลิตวัสดุในการดูแลบาดแผลออกมามากมายหลายชนิด โดยวัสดุปิดแผลต่างๆ มีการพัฒนา และเจริญก้าวหน้าขึ้นอย่างมาก ในปัจจุบันมีการผสมผสานตัวยาอนุพันธ์แร่ธาตุเงินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาวัสดุปิดแผลเพื่อให้เกิดคุณลักษณะในการसानแผล หรือเร่งบาดแผลให้หายเร็วขึ้นด้วย โดยวัสดุเหล่านี้มีทั้งประเภทที่สำหรับใช้ปิดบาดแผลชั่วคราวโดยเร่งให้บาดแผลหายเร็ว หรืออาจมีประเภทที่ปิดบาดแผลแบบถาวรเสริมสร้างการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ในกรณีนี้ ได้แก่ วัสดุทดแทนกระดูกต่างๆ ทำให้เราสามารถที่จะดูแลบาดแผลให้กับผู้ป่วยได้ในทุกๆ บาดแผล โดยวัสดุปิดแผลที่ดีควรมีลักษณะดังต่อไปนี้

- 1) สามารถดูดซึม และเก็บกักสารคัดหลั่ง (exudate) ที่ออกมาจากแผลได้
- 2) ไม่มีสารตกค้างอยู่ภายในแผล
- 3) น้ำสามารถซึมผ่านออกมาได้
- 4) เป็นฉนวนกันความร้อน
- 5) ไม่ทำให้เกิดการบาดเจ็บเมื่อทำการเปลี่ยนวัสดุทำแผล

- 6) ไม่ต้องเปลี่ยนวัสดุเปลี่ยนแผลบ่อย
- 7) ลดความเจ็บปวดให้ผู้ป่วย
- 8) ผู้ป่วยรู้สึกสบาย
- 9) ไม่ระคายเคืองผิวหนัง
- 10) กระตุ้นการหายของบาดแผล
- 11) ไม่แพง

2.3.2 ชนิดของวัสดุปิดแผลที่ใช้ในปัจจุบัน [5, 6]

วัสดุปิดแผลที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิดซึ่งควรเลือกใช้ให้เหมาะสมกับแผล เช่น

2.3.2.1 ผ้าก๊อซ

ผ้าก๊อซเป็นอุปกรณ์ทำแผลที่ใช้มาอย่างยาวนาน และใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วไป เนื่องจากมีราคาถูก ขั้นตอนการทำแผลง่าย ผู้ป่วยสามารถทำแผลได้ด้วยตนเอง และมีขายทั่วไป ซึ่งผ้าก๊อซที่ทำจากฝ้ายเป็นวัสดุปกป้องบาดแผลที่พบโดยทั่วไปในปัจจุบัน สำหรับปิดแผลขนาดเล็ก และมีสิ่งขับหลังเล็กน้อย ซึ่งสมบัติทั่วไปของผ้าก๊อซที่ทำจากฝ้ายก็คือสมบัติที่ได้จากฝ้าย

2.3.2.2 ผ้าตาข่าย

ผ้าตาข่ายเกิดจากการพัฒนามาจากผ้าก๊อซ ซึ่งสามารถลดความเจ็บปวดเวลาทำแผล เนื่องจากวัสดุทำแผลกลุ่มนี้ทำให้ติดแผลลดลง และยังสามารถให้สารคัดหลั่งซึมผ่านได้ด้วยโดยได้ทำการเคลือบสารต่างๆ ไปยังแผ่นเอวีเอตาข่าย ได้แก่ พาราฟิน (paraffin) วาสลีน (vaseline) ปีโตรเลียม (petroleum) วัสดุทำแผลกลุ่มนี้ผิวจะมีความมัน เวลาปิดแผลแล้วลอกออกมักทำให้ไม่ติดแผล บางชนิดมีการผสมยาฆ่าเชื้อ (antiseptics) ต่างๆ

2.3.2.3 फिल्म

ฟิล์มเป็นอุปกรณ์ทำแผลที่มีลักษณะเป็นแผ่นเอวีเอบางๆใส มักมีสารช่วยยึดติดที่สามารถติดกับผิวหนังรอบๆแผลได้ อากาศ และไอน้ำสามารถซึมผ่านได้ ป้องกันการปนเปื้อนของสิ่งแปลกปลอม และเชื้อโรค เนื่องจากตัวฟิล์มมีลักษณะเป็นแผ่นเอวีเอใสทำให้สามารถสังเกตดูแผลได้โดยไม่ต้องทำการเปิดแผล หรืออาจใช้ปิดแผลร่วมกับอุปกรณ์ทำแผลชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่ใช้ปิดแผลบริเวณข้อต่อ และมือ เพราะมีสมบัติในการยืดหยุ่นได้

2.3.2.4 ไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) และไฮโดรเจล (hydrogel)

ไฮโดรคอลลอยด์ และไฮโดรเจลดูดน้ำได้ดีกว่าฟิล์ม

2.3.2.5 อัลจิเนต (alginates)

อัลจิเนตมีสมบัติทำให้เลือดหยุดไหล

2.3.2.6 ไฮโดรไฟเบอร์ (hydrofiber)

ไฮโดรไฟเบอร์ดูดซับบาดแผลได้ดีกว่าอัลจินต

2.3.2.7 โฟม (foam)

โฟมเป็นแผ่นเอวี่เปิดแผลที่ดูดซับบาดแผลได้ และเหมาะสำหรับแผลกดทับ

ในปัจจุบันยังคงได้มีการศึกษาค้นคว้าในเรื่องของการดูแลบาดแผลอย่างต่อเนื่อง และที่มีการพัฒนาเทคโนโลยีอย่างก้าวหน้า และรวดเร็ว เพื่อให้ทุกคนสามารถเข้าถึงการรักษา และได้รับการดูแลบาดแผลที่เหมาะสมที่สุดต่อไป

2.4 งานวิจัยที่แสดงประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยในการต้านจุลินทรีย์

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น ข่า ขิง ขมิ้น ไพล กระจ่าง ร่วงหอม มะขามป้อม ใบโหระพา ดอกจำปี มะกรูด ตะไคร้ ใบฝรั่ง ซึ่งมีสรรพคุณทางยาที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ด้านการอักเสบของผิวหนัง สมานแผล ลดการเป็นหนองและการติดเชื้อ ช่วยการผ่อนคลาย และไล่แมลง [7-9] สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จึงเหมาะที่จะนำมาทดแทนการใช้โลหะและสารสังเคราะห์ที่อาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นพิษต่อผู้บริโภคทั้งจากกระบวนการผลิตและการกำจัดหลังจากการใช้งานแล้ว

ในปี ค.ศ. 2006 Oonmetta-aree, J. และคณะ [7] ได้ศึกษาสารสกัดจากพืชในตระกูล *Zingiberaceae* คือ ข่า ขิง ขมิ้น และกระจ่าง ที่สกัดด้วยเอทานอลเพื่อนำมาใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* พบว่าสารสกัดจากข่ามีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากขิง ขมิ้น และกระจ่าง โดยความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ขึ้นกับเวลาที่ทั้งสารสกัดไว้และความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์

ในปี ค.ศ. 2007 Khantha, B. และคณะ [8] ได้ศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในตระกูล *Zingiberaceae* 5 ชนิดได้แก่ ขิง ข่า ขมิ้นชัน กระจ่าง และร่วงหอมที่สกัดด้วยวิธีต้มกลั่น (hydrodistillation) และสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล และปิโตรเลียมอีเธอร์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยข่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา และการงอกของสปอร์ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยของพืชอีก 4 ชนิด

ในปี ค.ศ. 2007 Khewkhom, N. และคณะ [10] ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Botrytis cinerea* ของสารสกัดจากข่า (*Alpinia galangal*) กานพลู (*Syzygium aromaticum*)

อออลสไปซ์ (*Pimenta dioica*) และอบเชย (*Cinnamomum zeylanicum*) พบว่าส่วนเหง้าของข่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา

ในปี ค.ศ. 2004 นพัต จันทรวิสูตร และ เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ [11] ได้ศึกษาประสิทธิภาพของข่าในการยืดอายุการเก็บรักษาของเค้ก พบว่าข่าสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเค้กได้เป็นอย่างดีด้วยการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยที่เค้กที่มีส่วนผสมของผงข่าในปริมาณที่มากขึ้นจะมีอายุการเก็บรักษานานขึ้นตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2007 Mayachiew, P. และ Devahastin, S. [12] ได้ศึกษาการต้านจุลินทรีย์และการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดมะขามป้อมและข่า โดยการสกัดสารจากมะขามป้อมและข่าด้วยเอทานอลร้อยละ 95 แล้ววิเคราะห์ส่วนประกอบหลักของสารสกัดข่าและมะขามป้อมด้วยเทคนิค GC-MS และเทคนิค UV-HPLC ตามลำดับ พบว่าส่วนประกอบหลักของสารสกัดข่า คือ 1,8-cineole, β -bisabolene, caryophyllene และ β -selinene ส่วนประกอบหลักของสารสกัดมะขามป้อม คือ สารประกอบ phenolic เป็นจำนวนมากจากการทดสอบความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดข่ามีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ *S. aureus* มากกว่าสารสกัดมะขามป้อม เนื่องจากในสารสกัดข่ามี 1,8-cineole ซึ่งจะไปหยุดยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบหลัก จากการทดสอบความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชัน พบว่าสารสกัดมะขามป้อมมีการต้านการเกิดออกซิเดชันมากกว่าสารสกัดข่า เนื่องจากในสารสกัดมะขามป้อมมีสารประกอบ phenolic ซึ่งสามารถต้านการเกิดออกซิเดชันเป็นองค์ประกอบหลัก

ในปี ค.ศ. 1999 Lutterrodt G.D. และคณะ [13] ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ *S. aureus* ด้วยสารสกัดจากใบฝรั่งที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดจากใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 1-20 มก./มล. สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดี

2.5 ข้อมูลจากผู้ผลิตวัสดุปิดแผลในประเทศ [14 – 15]

คณะวิจัยได้มีโอกาสเข้าพบและพูดคุยกับคุณพีระวัฒน์ ทองคำ Senior Business Development Manager และคุณสมพงษ์ บริษัท โนวาเทค เฮลท์แคร์ จำกัด ซึ่งเป็นผู้ผลิตวัสดุปิดแผลในประเทศ เพื่อปรึกษาเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในความร่วมมือนำผลงานวิจัยของโครงการไปสู่การผลิตและการนำไปใช้จริง จากการพูดคุยในครั้งนี้ทำให้คณะวิจัยได้ข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์สำหรับพัฒนาวัสดุปิดแผลดังนี้คือ

1) วัสดุปิดแผลนับเป็นเครื่องมือแพทย์ที่ไม่ใช่เครื่องมือแพทย์สำหรับการวินิจฉัยภายนอกร่างกายตามความเสี่ยง ดังนั้น หากผู้ผลิตต้องการนำเครื่องมือแพทย์ออกสู่ตลาดอาเซียน ผู้ผลิตต้องดำเนินการให้สอดคล้องตามกฎหมายความตกลงของอาเซียนว่าด้วยข้อบังคับเครื่องมือแพทย์ (ASEAN Agreement on Medical

Device: AMDD) ซึ่งเป็นความตกลงที่กำหนดกรอบกฎหมายในการควบคุมกำกับดูแลเครื่องมือแพทย์ของประเทศสมาชิกอาเซียน เพื่อให้เครื่องมือแพทย์ที่จะวางจำหน่ายในภาคพื้นอาเซียนมีคุณภาพและความปลอดภัย

2) เช่นเดียวกัน หากผู้ผลิตต้องการเครื่องมือแพทย์ออกสู่ตลาดยุโรป ผู้ผลิตต้องดำเนินการให้สอดคล้องตามมาตรฐาน CE Marking ซึ่งเป็นกฎหมายแสดงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ โดยจัดทำเอกสารด้านเทคนิคตามข้อกำหนดและยื่นขึ้นทะเบียนตามแนวทาง

3) ผู้ผลิตต้องมีการจัดทำและการขึ้นทะเบียนเอกสารผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพ และความปลอดภัยผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ (Common Submission Dossier Template: CSDT)

4) การจัดทำ CSDT ของวัสดุปิดแผลต้องมีการจัดประเภทเครื่องมือแพทย์ที่ไม่ใช่เครื่องมือแพทย์สำหรับการวินิจฉัยภายนอกร่างกายตามความเสี่ยงพิจารณาจากปัจจัยที่มีผลต่อความเสี่ยง เช่น ระดับการรุกร้าเข้าสู่ร่างกาย ระยะเวลาที่อยู่ในร่างกาย ลักษณะการใช้งาน ผลทางชีวภาพ (biological effect) โดยเครื่องมือแพทย์ทั้งหมดที่ไม่ได้รุกร้าเข้าไปในร่างกาย ซึ่งสัมผัสกับผิวหนังที่มีบาดแผล (Non-Invasive Medical devices) มีหลักเกณฑ์ดังนี้

- **หลักเกณฑ์ที่ 1** เครื่องมือแพทย์ทั้งหมดที่ไม่ได้รุกร้าเข้าไปในร่างกาย ซึ่งสัมผัสกับผิวหนังที่มีบาดแผล

หากมุ่งหมายเพื่อใช้ปิดบาดแผล (mechanical barrier) โดยกีดทับหรือดูดซับของเหลวที่ไหลซึมออกจากบาดแผลเท่านั้น ตัวอย่างเช่น เครื่องมือแพทย์ที่ใช้ในการรักษาบาดแผลแบบปฐมภูมิ (primary intent) จัดเป็นเครื่องมือแพทย์ประเภทที่ 1 ตัวอย่างเช่น วัสดุปิดแผลแบบง่าย (simple wound dressings) cotton wool, absorbent pads, wound strips, adhesive bandages (sticking plasters, band-aid) และ วัสดุปิดแผลชนิดผ้าก๊อช (gauze dressings) ซึ่งทำหน้าที่เป็น barrier ทำให้บาดแผลอยู่กับที่ หรือดูดซับสารคัดหลั่ง (exudate) ที่ออกมาจากแผลได้

หากมุ่งหมายเพื่อใช้กับบาดแผลที่มีการฉีกขาดถึงชั้นหนังแท้ รวมถึงเครื่องมือแพทย์ที่มุ่งหมายสำหรับการจัดการสภาพแวดล้อมจุลภาค (microenvironment) ของบาดแผล จัดเป็นเครื่องมือแพทย์ประเภทที่ 2 ตัวอย่างเช่น วัสดุปิดแผลชนิดผ้าก๊อชที่ไม่ได้ใส่ตัวยาใดๆ (non-medicated impregnated gauze dressings) วัสดุปิดแผลชนิดฟิล์มและไฮโดรเจล (polymer film dressing และ hydrogel dressing)

หากมุ่งหมายเพื่อใช้กับบาดแผลที่มีการฉีกขาดถึงชั้นหนังแท้ และสามารถรักษาบาดแผลแบบทุติยภูมิเท่านั้น (secondary intent) จัดเป็นเครื่องมือแพทย์ประเภทที่ 3 ตัวอย่างเช่น วัสดุปิดแผลที่มีการใส่ยา

หรือสารที่มีฤทธิ์ในการรักษาบาดแผล (จากการพูดคุยกับ บริษัท โนวาเทค เฮลธ์แคร์ จำกัด ได้ข้อมูลว่าการนำสมุนไพรหรือสารสกัดสมุนไพรใส่เข้าไปในวัสดุปิดแผลนั้นทำให้วัสดุปิดแผลจัดอยู่ในประเภทที่ 3 ซึ่งจะส่งผลให้ต้องมีการทดสอบที่มีค่าใช้จ่ายในการทดสอบแพงมาก และต้องส่งทดสอบต่างประเทศ นอกจากนี้วัสดุปิดแผลที่มีการใส่สารสมุนไพรยังไม่สามารถวางขายได้ในประเทศแถบสหภาพยุโรปอีกด้วย ด้วยเหตุนี้การใช้สมุนไพรเพื่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุปิดแผลจึงเป็นอุปสรรคหนึ่งที่ทำให้ผู้ผลิตลังเลที่จะนำผลงานวิจัยดังกล่าวไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยในช่วง 2 เดือนแรก คณะวิจัยได้ทำการเตรียมฟิล์มไคโตซานบนผ้าก๊อซที่ใช้เป็นวัสดุฐานรอง ทดสอบลักษณะทางกายภาพ สมบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตซานบนผ้าก๊อซ พบว่าฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อซที่เตรียมได้มีสมบัติดูดซึมน้ำได้ดี แต่ยังมีลักษณะทางกายภาพที่แข็งกระด้าง ไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นแผ่นปิดแผล ดังนั้นในการดำเนินวิจัยเดือนที่ 3 ถึงเดือนที่ 6 คณะวิจัยจึงต้องปรับปรุงให้แผ่นฟิล์มมีความอ่อนนุ่มไม่แข็งกระด้างเพื่อให้ได้แผ่นปิดแผลที่มีความยืดหยุ่น ดูดซึมน้ำได้ดี มีความน่าสนใจในการนำไปทำเป็นแผ่นปิดแผลต่อไป

งานวิจัยในช่วงเดือนที่ 3 ถึงเดือนที่ 6 คณะวิจัยได้ยกเลิกการนำผ้าก๊อซมาใช้เป็นวัสดุฐานรองสำหรับแผ่นไคโตซาน แต่ได้นำแผ่นพอลิเมอร์มาใช้เป็นฐานรองวัสดุแทน พอลิเมอร์ที่เลือกมาใช้คืออีวีเอที่มีความเป็นผลึกต่ำ โดยทำการเตรียมฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง จากนั้นทดสอบการยึดเกาะของฟิล์มไคโตซานบนวัสดุฐานรอง ตรวจสอบลักษณะความยืดหยุ่น ความสามารถในการดูดซึมน้ำของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง ตลอดจนความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

งานวิจัยในช่วงเดือนที่ 7 ถึงเดือนที่ 15 (รวมขยายเวลา 3 เดือน) คณะวิจัยได้เตรียมวัสดุฐานรองขึ้นมาใช้เอง โดยการสังเคราะห์ PMMA emulsion ทดแทนแผ่นอีวีเอพอลิเมอร์ทางการค้า เนื่องจากพอลิเมอร์ทางการค้ามีความเหนียวเหนอะหนะ และติดกัน ดังนั้นจึงได้เตรียมวัสดุฐานรองขึ้นมาใช้เอง และทำการเตรียมฟิล์มไคโตซานบน PMMA ที่ใช้เป็นวัสดุฐานรอง แล้วนำฟิล์มไคโตซาน/PMMA ไปลามิเนตบนผ้าก๊อซ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทดสอบความพิชต่อเซลล์มาตรฐาน L929 (fibroblast ของหนู) และต่อ เซลล์ ATCC CRL2522 (fibroblast ของผิวหนังมนุษย์ที่เตรียมจากผิวหนังส่วนหน้าผาก)

3.1 วัสดุและสารเคมี

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุและสารเคมี	เกรดและบริษัทที่ผลิต
ไคโตซาน (chitosan)	เกรดอุตสาหกรรม น้ำหนักโมเลกุลสูง ค่า degree of deacetylation 90-95% จากบริษัท Aquatic Nutrition Lab จำกัด
EVA emulsion	Binder T ความเข้มข้น 50 wt% จากบริษัท สตาร์ เทค เคมีคอล อินดัสเตรียล จำกัด แขวงบางด้วน ภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร

กรดแอสีติก (acetic acid, CH ₃ COOH)	เกรด AR จากบริษัท QR&C ประเทศนิวซีแลนด์
Polymethyl methacrylate emulsion (PMMA)	สังเคราะห์ขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ



3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ทดลอง

- 1) แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
- 2) เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก (Hot plate and Magnetic stirrer) พร้อมเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller) ของบริษัท IKA รุ่น UNB 400
- 3) กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 4) ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 5) หลอดหยดสาร (Dropper)
- 6) ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- 7) ตู้อบ (Hot air oven)
- 8) แม่แบบขึ้นรูปกระดาษ (6 x 6 x 0.5 นิ้ว)
- 9) เครื่องชั่งสารทศนิยมสี่ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 10) เครื่องกรองน้ำ (Water purifier)
- 11) กรวยกรองบุชเนอร์เซรามิค (Buchner funnel)
- 12) ขวดกรองสาร (Buchner flask)
- 13) กระดาษกรอง (Filter papers)
- 14) สายยางซิลิโคน (Silicone tube)
- 15) แหวนรองกรวย (Ring support)
- 16) ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)

3.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์และทดสอบ

- 1) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) JSM 5410 LV/ JEOL., Ltd./ญี่ปุ่น
- 2) ชุดอุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบการดูดซึมน้ำ
- 3) ชุดอุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย
- 4) ชุดอุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบการต้านแบคทีเรีย
- 5) ชุดอุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มโคโตนบนผ้าฝ้ายก๊อช

เตรียมแผ่นฟิล์มโคโตนบนผ้าฝ้ายก๊อช โดยวิธีการเทแบบ (casting) ดังนี้ เตรียมสารละลายโคโตนโดยละลายโคโตนเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลายกรดแอสติกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร จากนั้นนำสารละลายโคโตนที่เตรียมได้ไปเทลงบนผ้าฝ้ายก๊อชให้ทั่ว แล้วปล่อยให้แห้งในที่อุณหภูมิห้องได้แผ่นฟิล์มโคโตนบนผ้าฝ้ายก๊อช

3.4.2 การเตรียมฟิล์มโคโตนบนแผ่นอีวีเอฐานรองและฟิล์มโคโตนบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง

เตรียมแผ่นอีวีเอฐานรองและฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรองโดยชั่ง EVA emulsion (Binder T) 10 กรัม หรือ PMMA emulsion 10 กรัม เทลงในแม่แบบขึ้นรูปกระจกแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน จะได้แผ่นอีวีเอใสมีความยืดหยุ่นตัวดีแต่เหนียวเหนอะหนะ ส่วนในกรณีของฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอจะมีลักษณะใส พังงอได้ หลังจากนั้นเทสารละลายโคโตนที่เตรียมไว้ที่น้ำหนักต่างๆ ตามตารางที่ 3.2 (สารละลายโคโตนเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อ 1000 มิลลิลิตร สารละลายกรดแอสติกความเข้มข้น 1 % (v/v) ทิ้งไว้เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้ฟิล์มแห้ง

ตารางที่ 3.2 สูตรที่ใช้เตรียมฟิล์มโคโตนบนแผ่นอีวีเอฐานรองและฟิล์มโคโตนบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง

สูตร	EVA emulsion (กรัม)	สารละลายโคโตน 1 wt% (กรัม)
1	10	5
2	10	10
3	10	15
สูตร	PMMA emulsion (กรัม)	สารละลายโคโตน 1 wt% (กรัม)
4	10	5
5	10	10
6	10	15

3.4.3 การวิเคราะห์และทดสอบสมบัติของฟิล์มโคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช ฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอ ฐานรองและฟิล์มโคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง

3.4.3.1 การทดสอบการดูดซึมน้ำ (Water absorption)

การดูดซึมน้ำของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง วิเคราะห์โดยการตัดตัวอย่างให้มีขนาด 25×75 มิลลิเมตร นำฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองไปอบในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน เดซิเคเตอร์ (desiccator) แล้วชั่งน้ำหนักและบันทึกผล จากนั้นนำฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองซับน้ำพอหมาด แล้วทำการชั่งน้ำหนัก นำผลไปคำนวณหาค่าร้อยละการดูดซึมน้ำ แสดงความสัมพันธ์ของน้ำหนักน้ำที่ดูดซึมกับน้ำหนักชิ้นทดสอบแห้ง คำนวณร้อยละการดูดซึมน้ำได้ดังสมการที่ 3.1

$$\text{การดูดซึมน้ำ (ร้อยละ)} = \frac{(W_w - W_d)}{W_d} \times 100 \quad (3.1)$$

เมื่อ W_w = น้ำหนักชิ้นทดสอบเปียก (กรัม)

W_d = น้ำหนักชิ้นทดสอบแห้ง (กรัม)

3.4.3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองด้วยวิธี agar diffusion

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองมีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียมฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวน 3 ตัวอย่าง/สูตร
- 2) นำเชื้อ *Staphylococcus aureus* เจือจางด้วย 0.85% น้ำเกลือโดยให้เชื้อที่ความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml
- 3) เกลี่ย (spread) 0.1ml ของสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ลงบน LB agar
- 4) วางแผ่นอีวีเอตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงบน LB agar โดยฟิล์ม 1 แผ่นอีวีเอต่อ 1 LB agar plate โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 5) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.4.3.3 การทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองตามมาตรฐาน AATCC 100

การทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอและฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองตามมาตรฐาน AATCC 100-2004 มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้คือ เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในหลอดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (nutrient broth) ทำการเลี้ยงเชื่อนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งแบคทีเรียมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ประมาณ 10^9 ถึง 10^{11} CFU/ml และขึ้นตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 ชุด คือ ชุด A และชุด B

ชุด A

1) ตัดผ้าตัวอย่างให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปผ่านการอบแสงอัลตราไวโอเล็ตเพื่อทำการฆ่าเชื้อ

2) นำผ้าตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในขวดที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และนำมาล้างทันทีด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาณปริมาณ 100 มิลลิลิตร นำขวดดังกล่าวไปเขย่านาน 1 นาที

3) ดูดสารละลายที่ผสมได้ ใส่หลอดทดลองปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาณ ในอัตราส่วน $1/10^3$, $1/10^4$ และ $1/10^5$ ตามลำดับ เพื่อทำการเจือจางเชื้อ

4) ดูดสารละลายเจือจางที่เหมาะสมปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นหยดสารละลายเจือจางลงในจานเพาะเชื้อ (Plate) ที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (nutrient agar) ไว้โดยใช้แท่งแก้วรูปตัววาย (Y-loop) เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียให้ทั่วจานเพาะเชื้อจำนวน 3 จาน

5) นับจำนวนโคโลนี (Colony) ในจานเพาะเชื้อ ที่ผ่านการบ่มเพาะเชื่อนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ซึ่งมีหน่วยเป็น CFU (Colony forming unit) ต่อมิลลิลิตร

ชุด B

1) ตัดผ้าตัวอย่างให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปผ่านการอบแสงอัลตราไวโอเล็ตเพื่อทำการฆ่าเชื้อ

2) นำผ้าตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในขวดที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 หรือ 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาณ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร นำขวดดังกล่าวไปเขย่านาน 1 นาที

3) ดำเนินการทดสอบตามขั้นตอนที่ 3 ถึงขั้นตอนที่ 5 ของชุด A เปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียระหว่างชุด A ที่ล้างทันที กับ ชุด B ที่ทิ้งให้เชื้อสัมผัสผิวนาน 24 หรือ 48 ชั่วโมง แล้วนำจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ลดลงมาคำนวณเป็นร้อยละ (% Reduction, %R) ดังสมการที่ 3.2

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

A หมายถึง จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่นับได้จากชิ้นตัวอย่างที่นำมาทดสอบ โดยผ่านการบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 0 ชั่วโมง

B หมายถึง จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่นับได้จากชิ้นตัวอย่างที่นำมาทดสอบ โดยผ่านการบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4.3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity) ด้วยเทคนิค MTT assay

ก. เซลล์มาตรฐาน L929 (fibroblast ของหนู)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของฟิล์มโคโตนบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อช ด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน L929 มีขั้นตอนดังนี้

- 1) ทำการเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน L929 ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 คืน
- 2) นำชิ้นตัวอย่างลงในจานเลี้ยงเซลล์แล้วนำเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 1, 2, 3, และ 4 วัน
- 3) ทำการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ดังนี้
 - เติมนสารละลาย MTT 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ใน CO₂ incubator
 - เติมนสารละลาย purple formazan เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดในเครื่องอ่านไมโครเพลตที่ 540 นาโนเมตร
- 4) คำนวณ จำนวนเซลล์รอดชีวิต (%) ดังสมการที่ 3.3

$$\text{จำนวนเซลล์รอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารที่ต้องการทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ควบคุม}} \times 100 \quad (3.3)$$

ข. เซลล์มาตรฐาน ATCC CRL2522 (fibroblast ของผิวหนังมนุษย์ที่เตรียมจากผิวหนังส่วนหน้าผาก)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน ATCC CRL2522 ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างฟิล์มโคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่لامิเนตบนผ้าก๊อชเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลทางการค้า มีขั้นตอนดังนี้

- 1) วางชิ้นงานทดสอบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 12 หลุม
- 2) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (ที่มี Fetal bovine serum 10% และยาปฏิชีวนะ 1% โดยปริมาตร) 2 มิลลิลิตร นำไป บ่มในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส, 5% CO₂, ความชื้นสัมพัทธ์ 95±5% เป็นเวลา 1 คืน
- 3) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมสารละลายเซลล์ CRL2522 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1 × 10⁵ cells ลงบนชิ้นงาน และ ชูดควบคุม ได้แก่
 - ภาชนะเลี้ยงเซลล์แต่ปราศจากตัวอย่างที่ทดสอบจะใช้เป็นชุดควบคุม reagent control
 - วัสดุ Thermanox (Nunc) cover slips จะใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control material 1)
 - วัสดุฟิล์มพอลิยูรีเทนที่มี 0.1% Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC): RM-A' จะใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control material 2)
- 4) นำไปบ่มในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส, 5% CO₂, ความชื้นสัมพัทธ์ 95±5% เป็นเวลา 1, 7 และ 14 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงทุกๆ 3 วัน
- 5) เมื่อครบระยะเวลาที่ต้องการทดสอบ นำไปย้อมสี โดยการเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethyl thiosol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส, 5% CO₂, เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 6) จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออกให้หมด แล้วเติม DMSO ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อให้ละลายผลึก formazan ให้อยู่ในรูปของสารละลาย
- 7) จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปใส่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณจำนวนเซลล์รอดชีวิต (%) ดังสมการที่ 3.4

$$\text{จำนวนเซลล์รอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารที่ต้องการทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ควบคุม}} \times 100 \quad (3.4)$$

บทที่ 4

ผลการทดลองและ วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางกายภาพของฟิล์ม

4.1.1 ลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช

ภาพถ่ายของฟิล์มไคโตซานกับแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชแสดงดังรูปที่ 4.1 จากรูปแสดงให้เห็นว่าฟิล์มไคโตซานมีลักษณะหดรัดตัว บิดงอตัวไม่เป็นแผ่น เนื่องจากเกิดการหดตัวของตัวในระหว่างกระบวนการทำให้แห้ง ดังนั้นการนำฟิล์มไคโตซานไปใช้โดยตรงจึงค่อนข้างไม่สะดวก เพื่อให้ฟิล์มมีความคงรูปไม่บิดงอ จึงได้ทำการเตรียมแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช ลักษณะแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชที่ได้มีลักษณะคงรูปเป็นแผ่นมากขึ้น มีความงอเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าผ้าก๊อชช่วยปรับปรุงความสามารถในการคงรูปร่างและป้องกันการหดตัวและงอตัวของฟิล์มไคโตซานระหว่างกระบวนการทำให้แห้ง ซึ่งตรงกันข้ามกับฟิล์มไคโตซานที่ฟิล์มหดตัวและงอตัวเนื่องจากการระเหยออกของน้ำ อย่างไรก็ตามแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช ยังมีลักษณะผิวสัมผัสแข็งกระด้าง ไม่มีความยืดหยุ่น โค้งงอไม่ได้ อันเนื่องมาจากไคโตซานดูดซึมเข้าไปในผิวเส้นใยฝ้าย และห่อหุ้มเส้นใยฝ้ายไว้ ทำให้เส้นใยฝ้ายไม่มีอิสระในการเคลื่อนไหว เป็นผลทำให้แผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชดังกล่าวมีความแข็งกระด้าง ไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นแผ่นปิดแผล



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซาน และฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะทางกายภาพของผ้าฝ้ายก๊อช ฟิล์มไคโตซาน และแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชภายหลังผ่านการดูดซึมน้ำ



รูปที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพของผ้าฝ้ายก๊อช ฟิล์มไคโตซาน และฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช ภายหลังผ่านการดูดซึมน้ำ

ดังนั้นในการดำเนินวิจัยต่อไป คณะวิจัยได้ยกเลิกการนำผ้าก๊อชมาใช้เป็นวัสดุฐานรองสำหรับแผ่นไคโตซาน แต่ได้นำแผ่นพอลิเมอร์มาใช้เป็นฐานรองวัสดุแทนผ้าก๊อช พอลิเมอร์ที่เลือกมาใช้คืออีวีเอที่มีความเป็นผลึกต่ำ โดยทำการเตรียมฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง

4.1.2 ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง

ภาพถ่ายของฟิล์มไคโตซานอิสระกับฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองแสดงดังรูปที่ 4.3 จากรูปแสดงให้เห็นว่าฟิล์มไคโตซานอิสระมีลักษณะหดตัว บิดงอตัวไม่เป็นแผ่น เนื่องจากเกิดการหดตัวของตัวในระหว่างกระบวนการทำให้แห้ง ดังนั้นการนำฟิล์มไคโตซานอิสระไปใช้โดยตรงจึงค่อนข้างไม่สะดวก เพื่อให้ฟิล์มไคโตซานมีความคงรูป ไม่บิดงอ ไม่แตกหักหรือฉีกขาด จึงได้ทำการเตรียมฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง ลักษณะของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองที่ได้มีความคงรูป มีความยืดหยุ่นตัวสูง สามารถพับ หรือบิดงอได้โดยไม่เกิดการแตกหัก แสดงให้เห็นว่าอีวีเอฐานรองช่วยปรับปรุงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และป้องกันการเสียรูปร่างของฟิล์มไคโตซานได้ ซึ่งตรงกันข้ามกับฟิล์มไคโตซานที่ไม่มีวัสดุฐานรองจะหดตัวแตกหัก และละลายเมื่อสัมผัสกับน้ำ ฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง มีลักษณะผิวสัมผัสอ่อนนุ่ม มีความยืดหยุ่นตัวสูง โค้งงอไปมาได้ แต่มีความเหนียวเหนอะหนะ และมีลักษณะเป็นแผ่น เมื่อนำไปปาลามิเนตหรือประกบติดกับผ้าก๊อชจะแข็ง พับงอตัวได้ แผ่นจะติดกลับมาเหมือนเดิมทำให้แผ่นอีวีเอฐานรองจะไม่เกาะติดบนผิวหนังหากนำมาใช้เป็นแผ่นปิดแผล

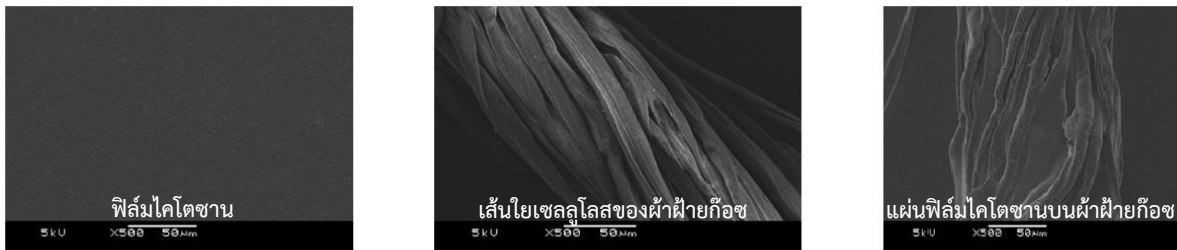


รูปที่ 4.3 ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง

4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของฟิล์ม

4.2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช

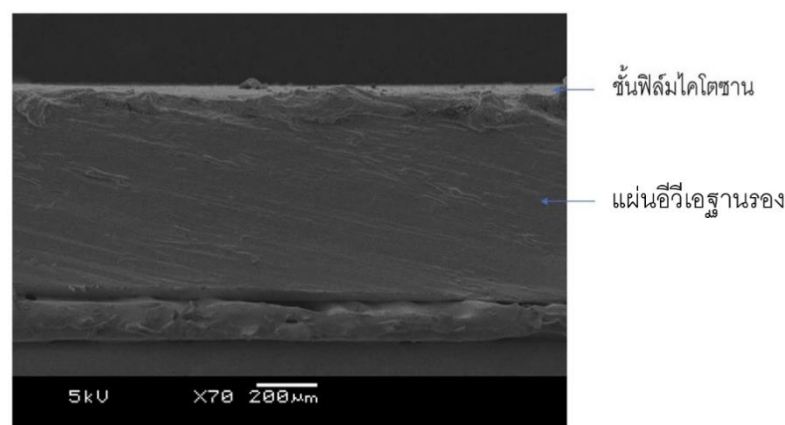
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผิวของฟิล์มไคโตซาน เส้นใยเซลลูโลสของผ้าฝ้ายก๊อช และแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช ด้วยเทคนิค SEM แสดงดังรูปที่ 4.4 จากภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ผิว พบว่าบริเวณผิวของฟิล์มไคโตซานมีลักษณะเรียบ และผิวของเส้นใยเซลลูโลสของผ้าฝ้ายก๊อชเห็นเป็นเส้นเรียงกันเป็นเส้นๆ ระหว่างเส้นใยมีช่องว่างระหว่างกัน เมื่อนำผ้าก๊อชมาเป็นวัสดุฐานรองพบว่าเส้นใยฝ้ายถูกเคลือบด้วยเมทริกซ์ไคโตซาน เส้นใยถูกตรึงด้วยฟิล์มไคโตซาน ผลที่ได้คือแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าก๊อช มีความแข็งแรงต่าง ไม่เหมาะสมที่จะนำมาทำเป็นแผ่นปิดแผล



รูปที่ 4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของฟิล์มไคโตซาน เส้นใยเซลลูโลสของผ้าก๊อช และ ฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชด้วยเทคนิค SEM

4.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง

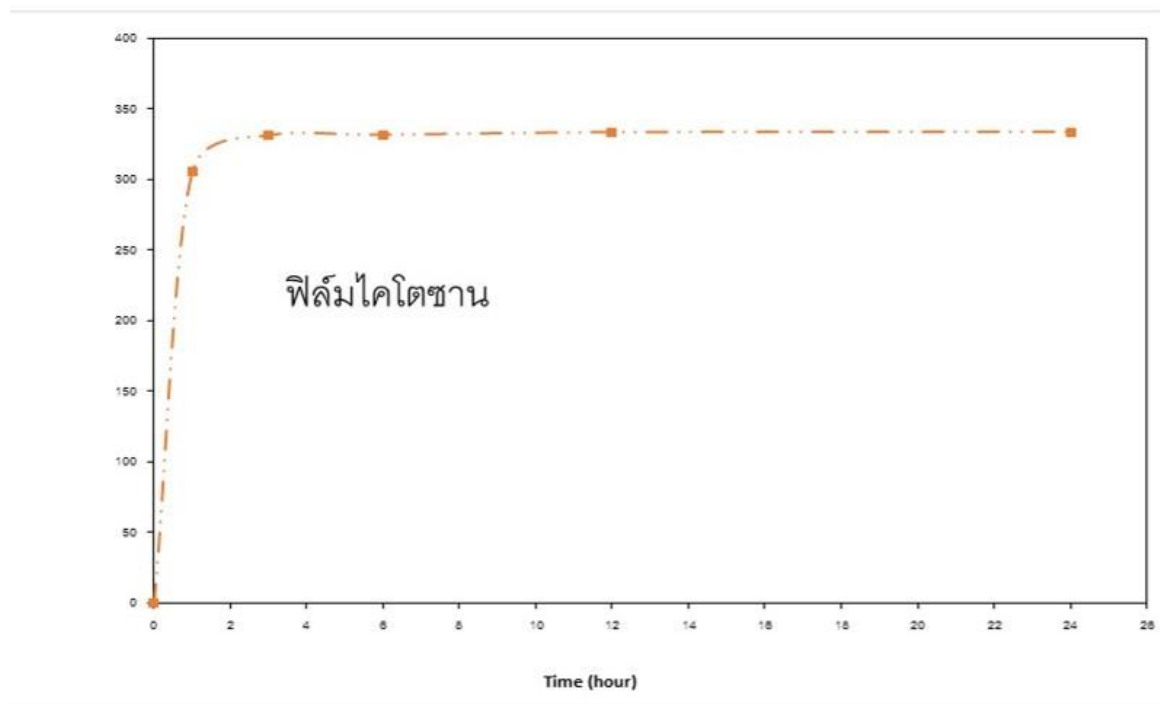
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผิวของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง ด้วยเทคนิค SEM ดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าบริเวณผิวของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอและผิวของแผ่นอีวีเอฐานรองเกาะติดกันได้ดี แสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีความสามารถเคลือบติดลงบนแผ่นอีวีเอพอลิเมอร์ได้โดยอาศัยแรงยึดติดทางกายภาพ เช่น พันธะไฮโดรเจน และ แรงแวนเดอร์วาลส์ แม้ฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอจะเกิดการบวมน้ำ แต่ก็ยังสามารถยึดเกาะบนแผ่นอีวีเอฐานรองได้เป็นอย่างดี ดังนั้นฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองจะมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นแผ่นปิดแผลได้



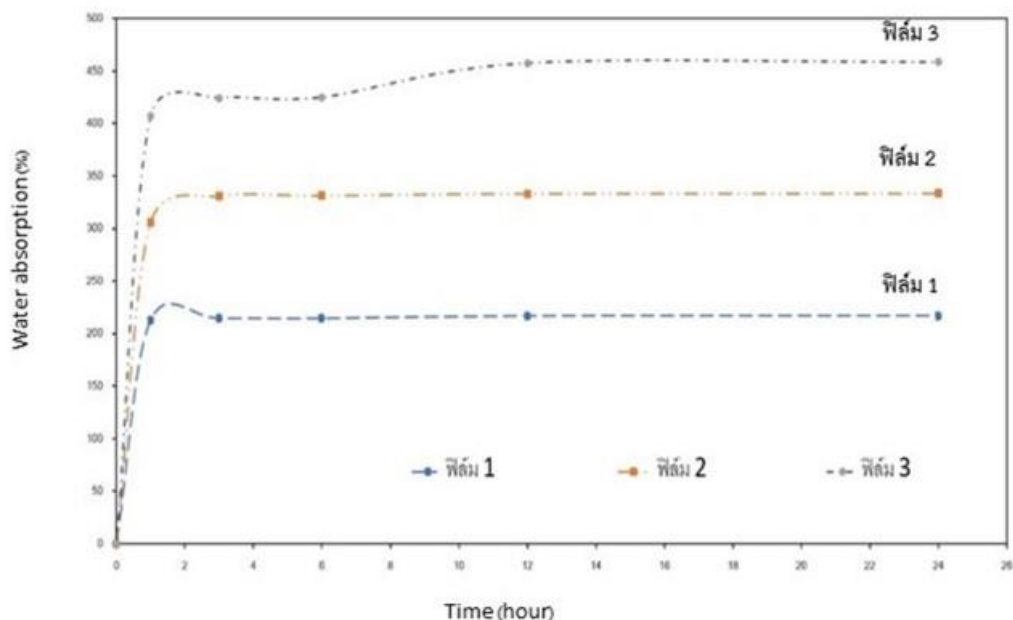
รูปที่ 4.5 ภาพ SEM แสดงการยึดติดระหว่างฟิล์มไคโตซานและแผ่นอีวีเอฐานรอง

4.3 การดูดซึมน้ำ (Water absorption)

จากการศึกษาการดูดซึมน้ำของฟิล์มไคโตซาน และฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง โดยการนำตัวอย่างแช่น้ำแล้วเก็บตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณหาค่าร้อยละการดูดซึมน้ำ ดังแสดงในรูป 4.6 และ 4.7 พบว่าฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองที่มีความหนาต่างๆมีความสามารถในการดูดซึมน้ำได้ดี และความสามารถในการดูดซึมน้ำจะแปรผันตามความหนาของฟิล์ม โดยฟิล์ม 1 มีความบางของชั้นฟิล์มไคโตซานมากที่สุด สามารถดูดน้ำได้ต่ำสุดประมาณ 200 % ของน้ำหนัก ในขณะที่ฟิล์ม 2 (มีความหนาของชั้นฟิล์มไคโตซานระดับกลาง) สามารถดูดน้ำเพิ่มขึ้นได้ประมาณ 300% ของน้ำหนัก เมื่อพิจารณาฟิล์ม 3 ซึ่งมีความหนาของชั้นฟิล์มไคโตซานมากที่สุด พบว่าสามารถดูดน้ำเพิ่มได้มากที่สุดที่ 400 % ของน้ำหนัก ความสามารถในการดูดน้ำ เป็นสมบัติที่ต้องการสำหรับแผ่นปิดแผล จากผลการทดลองนี้ในเบื้องต้นพบว่าความหนาของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองมีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซึมน้ำ เนื่องจากอีวีเอเป็นพอลิเมอร์ที่ดูดซึมน้ำได้ดี



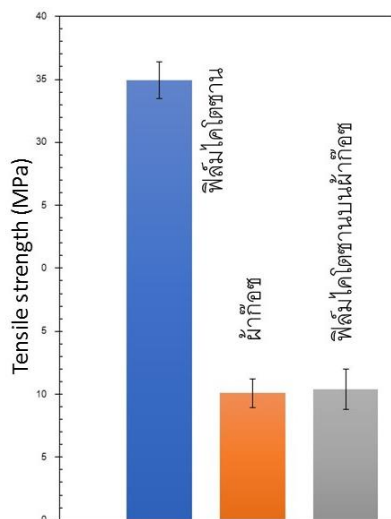
รูปที่ 4.6 ความสามารถในการดูดซึมน้ำของฟิล์มไคโตซาน



รูปที่ 4.7 ร้อยละการดูดซึมน้ำของฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองที่ปริมาณไคโตซานต่าง ๆ

4.4 สมบัติความทนแรงดึง

ผลการทดสอบความทนแรงดึงของฟิล์มไคโตซาน ผ้าฝ้ายก๊อช แผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อช แสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่าฟิล์มไคโตซานมีความแข็งแรงสูง เนื่องจากเป็นฟิล์มที่มีความต่อเนื่อง ไคโตซานมีการยึดเหนี่ยวกันได้ดี ในขณะที่ผ้าฝ้ายก๊อชมีความแข็งแรงต่ำกว่าฟิล์มไคโตซานมากจึงขาดง่ายเมื่อมีแรงดึง เช่นเดียวกับแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าก๊อชก็มีความทนแรงดึงไม่ต่างจากผ้าฝ้ายก๊อชเนื่องจากแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชไม่มีความต่อเนื่องเหมือนฟิล์มไคโตซาน ดังนั้นจึงไม่มีสมบัติเสริมให้กับผ้าฝ้ายก๊อชมากนัก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชมีความสามารถในการคงรูปได้ดีกว่าฟิล์มไคโตซาน อย่างไรก็ตามแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชไม่ได้มีความแข็งแรงทนทานเมื่อเทียบกับฟิล์มไคโตซานเนื่องจากแผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชไม่ใช่ฟิล์มที่มีความต่อเนื่องนั่นเอง



รูปที่ 4.8 ความทนแรงดึงของฟิล์มไคโตซาน ผ้าฝ้ายก๊อช และ แผ่นฟิล์มไคโตซานบนผ้าก๊อช

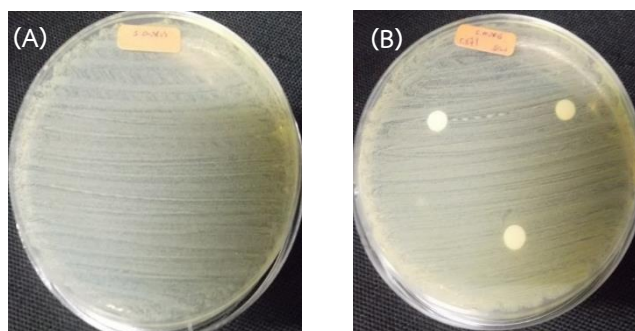
4.5 สมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

จากผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง ในรูปที่ 4.9 และ 4.10 พบว่าในงานเลี้ยงเชื้อที่มีฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง ทั้ง 2 ด้านไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งยืนยันได้ว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ บริเวณรอบๆฟิล์มยังสังเกตเห็นว่ามีความใสซึ่งแสดงถึงไม่มีแบคทีเรียเกิดขึ้นโดยรอบ อันเป็นผลมาจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแพร่รัศมีออกไปโดยรอบอันเนื่องมาจากในชั้นฟิล์มไคโตซานมีการเติมไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สามารถแพร่ออกมาได้เมื่อสัมผัสกับน้ำ รัศมีการยับยั้งการเจริญ (inhibitory zone หรือ clear zone of inhibition) แสดงในตารางที่ 4.1

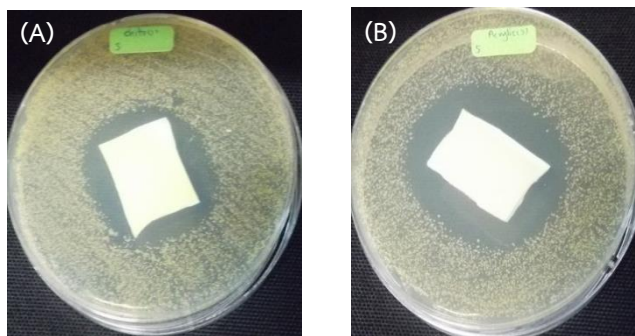
สรุปได้ว่าฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ ซึ่งการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเกิดจากแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตระหว่างประจุบวกของไคโตซานและประจุลบที่ผิวเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำลาย รวมทั้งสารต่างๆภายในเซลล์ และนำไปสู่การจับกันของโมเลกุลไคโตซานกับ DNA ซึ่งจะไปขัดขวางการสังเคราะห์ mRNA

ตารางที่ 4.1 ขนาดของ clear zone of inhibition ของฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง

ผลิตภัณฑ์	Clear zone of inhibition (มิลลิเมตร)
ด้านฟิล์มไคโตซาน	9.00±0.00
ด้านแผ่นอีวีเอฐานรอง	11.50±0.71



รูปที่ 4.9 แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (A) และชุดควบคุมที่เป็นน้ำกลั่น (B)



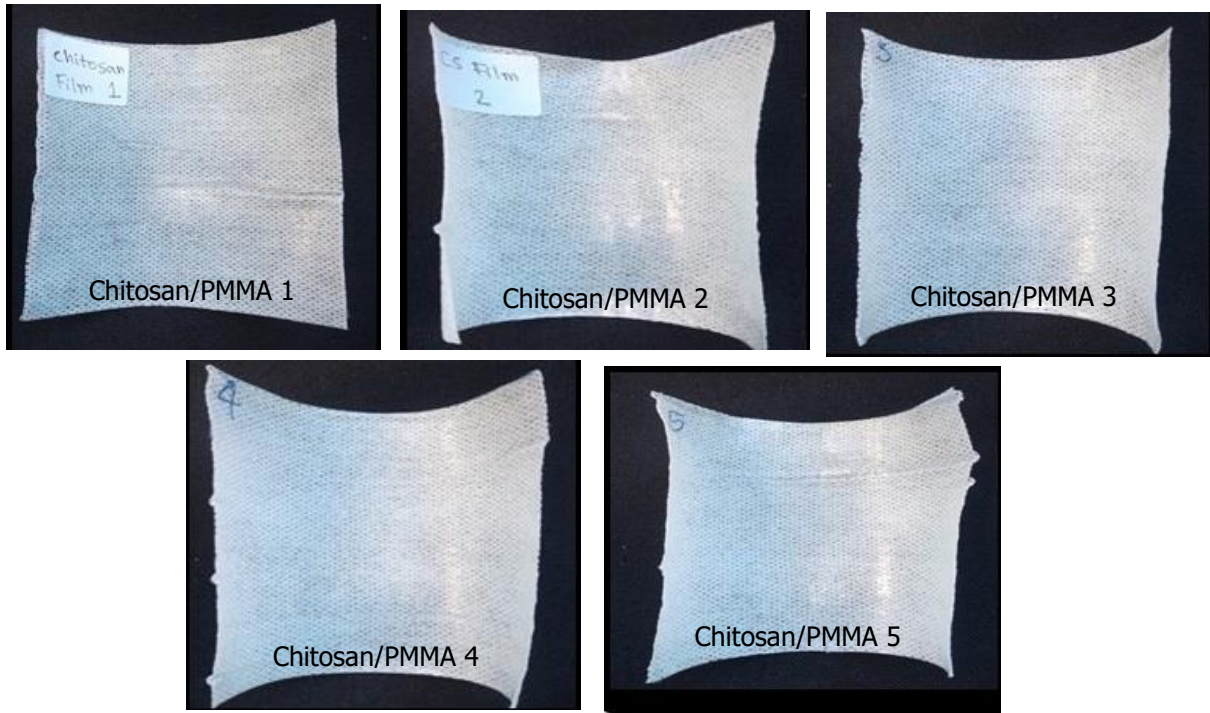
รูปที่ 4.10 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มไคโตซาน (A) และฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง (B)

4.6 ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง

ภาพถ่ายของฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองแสดงดังรูปที่ 4.11 จากรูปแสดงให้เห็นว่าฟิล์มไคโตซาน/พีเอ็มเอ็มเอมีลักษณะใส โปร่งแสง บาง พับงอได้ ไม่เหนียวเหนอะหนะเหมือนฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอที่บดงอและพับไปมาไม่ได้ ฟิล์มไคโตซาน/พีเอ็มเอ็มเอที่ได้ไม่แตกหัก ดูดซึมน้ำได้ดี และสามารถนำไปติดบนผ้าก๊อชได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ในข้อเสนอโครงการ



รูปที่ 4.11 ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง



รูปที่ 4.12 ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อซ

4.7 ผลการต้านแบคทีเรียของฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อซ

จากผลการทดสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อซ ตามมาตรฐาน AATCC 100 ที่แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าร้อยละการลดลงของแบคทีเรียอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำมากหรือแทบไม่มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียเลย ซึ่งผู้วิจัยก็ยังไม่ทราบสาเหตุว่าทำไมฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองจึงไม่แสดงสมบัติต้านแบคทีเรียเมื่อเทียบกับฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการลดลงของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มไคโตซานบน
พีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อช

ตัวอย่าง	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	CFU/ml		Log CFU/ml		% การ ลดลงของ แบคทีเรีย
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	
Control	$1.19 \times 10^6 \pm 2.80 \times 10^5$	$1.73 \times 10^4 \pm 3.79 \times 10^3$	6.17 ± 0.08	4.23 ± 0.10	31.39
Chitosan film 1	$1.45 \times 10^6 \pm 1.47 \times 10^5$	$1.70 \times 10^6 \pm 1.73 \times 10^4$	6.16 ± 0.05	6.23 ± 0.00	1.16
Chitosan film 2	$1.54 \times 10^6 \pm 3.46 \times 10^4$	$1.31 \times 10^6 \pm 1.21 \times 10^5$	6.19 ± 0.01	6.11 ± 0.04	1.17
Chitosan film 3	$1.53 \times 10^6 \pm 2.83 \times 10^5$	$8.33 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^4$	6.18 ± 0.09	5.92 ± 0.03	4.18
Chitosan film 4	$1.51 \times 10^6 \pm 2.86 \times 10^5$	0.00 ± 0.00	6.17 ± 0.09	0.00 ± 0.00	100
Chitosan film 5	$1.85 \times 10^6 \pm 9.50 \times 10^4$	$1.85 \times 10^5 \pm 1.12 \times 10^4$	6.20 ± 0.03	5.27 ± 0.03	15.09

4.8 ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน L929

จากตารางที่ 4.3 พบว่าฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อชที่ incubate เป็นเวลา 3 และ 4 วันมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตต่ำกว่า 50% ซึ่งแสดงว่าฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปานกลาง

ตารางที่ 4.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของฟิล์มไคโตซานบน
พีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อช ด้วยเทคนิค MTT Assay โดยใช้เซลล์
มาตรฐาน L929

ตัวอย่าง	จำนวนเซลล์รอดชีวิต (%)			
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน
Chitosan/PMMA ที่ ลามิเนตบนผ้าก๊อช	72.55 ± 10.42	88.46 ± 3.84	18.74 ± 1.78	29.00 ± 9.59

4.9 ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT Assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน ATCC CRL2522

จากตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นปิดแผลทางการแพทย์และฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อชของโครงการวิจัย พบว่าฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองบนผ้าก๊อชมี % จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต มากกว่าของแผ่นปิดแผลทางการแพทย์ แสดงว่าฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าแผ่นปิดแผลทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามฟิล์มที่เตรียมได้ก็ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปานกลาง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก PMMA ที่สังเคราะห์ขึ้นมีปริมาณมอนอเมอร์ตกค้างอยู่

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของแผ่นปิดแผลทางการแพทย์กับฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อซ ด้วยเทคนิค MTT Assay โดยใช้เซลล์มาตรฐาน ATCC CRL2522 ที่ incubation period 1, 7 และ 14 วัน

ตัวอย่าง	จำนวนเซลล์รอดชีวิต (%)		
	1 วัน	7 วัน	14 วัน
แผ่นปิดแผลทางการแพทย์	11	22	27
ฟิล์มไคโตซานบนพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อซ	46	54	53

หมายเหตุ แผ่นปิดแผลทางการแพทย์ เป็น “ผ้าก๊อซปิดแผลแบบพร้อมใช้ (wound dressing self-adhesive with absorbent pad)”

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และ

ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. फिल्मโคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อชฐานรองที่เตรียมได้มีสมบัติดูดซึมน้ำได้ดี แต่มีความแข็งกระด้าง ยังไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นแผ่นปิดแผล
2. फिल्मโคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองมีลักษณะใส มีความยืดหยุ่นสูง ชั้นฟิล์มโคโตซานสามารถยึดเกาะติดกับแผ่นฐานรองได้ดี และมีความสามารถดูดซึมน้ำได้ดี โดยความสามารถในการดูดซึมน้ำแปรผันตามความหนาของชั้นฟิล์มโคโตซาน อย่างไรก็ตามแผ่นอีวีเอมีความเหนียวเหนอะหนะ เมื่อนำไปลامينตบนผ้าฝ้ายก๊อชแล้วทำการพับ แผ่นอีวีเอจะติดกลับมาเหมือนเดิมทำให้หากนำมาทำเป็นผ้าปิดแผลจะไม่เกาะติดหรือแนบสนิทกับผิวหนังได้
3. फिल्मโคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และแสดงรัศมีการยับยั้งออกไปได้โดยรอบ เนื่องจากในชั้นฟิล์มโคโตซานมีการผสมกันของโคโตซานน้ำหนักรวมโมเลกุลต่างๆ โดยส่วนที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำจะแพร่ออกมาเพื่อทำหน้าที่แสดงรัศมีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย
4. फिल्मโคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรอง ใส พับไปมาไม่ติดกลับ เมื่อนำไปลامينตบนผ้าฝ้ายก๊อชก็ยังไม่ติดกลับ ก็สามารถแนบสนิทกับผิวหนังได้ จึงเหมาะสมสำหรับทำเป็นแผ่นปิดแผล อย่างไรก็ตามฟิล์มโคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรองแสดงสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ไม่ดีเทียบเท่าฟิล์มโคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรอง นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มโคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรองมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าแผ่นปิดแผลทางการค้า อย่างไรก็ตามฟิล์มที่เตรียมได้ก็ยังคงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปานกลาง ซึ่งอาจมีเนื้อมาจากยังมีสารมอนอเมอร์ตกค้างอยู่ใน PMMA emulsion ที่สังเคราะห์ขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. फिल्मโคโตซานบนฟิล์มพีเอ็มเอ็มเอฐานรองที่ลامينตบนผ้าฝ้ายก๊อชที่คณะผู้วิจัยเตรียมได้พบว่ายังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลาง ซึ่งอาจมีเนื้อมาจากยังมีสารมอนอเมอร์ตกค้างอยู่ใน PMMA emulsion ที่สังเคราะห์ขึ้น ดังนั้นในขั้นตอนการสังเคราะห์ PMMA emulsion ต้องมีปรับสูตรและปรับภาวะการพอลิเมอไรเซชันให้มีสารมอนอเมอร์เหลือน้อยที่สุด หรือมีการขจัดมอนอเมอร์ที่ตกค้างอยู่
2. ผ้าปิดแผลของคณะผู้วิจัยที่มีปัญหาเมื่อนำฟิล์มโคโตซานที่มีพอลิเมอร์เป็นฐานรองแล้วนำมามลื่นตกับผ้าก๊อชพบว่าฟิล์มโคโตซานบนฐานรองเกิดการติดกลับ คณะผู้วิจัยรับทราบในปัญหานี้และเห็นว่าหากมีการทำวิจัยในลักษณะเช่นนี้ควรทำงานวิจัยร่วมกับคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ในการออกแบบ

ผลิตภัณฑ์ผ้าปิดแผลในลักษณะอื่นที่หลากหลายเพื่อขจัดปัญหาดังกล่าวลง และทำให้ผ้าปิดแผลแนบสนิทกับผิวหนังได้ดี

3. การทำวิจัยเรื่องผ้าปิดแผลสำหรับรักษาบาดแผลเรื้อรังนั้นไม่เพียงแต่การพัฒนาวัสดุให้มีสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม ให้สามารถยั้งเชื้อแบคทีเรีย ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเท่านั้น แต่เพื่อให้วัสดุนั้นสามารถนำไปใช้ได้เชิงพาณิชย์จำเป็นต้องมีการทดสอบฤทธิ์สมานแผลในหนูขาวที่เป็นเบาหวาน และสุดท้ายควรมีการนำผ้าปิดแผลไปใช้ในคนไข้จริง ดังนั้นหากต้องทำโครงการเกี่ยวกับผ้าปิดแผลสำหรับบาดแผลเรื้อรังควรมีคณะผู้วิจัยที่มาจากหลากหลายสาขา โดยเฉพาะจากคณะแพทยศาสตร์ คณะพยาบาลศาสตร์ เพื่อให้ไม่มีอุปสรรคในการขอโครงการผ่านคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์และคนทดลอง สามารถได้ผลการทดสอบกับคนป่วยจริง
4. จากการพูดคุยกับบริษัทที่ทำธุรกิจผลิตผ้าปิดแผล ทำให้คณะผู้วิจัยทราบว่า การเข้าสู่ธุรกิจนี้โดยนำเสนอผลิตภัณฑ์ผ้าปิดแผลสู่โรงพยาบาลเป็นสิ่งที่ยากมาก เพราะโรงพยาบาลจะรับบริษัทคู่สัญญาเท่าเดิม หากรับบริษัทใหม่ก็เป็นที่แน่นอนว่าจะต้องมีบริษัทหนึ่งถูกยกเลิกสัญญา และนอกจากนี้ต้องศึกษารอบกฎหมายในการควบคุมกำกับดูแลเครื่องมือแพทย์ของประเทศสมาชิกอาเซียน หรือต้องศึกษามาตรฐาน CE Marking สำหรับส่งผลิตภัณฑ์ไปยังสหภาพยุโรป และผู้ผลิตต้องมีการจัดทำและการขึ้นทะเบียนเอกสารผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพ และความปลอดภัยผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ (Common Submission Dossier Template: CSDT)

รายการเอกสารอ้างอิง

1. Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., and Jeon, Y.-J. Food Applications of Chitin and Chitosans, *Trends in Food Science & Technology* 10 (2): 37-51 (1999).
2. Goy, R. C., Britto, D. d., and Assis, O. B. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan, *Polímeros* 19 (3): 241-247 (2009).
3. Mirastschijski, U., Jokuszies, A., and Vogt, P. M. Skin Wound Healing: Repair Biology, Wound, and Scar Treatment, *Plastic Surgery* 3 (1): 288-90 (2013).
4. Dumville, J. C., Deshpande, S., O'Meara, S., and Speak, K. Hydrocolloid Dressings for Healing Diabetic Foot Ulcers, *Cochrane Database System Review* (2012) doi: 10.1002/14651858.CD009099.pub2
5. Dumville, J. C., Deshpande, S., O'Meara, S., and Speak, K. Hydrocolloid Dressings for Healing Diabetic Foot Ulcers, *Cochrane Database System Review* (2013) doi: 10.1002/14651858.CD009099.pub3
6. http://courseware.npru.ac.th/admin/files/20170115134527_9712e31545d8c6c49a4187d69275c833.pdf (บทที่ 9 การพยาบาลผู้ป่วยที่มีบาดแผลและการอักเสบ)
7. Oonmetta-areea, J., et al. Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*, *Food Science and Technology* 39: 1214-1220 (2006).
8. Khantha, B., et al. Inhibitory Effects of Five Essential Oils Extracted from *Zingiberaceae* on Growth of *Aspergillus flavus*, *Agriculture Science Journal* 38 (6): 29-32 (2007).
9. Metwally, A. M., Omar, A. A., Harraz, F. M., and Sohafy, S. M., Phytochemical Investigation and Antimicrobial Activity of *Psidium guajava* L. Leaves, *Pharmacognosy Magazine* 6: 212-218 (2010).
10. Khewkhom, N., et al. In vitro Antifungal Activity of some Well-Known Spices against Plant Pathogenic Fungi, *Agriculture Science Journal* 38 (6): 70-74 (2007).
11. นพัต จันทรวิสูตร และ เจษฎา เต็นดวงบริพันธ์. การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากข้าที่ผสม ในเค้ก. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (Section T)* ปีที่ 3 เล่มที่ 1 (2547/2004): 19-34.
12. Mayachiew, P., and Devahastin, S., Antimicrobial and Antioxidant Activities of Indian Gooseberry and Galangal Extracts, *Food Science and Technology* 41: 1153-1159 (2007).

13. Lutterrodt, G.D., Ismail, A., Basheer, R.H., and Baharudin, H.M., Antimicrobial Effects of *Psidium guajava* Extract as one Mechanism of its Antidiarrhoeal Action, *Journal of Medical Science* 6: 17-20 (1999).
14. หลักเกณฑ์การจัดประเภทเครื่องมือแพทย์ตามความเสี่ยง, กองควบคุมเครื่องมือแพทย์, สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, สิงหาคม 2558.
15. <http://www.qtimeconsult.com/ASEAN-Medical-Devices.html>

ภาคผนวก

แผ่นปิดแผลต้านจุลินทรีย์ทำจากไคโตซาน/อะคริลิกที่ลามิเนตบนผ้าก๊อซ
สรุปรายงานฉบับสมบูรณ์

ตารางเปรียบเทียบผลผลิต (Output) ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ดำเนินการได้จริง

ผลผลิต (Output)		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ท่านระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	
1. จัดทำอุปกรณ์และสารเคมี	100%	
2. เตรียมแผ่นเอวีเอฟิล์มไคโตซานบนผ้าฝ้ายก๊อซเบื้องต้น	100%	
3. เตรียมฟิล์มไคโตซานบนแผ่นอีวีเอฐานรองและฟิล์มไคโตซานบนอะคริลิกฐานรอง	100%	
4. ทดสอบสมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงกล สมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i>	100%	
5. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ fibroblast ของหนู และ fibroblast ของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ส่วนหน้าผากของฟิล์มไคโตซานบนอะคริลิกฐานรองที่ลามิเนตบนผ้าก๊อซ	100%	

ลงนาม.....

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่.....

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว.

ลงนาม.....

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่.....