

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1.1 Chitosan (high polymer)
- 3.1.2 Sodium alginate (Medium viscosity of 2 % solution 3500 cps at 25 °C)
- 3.1.3 Activated carbon
- 3.1.4 Calcium chloride
- 3.1.5 Acetic acid
- 3.1.6 Deionized water
- 3.1.7 Sodium hydroxide
- 3.1.8 Isopropyl alcohol
- 3.1.9 Monochloroacetic acid
- 3.1.10Methanol



3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.2.1 เครื่องแก้ว
- 3.2.2 เครื่อง LLOYD Instrument (LR 50k Serial No 20872)
- 3.2.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 3.2.4 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.2.5 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- 3.2.6 เครื่องกวนความเร็วรอบสูง (Homogenizer)
- 3.2.7 ตู้อบสุญญากาศ (Oven vacuum)
- 3.2.8 เครื่องวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

3.3 วิธีการดำเนินการ

งานวิจัยนี้ถูกแบ่งออกเป็นส่วนหลักๆ 5 ส่วนด้วยกัน คือ

3.3.1 การเตรียมไฮโดรเจลคอมโพสิตของไคโตซาน อัลจิเนตและถ่านกัมมันต์

1. เตรียมสารละลายไคโตซานที่มีความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% ในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการกวนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 3 วัน
2. เตรียมสารละลายอัลจิเนตที่มีความเข้มข้น 1% ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1 และ 2 ผสมให้เข้ากันในแต่ละความเข้มข้นที่ต้องการระหว่างไคโตซาน (ตารางที่ 3.1) กับอัลจิเนตโดยใช้เครื่อง homogenizer
4. ชั่งถ่านกัมมันต์ที่ปริมาตร 0.03, 0.045 และ 0.06 กรัม และนำถ่านกัมมันต์ที่ชั่งใส่ในสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันค่อยๆ เทลงในแม่พิมพ์พลาสติก และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เติมสารละลาย Calcium chloride ที่ความเข้มข้น 1% ในข้อ 4 ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น
6. นำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปทดสอบสมบัติต่างๆ ต่อไป

3.3.2 การสังเคราะห์ NOCC

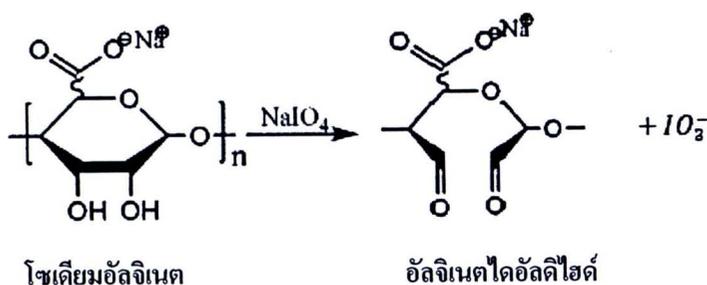
1. ชั่งผงไคโตซาน 10 กรัม เติม isopropyl alcohol 100 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิห้อง
2. เติม NaOH 10 N ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (โดยแบ่งเติมเป็น 5 ครั้งๆ ละ 1 นาที) กวนตลอดเวลาในการสังเคราะห์เมื่อเติมแล้วกวน ต่ออีก 30 นาที
3. เติม monochloroacetic acid 60 กรัม (โดยแบ่งเติมเป็น 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที) ให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส กวนต่ออีก 3 ชั่วโมง
4. นำ NOCC ที่ได้จากข้อ 3 มากรองและล้างตะกอนด้วย Methanol อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
5. นำ NOCC ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

3.3.3 การเตรียมไฮโดรเจลคอมโพสิตของ NOCC อัลจินเนตและถ่านกัมมันต์

1. เตรียมสารละลาย NOCC ที่มีความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5% ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายอัลจินเนตที่มีความเข้มข้น 1% ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1 และ 2 ผสมให้เข้ากันในความเข้มข้นที่ต้องการระหว่าง NOCCกับอัลจินเนต (ตารางที่ 3.2) โดยใช้เครื่อง homogenizer
4. ชั่งถ่านกัมมันต์ที่ปริมาตร 0.03, 0.045 และ 0.06 กรัม และนำถ่านกัมมันต์ที่ชั่งใส่ในสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันค่อยๆ เทลงในแม่พิมพ์พลาสติก และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เติมสารละลาย Calcium chloride ที่ความเข้มข้น 1% ในข้อ 4 ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น
6. นำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปทดสอบสมบัติต่างๆ ต่อไป

3.3.4 การสังเคราะห์อัลจินเนตไดอัลดีไฮด์ (ADA)

การเตรียมอัลจินเนตไดอัลดีไฮด์โดยปฏิกิริยา Periodate oxidation จากโซเดียมอัลจินเนต



1. นำโซเดียมอัลจินเนตปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วผสมกับโซเดียมเพอริออเดต 10.8 กรัม
2. นำสารละลายที่ได้กวนให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง magnetic stirrer ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. เติมอิทิลีนไกลคอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่ได้จากข้อ 2 ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เป็นกลาง
4. เติมโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 5 กรัม และ เอทานอลปริมาตร 600 มิลลิลิตรลงในสารละลาย จนเกิดการตกตะกอนของอัลจินเนตไดอัลดีไฮด์ที่บริสุทธิ์

5. นำอัลจินตไดออลดีไฮด์ที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร อีกครั้งแล้วทำให้ตกตะกอนอีกครั้งโดยเติมเอทานอลปริมาตร 400 มิลลิลิตร
6. ทำซ้ำตามข้อ 5 อีก 3 ครั้งเพื่อให้ได้ผลึกอัลจินตไดออลดีไฮด์
7. นำอัลจินตไดออลดีไฮด์ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนในการเตรียมไฮโดรเจลคอมโพสิตของไคโตซาน อัลจินต และถ่านกัมมันต์

ตัวอย่าง	ไคโตซาน (g)	อัลจินต (g)	ถ่านกัมมันต์ (g)	อัตราส่วน
CC 1	0.075	0.15	0.03	0.5:1:0.2
CC 2	0.075	0.15	0.045	0.5:1:0.3
CC 3	0.075	0.15	0.06	0.5:1:0.4
CC 4	0.15	0.15	0.03	1:1:0.2
CC 5	0.15	0.15	0.045	1:1:0.3
CC 6	0.15	0.15	0.06	1:1:0.4
CC 7	0.225	0.15	0.03	1.5:1:0.2
CC 8	0.225	0.15	0.045	1.5:1:0.3
CC 9	0.225	0.15	0.06	1.5:1:0.4
CC 10	0.075	0.15	-	0.5:1:0
CC 11	0.225	0.15	-	1.5:1:0
CC 12	0.15	0.15	-	1:1:0
CC 13	0.075	-	-	0.5:0:0
CC 14	0.15	-	-	1:0:0
CC 15	0.225	-	-	1.5:0:0

หมายเหตุ อัตราส่วนการเตรียมไฮโดรเจลเป็นการเตรียมที่ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.2 แสดงอัตราส่วนในการเตรียมไฮโดรเจลคอมโพสิตของ NOCC อัลจิเนต และถ่านกัมมันต์

ตัวอย่าง	ไคโตซาน (g)	อัลจิเนต (g)	ถ่านกัมมันต์ (g)	อัตราส่วน
WW 1	0.075	0.15	0.03	0.5:1:0.2
WW 2	0.075	0.15	0.045	0.5:1:0.3
WW 3	0.075	0.15	0.06	0.5:1:0.4
WW 4	0.15	0.15	0.03	1:1:0.2
WW 5	0.15	0.15	0.045	1:1:0.3
WW 6	0.15	0.15	0.06	1:1:0.4
WW 7	0.225	0.15	0.03	1.5:1:0.2
WW 8	0.225	0.15	0.045	1.5:1:0.3
WW 9	0.225	0.15	0.06	1.5:1:0.4
WW 10	0.075	0.15	-	0.5:1:0
WW 11	0.225	0.15	-	1.5:1:0
WW12	0.15	0.15	-	1:1:0
WW13	0.075	-	-	0.5:0:0
WW 14	0.15	-	-	1:0:0
WW 15	0.225	-	-	1.5:0:0

หมายเหตุ อัตราส่วนการเตรียมไฮโดรเจลเป็นการเตรียมที่ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

3.3.5 การศึกษาสมบัติสำคัญต่างๆ ของไฮโดรเจลคอมโพสิต

ในส่วนนี้จะเน้นไปที่การศึกษาสมบัติของเจลที่มีความสำคัญต่อการนำไปใช้เป็น เจลสมานแผล ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. สมบัติการดูดซับน้ำของไฮโดรเจล (Swelling ratio) [20]

วัสดุที่นำมาใช้ในการปิดบาดแผลหรือสมานแผลนั้นควรมีความสามารถในการรักษาความชุ่มชื้นของแผลโดยไม่เกิดการหมักหมม และช่วยในการดูดซับของเลือดและน้ำหนองอันเกิดจากแผล โดยสมบัติข้อนี้ของไฮโดรเจลสามารถศึกษาได้จากค่า Swelling ratio (สมการที่ 3.1)

$$\text{Swelling ratio (\%)} = \frac{[W_s - W_d]}{W_d} \times 100 \quad (3.1)$$

ค่า W_s คือ น้ำหนักของเจลหลังการบวมน้ำ (กรัม)

W_d คือ น้ำหนักแห้งของเจล (กรัม)

ซึ่งค่า W_s และ W_d จะได้จากการทดสอบการบวมน้ำของเจล (water swelling test)

สามารถทำการทดสอบได้โดย

- 1) นำแผ่นฟิล์มไคโตซาน/อัลจินेट-ถ่านกัมมันต์ มาชั่งน้ำหนักแผ่นเจลแห้ง
- 2) นำไปแช่ในน้ำกลั่น ที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 3) นำเจลที่บวมน้ำออกมาอย่างระมัดระวังและวางไว้บนกระดาษกรองเพื่อซับน้ำที่อยู่รอบนอกของเจลออก จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ Swelling ratio ต่อไป ซึ่งในครั้งนี้จะเป็นการบวมน้ำครั้งที่ 1
- 4) จากแผ่นเจลที่บวมน้ำในข้อ 3 (บวมน้ำครั้งที่ 1) นำมาอบให้แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและบันทึกน้ำหนักแผ่นเจลแห้งนำไปแช่ในน้ำกลั่น ที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 5) นำเจลที่บวมน้ำออกมาอย่างระมัดระวังและวางไว้บนกระดาษกรองเพื่อซับน้ำที่อยู่รอบนอกของเจลออก จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ Swelling ratio ต่อไป ซึ่งในครั้งนี้จะเป็นการบวมน้ำครั้งที่ 2
- 6) ทำซ้ำเหมือนข้อ 4-5 อีกครั้งเพื่อเป็นการบวมน้ำครั้งที่ 3

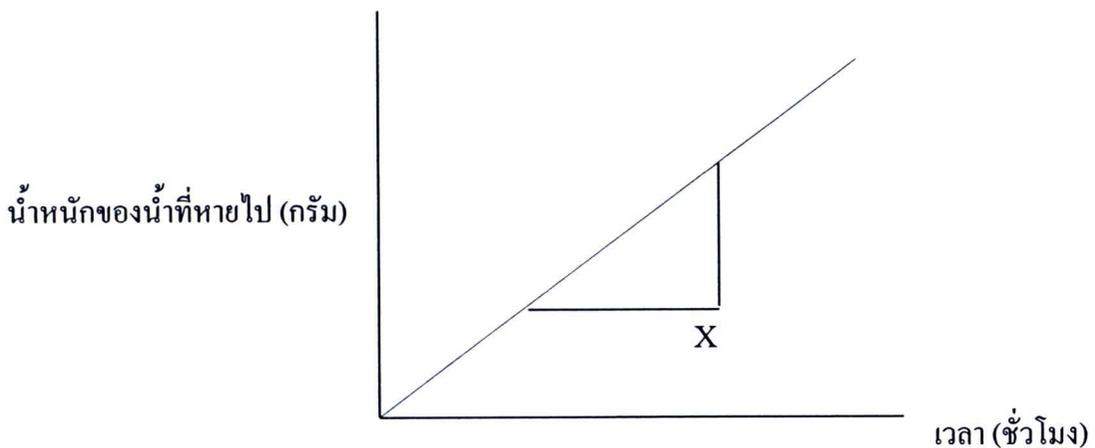
2. อัตราการปล่อยผ่านไอน้ำ (Water vapour transmission rate) [35]

สมบัติการปล่อยผ่านไอน้ำของไฮโดรเจลนี้สามารถศึกษาได้โดยการคำนวณค่า water vapour transmission rate (WVTR) ตามมาตรฐาน ASTM E-96 โดยทำการทดสอบได้ดังนี้

- 1) นำไฮโดรเจลคอมโพสิตที่เตรียมได้วางไว้บนปากขวด (Cylindrical plastic cups 34 mm diameter) ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- 2) ปิดด้านข้างปากขวดด้วยพาราฟิล์มให้สนิทเพื่อป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำที่ด้านปากขวด
- 3) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 35 % ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตามระยะเวลาที่กำหนด และชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ทุกๆ 1 ชั่วโมง
- 4) ทำการคำนวณเพื่อหาอัตราการซึมผ่านไอน้ำตามสมการ ดังต่อไปนี้

$$WVTR = \frac{[Slope \times 24g / m^2 / day]}{Area} \times 100 \quad (3.2)$$

ความชันที่นำมาคำนวณ คือค่าความชันของกราฟระหว่างน้ำหนักของน้ำที่หายไปกับเวลา โดย A คือค่าพื้นที่ของชั่งตัวอย่าง



รูปที่ 3.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของน้ำที่หายไป (กรัม) กับเวลา (ชั่วโมง)

3. สมบัติเชิงกล (Mechanical properties)

สมบัติความแข็งแรง การคงตัว และความยืดหยุ่นของเจลนั้นสามารถหาได้จากการทดสอบ Tensile test โดยเครื่อง LLOYD Instrument ซึ่งวัดการยืดออกของชิ้นงานเมื่อได้รับความเค้น จนขาด โดยชิ้นงานถูกตัดให้มีลักษณะเป็นริบบิ้นขนาด กว้าง 25 mm ตามมาตรฐาน ASTM D-882 [36]

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ

ระยะ Gauge length

75 mm

4. การทดสอบการผ่านของเชื้อแบคทีเรีย (Microbial penetration)[20]

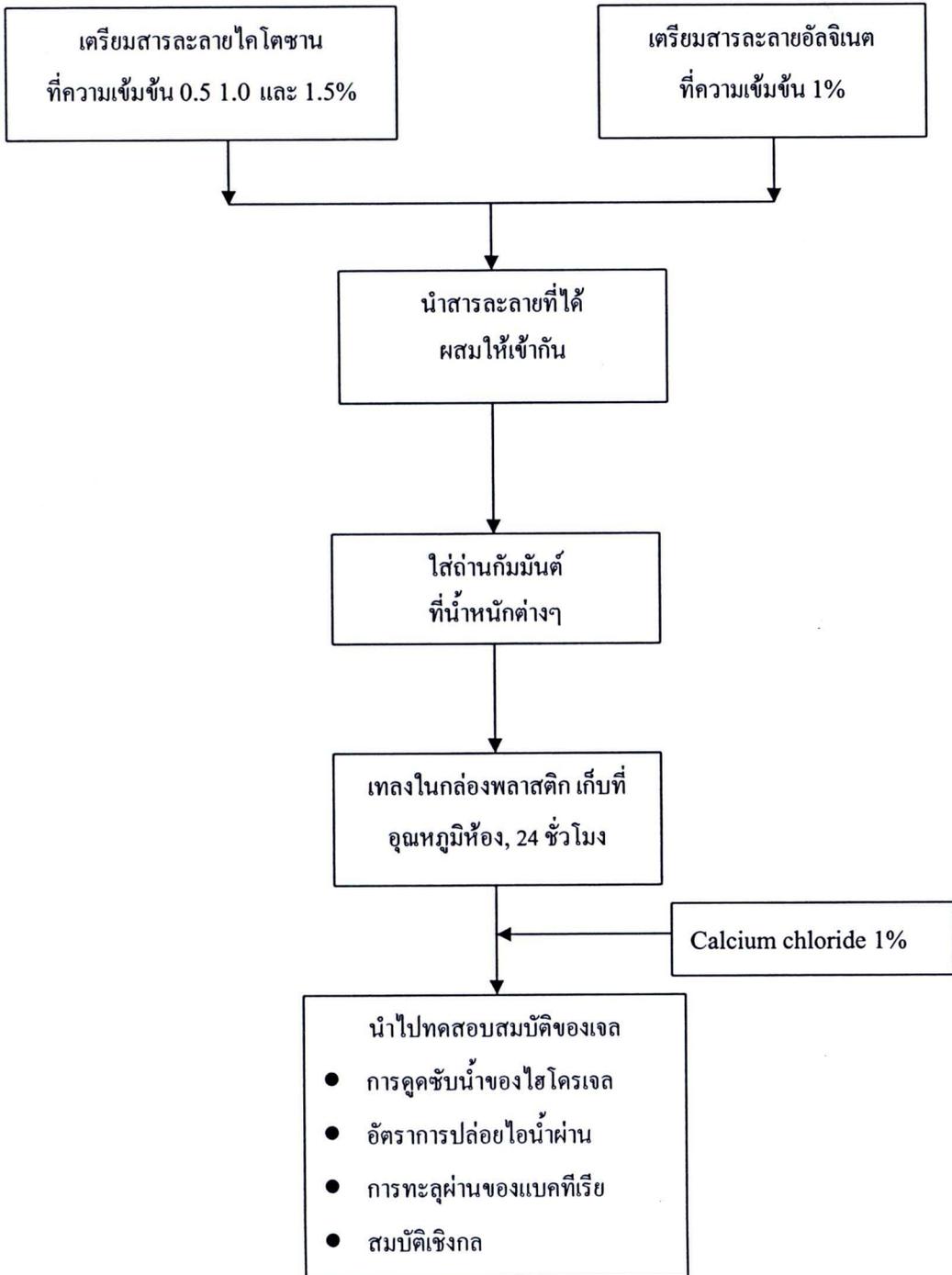
วัสดุที่นำมาใช้ในการปิดบาดแผลหรือสมานแผลควรมีความสามารถในการป้องกันแผลจากเชื้อแบคทีเรียและป้องกันการติดเชื้อเพื่อไม่ให้แผลเกิดการอักเสบขึ้นมา เนื่องจากหากบาดแผลเกิดการติดเชื้อจะทำให้กระบวนการสมานแผลเป็นไปได้ยาก โดยสมบัติข้อนี้ของไฮโดรเจลสามารถศึกษาได้จาก การทดสอบการผ่านเชื้อแบคทีเรียดังนี้

1. นำไฮโดรเจลคอมโพสิตที่เตรียมได้วางไว้บนหลอดทดลองที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. นำหลอดทดลองที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดทดลองด้วยจุกสำลี (Positive Control) และเปิดปากหลอดทดลองไว้ (Negative Control) เพื่อเป็นตัวควบคุม
3. ปิดด้านข้างปากหลอดทดลองในข้อ 1 และ 2 ด้วยกระดาษกาวให้สนิทเพื่อป้องกันการผ่านของเชื้อแบคทีเรียและเก็บหลอดทดลองไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์
4. เมื่อครบ 1 สัปดาห์ ทำการบันทึกผลการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย

5. ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ NOCC

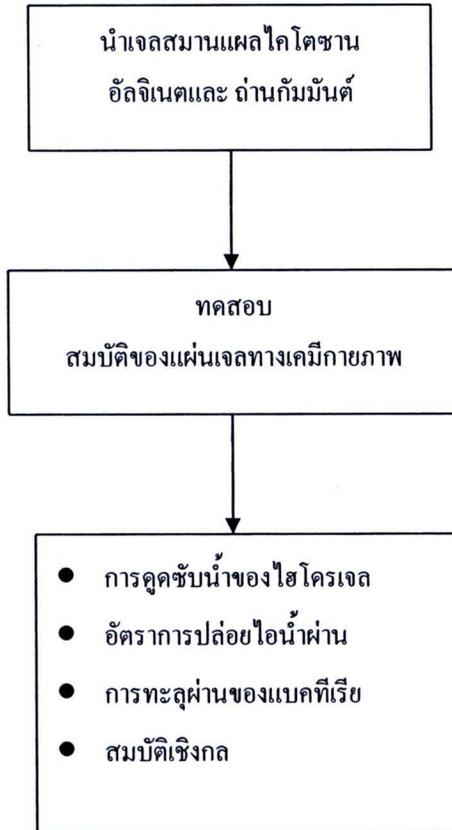
การวิเคราะห์โครงสร้างของ NOCC สามารถวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) โดยการนำ NOCC มาบดกับ KBr อัดเป็นแผ่นและนำไปวิเคราะห์ต่อไป

แผนผังวิธีการทดลอง



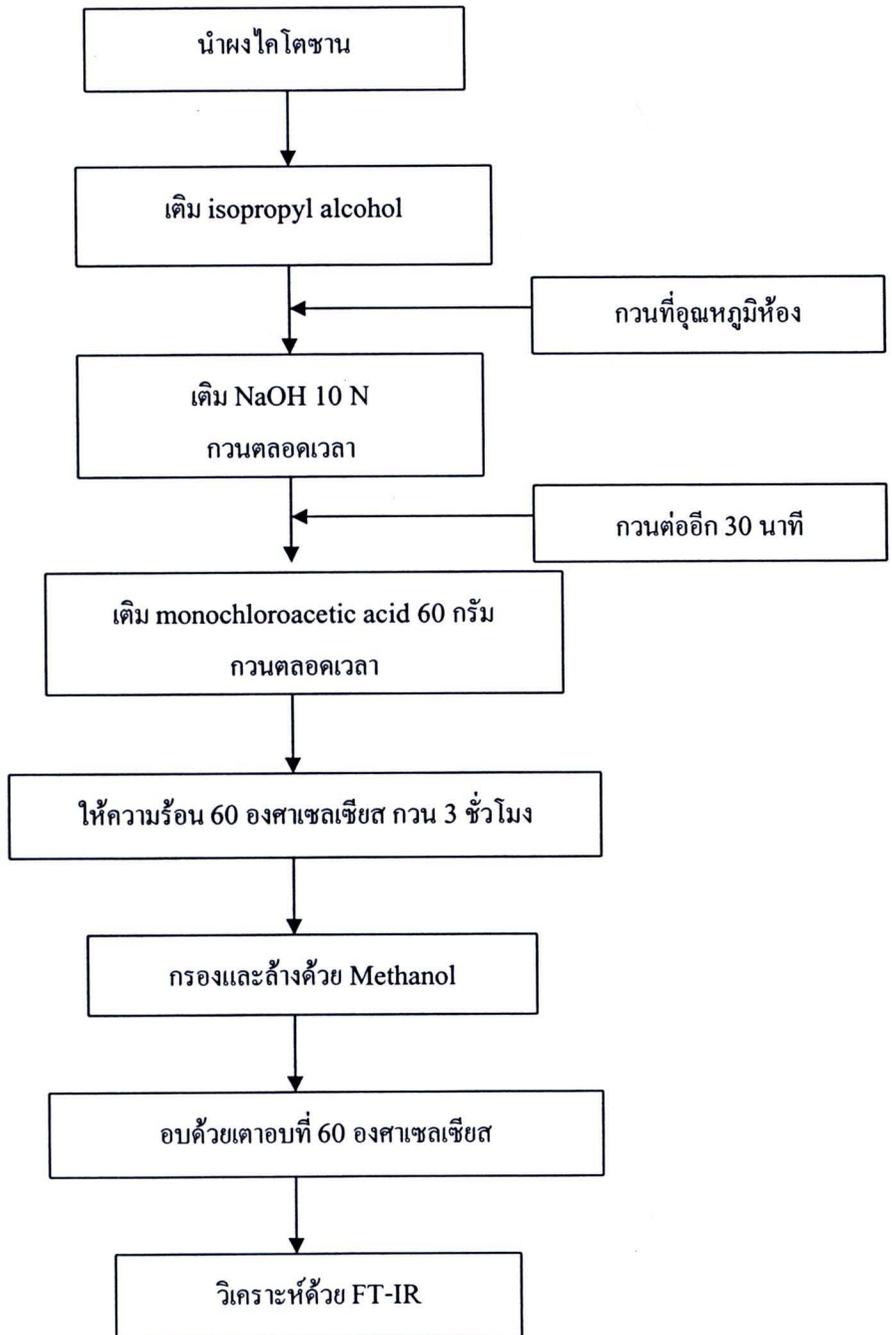
รูปที่ 3.2 แผนผังวิธีการเตรียมไฮโดรเจลคอมโพสิตจากโคโตซัน อัลจินตและถ้ำนกับมันต์

แผนผังวิธีการทดลอง



รูปที่ 3.3 แผนผังวิธีการทดสอบสมบัติของไฮโดรเจลคอมโพสิตจากไคโตซาน อัลจินตและถ่านกัมมันต์

แผนผังวิธีการทดลอง



รูปที่ 3.4 แผนผังวิธีการสังเคราะห์ N,O-carboxymethyl chitosan