

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย
การผลิตแผ่นฟิล์มไคโตซานสำหรับปิดแผล
Production of Chitosan Film for Wound Dressing

ชื่อผู้วิจัย

1. นางสาวนวลพรรณ ณ ระนอง
2. นางอุ๋นเรื่อน เพชรวัลย์
3. นางดวงใจ โอชัยกุล
4. นางสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

RCH

TP

248.65

.C15

1491

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....108256
วัน,เดือน,ปี.....18 ส.ย. 2553

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2548

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 12155731
i.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตแผ่นฟิล์มไคโตซานสำหรับปิดแผล ได้รับการสนับสนุนเงินในการวิจัย จากโครงการวิจัยทุนวิทยาศาสตร์ โดยให้เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2548 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2552

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การผลิตแผ่นฟิล์มไคโตซานสำหรับปิดแผล
(ภาษาอังกฤษ) (Production of Chitosan Film for Wound Dressing)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2548
จำนวนเงิน 250,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ เมษายน 2548 ถึง มีนาคม 2549
หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระ
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังกรุงเทพฯ 10520
โทร. 02-3264341-3 ต่อ 233 02-7373000 ต่อ 6224
โทรสาร 02-3264414

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้ในงานด้านเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร และเภสัชกรรม ไคโตซานละลายได้ในกรดอินทรีย์และนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ จากคุณสมบัติในการสมานแผลและช่วยทำให้เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีการเกาะยึดกันจึงนำมาใช้เป็นวัสดุปิดแผล ดังนั้นจึงมีการศึกษาการเตรียมแผ่นฟิล์มไคโตซานโดยละลายไคโตซาน 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลาย ยที่ผันแปรอัตราส่วนระหว่างกรดแอซิติกเข้มข้น 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) และกรดแลคติกเข้มข้น 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า แผ่นฟิล์มที่ได้จากการละลายไคโตซาน 2 % ในกรดแอซิติกความเข้มข้น 1% มีคุณสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม แผ่นฟิล์มที่ได้มีลักษณะเรียบใส สีค่อนข้างเหลือง มีความหนาประมาณ 15 ไมโครเมตร ค่าการต้านแรงดึงและค่าการยืดจน จุดขาด 33.13 N/mm^2 และ 76.06 % ตามลำดับ เมื่อศึกษาการบวมตัวของแผ่นฟิล์มพบว่ามีค่าเท่ากับ 67.96 64.44 และ 70.58 % ในสารละลาย PBS อาหารPRMI และน้ำกลั่นตามลำดับ แผ่นฟิล์มที่ได้ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลโซไซม์ เมื่อทดสอบการย่อยและการผ่านแผ่นฟิล์มโดยแบคทีเรีย 6 ชนิด พบว่าแบคทีเรียไม่สามารถย่อยแผ่นฟิล์มและไม่สามารถผ่านแผ่นฟิล์มได้ จากการประเมินผลความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อมของแผ่นฟิล์มไคโตซาน ที่มีต่อเซลล์ไลน์ L929 พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยมาก โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับ 30.66% ที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. หลังจากบ่มเซลล์นาน 72 ชม. อย่างไรก็ตามแผ่นฟิล์มไม่ทำให้เกิดการหักของโครโมโซมเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

ABSTRACT

At present, chitosan was applied in agriculture, food industry and pharmacy. Chitosan can be dissolved in organic acid and being casted into films. Because of chitosan properties in wound healing and promoting mammalian cells to bond, the film was made to be wound dressing. In this study, chitosan films were prepared by dissolving 2 % (w/v) chitosan in 1 % (v/v) acetic acid and 1 % (v/v) lactic acid at various ratios. From the results, it was found that the film from 2 % (w/v) chitosan in 1 % (v/v) acetic acid possessed optimum mechanical properties. This film was smooth yellowish and transparent and the thickness was approximately 15 μm . Tensile strength and elongation at break of the film were 33.13 N/mm^2 and 76.06 %, respectively. The swelling values of the chitosan film were 67.96 , 64.44 and 70.58% in PBS, RPMI medium and distilled water, respectively. It was not hydrolyzed by lysozyme. In addition, 6 strains of bacteria were tested for degradation and penetration of the film. The results showed that all bacterial strains could not degrade and penetrate across the chitosan film. Indirect cytotoxicity evaluation of chitosan film using L929 cell line revealed less toxicity of the film to the cells. Apparently, the cell proliferation inhibition index was found to be 30.66% at the concentration of 5 mg/ml after 72 h of exposure. However, the film did not induce chromosomal aberration in human lymphocyte cultivated *in vitro*.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 ไคตินและไคโตซาน	3
2.2 ประโยชน์ของไคโตซาน	6
2.3 แผ่นปิดแผล	7
2.4 การผลิตแผ่นปิดแผลจากไคโตซาน	8
2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์	10
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	12
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	12
3.2 วิธีการทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	19
4.1 ผลของอัตราส่วนของกรดแอซิดิกต่อกรดแลกติกเพื่อเตรียมแผ่นฟิล์มไคโตซาน	19
4.2 ผลของกลีเซอรอลต่อการเตรียมแผ่นฟิล์มไคโตซาน	21
4.3 ผลการศึกษาการบวมน้ำของแผ่นฟิล์มไคโตซาน	24
4.4 ผลการย่อยแผ่นฟิล์มไคโตซานโดยเอนไซม์ไลโซไซม์	26
4.5 ผลการย่อยแผ่นฟิล์มไคโตซานโดยแบคทีเรีย	26
4.6 ผลการศึกษาการผ่านแผ่นฟิล์มไคโตซานของแบคทีเรีย	27
4.7 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์	27
4.8 ผลการศึกษาต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว	30

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก ก	37
ภาคผนวก ข	39

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ความหนา ค่าการต้านแรงดึง และค่าการยืด ณ จุดขาดของแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียก ที่เตรียมจากสารละลายกรดแอซิดิกและกรดแลกติกในอัตราส่วนต่างๆ กัน	19
4.2	ความหนา ค่าการต้านแรงดึง และค่าการยืด ณ จุดขาดของแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกที่ผสมกลีเซอรอล	22
4.3	เปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของแผ่นฟิล์มไคโตซาน	24
4.4	การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation inhibition index, CPII) เมื่อบ่มเซลล์ไลน์ L929 ในสารสกัดไคโตซานนาน 24 48 และ 72 ชม.	28
4.5	ผลของสารละลายไคโตซานที่มีต่อ Mitotic index และค่าเฉลี่ยจำนวนการหักของโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 50 เซลล์	31

สารบัญญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของโคตินและโคโตซาน	4
2.2	การเรียงตัวของสายโคติน	4
2.3	ขั้นตอนการผลิตโคตินและโคโตซาน	5
4.1	ค่าการต้านแรงดึงของแผ่นฟิล์มโคโตซานแบบเปียก	20
4.2	ค่าการยืด ณ จุดขาดของแผ่นฟิล์มโคโตซานแบบเปียก	21
4.3	ค่าการต้านแรงดึงของแผ่นฟิล์มโคโตซานผสมกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ไม่ผสมกลีเซอรอล	23
4.4	ค่าการยืด ณ จุดขาดของแผ่นฟิล์มโคโตซานผสมกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ไม่ผสมกลีเซอรอล	23
4.5	เปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของแผ่นฟิล์มโคโตซานเปียกในน้ำกลั่น	25
4.6	เปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของแผ่นฟิล์มโคโตซานเปียกในสารละลาย PBS	25
4.7	เปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของแผ่นฟิล์มโคโตซานเปียกในอาหาร RPMI	26
4.8	การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์ L929 เมื่อบ่มในสารสกัดจากแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการบ่มต่างกัน	29
4.9	เซลล์ไลน์ L929 เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM เสริมด้วยซีรัม 10% และในสารสกัดจากแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 72 ชม.	30
4.10	ลักษณะของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับจากสารละลายโคโตซาน	32
4.11	ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติของกลุ่ม positive control ที่ได้รับจากสารละลาย Mitomycin C	32

บทที่ 1

บทนำ

ไคตินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ตามธรรมชาติที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ไคตินประกอบด้วยน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ glucosamine มาเรียงต่อกันเป็นสายยาวทำหน้าที่เป็นโครงสร้างป้องกันอันตรายให้กับสิ่งมีชีวิต โดยพบที่เปลือกนอกของสัตว์จำพวก กุ้ง ปู และแกนปลาหมึก รวมทั้งผนังเซลล์ของราและสาหร่ายบางชนิด ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ไคตินเตรียมได้จากการกำจัดหมู่อะซิติก (deacetylation) ของไคตินด้วยด่างเข้มข้น โดยพบว่ามีการกำจัดหมู่อะซิติกมากกว่า 60% ขึ้นไป

ปัจจุบันมีการนำไคโตซานมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ มากมาย เช่น ด้านการเกษตร ด้านบำบัดน้ำเสีย ด้านเครื่องสำอาง รวมทั้งด้านเภสัชกรรมและด้านการแพทย์ (สุวลี, 2544 ; Sandford, 1989) ทางด้านการแพทย์มีการนำไคโตซานมาใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์ เช่น เป็นผิวหนังเทียม เป็นวัสดุในการทำศัลยกรรม เป็นแคปซูลยา ช่วยในการเสริมสร้างกระดูกและฟันและเป็นวัสดุปิดแผล (สุวลี, 2544 ; Hirano, 1966) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำวัสดุปิดแผลจากไคโตซานได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถทำเป็นแผ่นฟิล์ม เส้นใย และไฮโดรเจล นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดได้ดี ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต สามารถสลายได้ดี เข้ากันได้กับอวัยวะต่างๆ ของร่างกายและย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (สุวลี, 2544 ; ปิยบุตร, 2545 ; Hirano, 1996)

ประเทศไทยมีการผลิตกุ้งและสัตว์น้ำอื่นๆ ส่งออกเป็นจำนวนมากทำให้มีเปลือกกุ้ง ปู และแกนปลาหมึกเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคตินและไคโตซาน ถ้านำไคโตซานจากของเหลือทิ้งมาใช้ผลิตแผ่นฟิล์มสำหรับปิดแผล นอกจากช่วยลดปริมาณของของเสียแล้ว ยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้มากขึ้น สำหรับแผ่นฟิล์มไคโตซานที่เหมาะสมสำหรับปิดแผลควรมีลักษณะยืดหยุ่นดี สามารถป้องกันเชื้อจุลินทรีย์จากนอกได้และสามารถดูดซับของเหลวจากบาดแผลได้ดี

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อผลิตแผ่นฟิล์มไคโตซานสำหรับเป็นวัสดุปิดแผล เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรค
2. เพื่อทดสอบสมบัติเชิงกลบางประการของแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผลิตได้ เช่น ค่าการต้านแรงดึง ค่าการยืด ณ จุดขาด ความสามารถในการบวมน้ำ เป็นต้น
3. ศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อเซลล์สัตว์ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ผลของไคโตซานต่อการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซม

1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาประยุกต์ใช้ให้เกิดมูลค่าเพิ่ม สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุปิดแผลของคนและสัตว์ได้อย่างปลอดภัย เป็นการลดการนำเข้าวัสดุปิดแผลจากต่างประเทศ เพื่อนำความรู้และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำโคโคซานมาใช้เป็นวัสดุปิดแผลที่ดีและราคาถูก

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ไคตินและไคโตซาน

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยหน่วยย่อยของ N-acetyl-D-glucosamine ต่อกันเป็นสายโซ่ยาวโดยพันธะ β - (1 \rightarrow 4) (รูปที่ 2.1) และมีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (Muzzarelli, 1977) ไคตินพบได้ในเปลือกของสัตว์ เช่น กุ้ง ปู แคนปลาหมึก แมลง และผนังเซลล์ของเห็ด รา และยีสต์ (Austin และคณะ 1981) ไคตินละลายได้ในกรดอินทรีย์ เช่น กรดเกลือ กรดกำมะถัน กรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิกที่ไม่มีน้ำไม่ละลายน้ำ ต่างจากเจลาติน แอลกอฮอล์ (Muzzarelli, 1977 ; Austin และคณะ 1981)

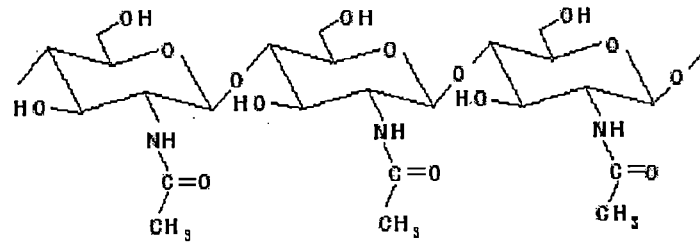
ไคตินที่ได้แต่ละแหล่งมีโครงสร้างและสมบัติแตกต่างกันโดยแบ่งตามลักษณะการเรียงตัวของสายโซ่ยาวเป็น 3 กลุ่ม (รูปที่ 2.2)

1. แบบแอลฟา มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะสวนทางกัน มีความแข็งแรงสูง ได้แก่ ไคตินจากเปลือกกุ้งและกระดองปู
2. แบบเบต้า มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในทิศทางเดียวกัน การจับกันจึงไม่ค่อยแข็งแรง มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแบบแอลฟา ได้แก่ ไคตินจากแกนและกระดองปลาหมึก
3. แบบแกมมา มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะที่ไม่แน่นอน (สวนทางกัน สลับทิศทางกัน) มีความแข็งแรงรองมาจากแบบแอลฟา ได้แก่ ไคตินจากเห็ดรา และพืชชั้นต่ำ

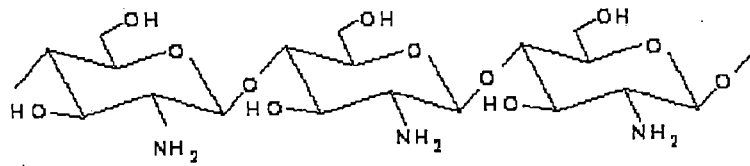
ไคโตซานเป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติ เป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ดึงหมู่ acetyl ของ N-acetyl-D-glucosamine ออกได้ glucosamine เรียกกระบวนการนี้ว่า deacetylation ไคโตซานพบได้จากผนังเซลล์ของราในสกุล *Mucor* *Phycomyces* *Absidia* *Choanephora* และ *Collectotricum* (McGahren, และคณะ, 1984)

การผลิตไคตินและไคโตซาน ผลิตได้จากของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประมง ในเปลือกของสัตว์ทะเลประเภทที่มีเปลือกแข็งพวกปลาหมึก กุ้ง และปู มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ โปรตีน 30 – 40 % แคลเซียมคาร์บอเนต 30 – 50 % ไคติน 20 – 30 % และสารอื่นๆ อีกเล็กน้อย เช่น รงควัตถุ ขั้นตอนการผลิตไคตินและไคโตซาน (Austin และคณะ, 1981 : Knorr, 1984) มีรายละเอียดดังนี้

1. การกำจัดโปรตีน (deproteination) โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายต่าง เช่น โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมโบคาร์บอเนต โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ที่นิยมใช้คือสารละลายต่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 – 10 % นำวัตถุดิบต้มกับสารละลายต่างที่อุณหภูมิประมาณ

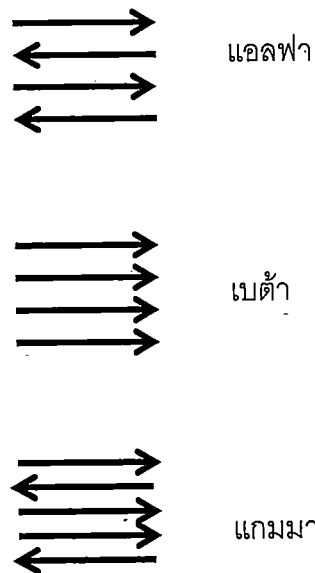


ไคติน



ไคโตซาน

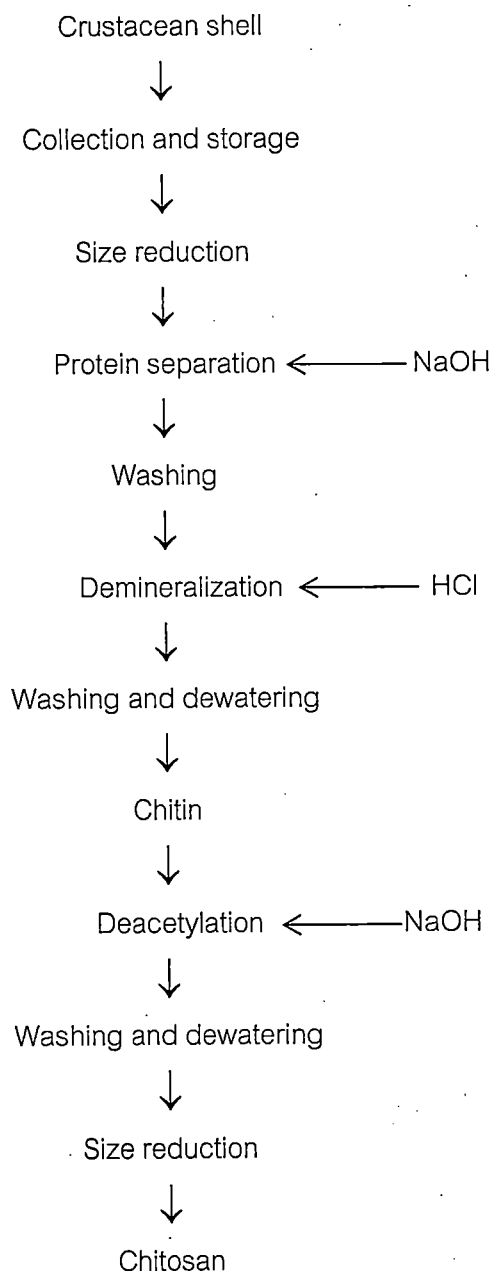
รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซาน
ที่มา : ศูนย์วิจัยสุขภาพไคติน-ไคโตซาน (2008)



รูปที่ 2.2 การเรียงตัวของสายไคติน

65 - 100°C. เป็นเวลา 0.5 - 6 ชม. ในกระบวนการนี้โปรตีนส่วนใหญ่ถูกกำจัดออกจากวัตถุดิบไขมันบางส่วนและ รัศควัตถุบางชนิดมีโอกาสถูกกำจัดออก

2. การกำจัดเกลือแร่ (demineralization) นำวัตถุดิบที่ผ่านการกำจัดโปรตีนแล้วมาทำปฏิกิริยากับสารละลายกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก กรดแอสติค เป็นต้น ส่วนมากใช้กรดไฮโดรคลอริก โดยนำวัตถุดิบแช่ในสารละลายกรดเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ในระหว่างนี้



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการผลิตไคตินและไคโตซาน
ที่มา : Knorr (1984)

ต้องมีการคนเป็นระยะๆ เป็นเวลา 2 วัน แคลเซียมคาร์บอเนตถูกเปลี่ยนเป็นแคลเซียมคลอไรด์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งจนมีพีเอชเป็นกลาง วัสดุที่เหลือคือไคติน

ไคตินที่ได้ถ้ามีรงควัตถุเหลืออยู่สามารถกำจัดออกด้วยกรดออกซาลิกหรือเอทานอล นอกจากนี้ยังใช้สารฟอกขาว เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หรือโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) หรือนำไคตินไปตากแดดก็สามารถกำจัดรงควัตถุได้

3 การกำจัดหมู่ acetyl (deacetylation) เป็นการเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตซาน โดยนำไคตินมาต้มกับสารละลายต่าง ที่นิยมใช้กันมาก คือ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 40% ที่อุณหภูมิ 115°C. เป็นเวลา 6 ชม. เป็นการลดหมู่ acetyl (CH_3CO) ที่ให้เย็นจากนั้นกรองและล้างตะกอนด้วยน้ำหลายๆ ครั้งจนพีเอชเป็นกลาง ไคโตซานที่ได้มีค่า การกำจัดหมู่ acetyl ประมาณ 80 – 82 %

ไคโตซานมีคุณสมบัติพื้นฐานที่เข้ากับธรรมชาติได้ดี มีขั้วที่ชอบน้ำ (hydrophilicity) วงเวต่อสารเคมี ละลายได้ดีในสารละลายกรดเจือจาง เช่น กรดไนตริก กรดแอซิติค และกรดฟอร์มิก (Knorr, 1984) แต่ไม่ละลายในสารละลายต่าง แอลกอฮอล์และอะซิโตน ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก สารละลายมีลักษณะขุ่นหนืด และมีความใส สามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เป็นเส้นใย เป็นเม็ด เป็นแผ่นบาง (สุวลี, 2544)

2.2 ประโยชน์ของไคโตซาน

ไคโตซานมีสมบัติในการต้านจุลินทรีย์บางชนิด เนื่องจากไคโตซานเป็นสารที่มีประจุบวก สามารถเกิดปฏิกิริยากับประจุลบบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการรั่วหรือแตกบริเวณผนังเซลล์ สารต่างๆ ภายในเซลล์ก็ไหลออกนอกเซลล์ ถ้าโมเลกุลขนาดเล็กของไคโตซาน (oligomer) ผ่านเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ เกิดการจับตัวกันของไคโตซานกับ DNA ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA การสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ถูกขัดขวาง

ประโยชน์ของไคโตซานในด้านต่างๆ มีดังนี้

1. ด้านอาหาร หลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคโตซานเป็นสารที่ใช้ผสมลงในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เนื่องจากไม่มีปฏิกิริยาต่อต้านจากร่างกายทั้งยังถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้จึงไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ไคโตซานนำไปใช้เป็นสารกันบูด สารถนอมอาหาร สารให้ความข้น สารรักษากลิ่นและรสชาติของอาหาร ใช้เป็นสารเคลือบอาหาร ผักและผลไม้ เพื่อรักษาความสดและผลิตในรูปแบบฟิล์มที่รับประทานได้ (edible film) สำหรับบรรจุอาหาร (สุวลี, 2544 ; Knorr, 1984)

2. ด้านการแพทย์ ไคโตซานเป็นสารตามธรรมชาติเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ไคโตซานใช้ลดระดับคลอเลสเทอรอลในเลือดจึงมีบทบาทในอาหารเสริมที่ใช้ลดไขมันและลดน้ำหนัก ใช้เป็นผิวหนังเทียม รักษาแผลไฟไหม้และน้ำร้อนลวก ใช้เป็นวัสดุปิดแผล ป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของเลือด ใช้รักษาและเสริมสร้างสุขภาพของกระดูกอ่อน ใช้ในระบบการนำส่งและปลดปล่อยยา และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน (สุวลี, 2544 ; Guan และคณะ, 1998 ; Sandford, 1989)

3. ด้านการเกษตร ไคโตซานที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ เรียกว่า oligomers มีประสิทธิภาพมากในเซลล์ ช่วยกระตุ้นกระบวนการป้องกันตัวเองของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ของพืช โดยมีผลไปกระตุ้นยีนของพืชให้เพิ่มการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น glucanase chitinase และ phytoalexins ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคที่เกิดจากราบางชนิด และถือว่าเป็น elicitor ชนิดหนึ่ง มีการนำไคโตซานมาเคลือบผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งมีประสิทธิภาพช่วยยืดอายุและป้องกันการเน่าเสีย ลดการสูญเสียน้ำ ป้องกันไม่ให้ผลไม้สุกเร็ว (สุวลี, 2544) นอกจากนี้ยังใช้ไคโตซานผสมในปุ๋ยน้ำสำหรับฉีดพ่น พบว่าสามารถติดกับผิวของพืช ผิวของดิน ทนต่อการถูกชะล้าง รวมทั้งลดการระเหยของน้ำ และเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยสารอาหารและยาให้กับพืช (Struszezyk และคณะ, 1989)

4. ด้านเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ไคโตซานมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำและเป็นร่างแหคลุมผิวหนัง ตลอดจนด้านจุลินทรีย์ต่างๆ มีการนำไคโตซานเป็นสารพื้นฐานและสารเติมแต่งในเครื่องสำอางหลายชนิด เช่น แป้งทาหน้าทั้งชนิดฝุ่นและชนิดแป้งแข็งเพื่อป้องกันเชื้อและป้องกันความชุ่มชื้น นอกจากนี้ยังนำไปผสมในแชมพู ครีมนวดผม สบู่ โลชั่น ลิปสติก เป็นต้น (สุวลี, 2544; Sandford, 1989)

5. ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ไคโตซานถูกนำมาใช้เพื่อเป็นสารห่อหุ้มเอนไซม์และเซลล์ต่างๆ ด้วยเทคนิคอิมโมบิไลเซชัน (Hayashi and Ikada, 1991) ใช้เป็นตัวแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟี การทำชีวไฟฟ้าทางชีวภาพ (สุวลี, 2544 ; Takeda, 1978) นำมาทำเป็นแผ่นเยื่อบางเพื่อใช้ในการกรองแยกด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น ไดอะไลซิส อัลตราฟิลเตรชัน และรีเวอร์ออสโมซิส เป็นต้น ใช้ในการตกตะกอนเพื่อดึงเอาสารอื่นๆ ลงมาเป็นกลุ่มของตะกอน รวมทั้งโลหะหนัก และสีที่อยู่ในน้ำ เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ใช้ในการทำให้น้ำสะอาดและบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการดื่ม และน้ำที่ ต้องการความบริสุทธิ์มากเพื่อประโยชน์ด้านการวิจัย (สุวลี, 2544 ; Muzzarelli, 1977)

2.3 แผ่นปิดแผล

ในระยะแรกแผ่นปิดแผลมี 2 ชนิด คือ แผ่นปิดแผลที่ทำด้วยผ้า (Gauze-based dressing) และผ้าปิดแผลที่มียารักษาบาดแผล (Paste bandages) ในปี คศ. 1980 มีการพัฒนา

แผ่นปิดแผลให้มีสมบัติดีขึ้น คือ มีการรักษาบาดแผล ดูดซับความชื้น และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Vanessa, 2008)

คุณสมบัติของแผ่นปิดแผลที่ดีมีลักษณะต่อไปนี้

1. รักษาความชื้นบริเวณผิวหนังของบาดแผล และดูดซับกลิ่นได้ดี
2. สามารถดูดซับของเหลวที่ไหลจากบาดแผล และมีการแลกเปลี่ยนก๊าซและของเหลวได้ดี
3. มีลักษณะเป็นฉนวนป้องกันความร้อน
4. ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้บนผิวหนัง หรือไม่มีความเป็นพิษกันเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนัง
5. ป้องกันจุลินทรีย์หรือการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ได้ดี
6. แผ่นปิดบาดแผลสามารถดึงออกได้ง่าย ไม่ติดกับบาดแผลและมีการยืดหยุ่นได้ดี

แผ่นปิดแผลแบ่งได้ออกเป็น 3 ชนิด (Paul and Sharma, 2004)

1. Passive products เป็นแผ่นปิดแผลแบบดั้งเดิมใช้ปิดบริเวณบาดแผลภายนอก ได้แก่ ผ้าก๊อซ หรือผ้าใยสังเคราะห์ เป็นต้น
2. Interactive products เป็นแผ่นปิดแผลที่ทำจากพอลิเมอร์ มีลักษณะใสหรือโปร่งแสง ยอมให้น้ำและออกซิเจนผ่านเข้าออกได้และป้องกันไม่ให้แบคทีเรียผ่านเข้ามาได้ เช่น ไฮโดรเจล ไฮโดรคอลลอยด์ แผ่นปิดแผลพลาสติก เป็นต้น
3. Bioactive products เป็นแผ่นปิดแผลที่ทำจากวัสดุทางธรรมชาติสามารถช่วยรักษาบาดแผลด้วย เช่น คอลลลาเจน อัลจีเนต ไคโตซาน เป็นต้น

2.4 การผลิตแผ่นปิดแผลจากไคโตซาน

การนำไคโตซานมาทำวัสดุปิดแผลได้รับความนิยมอย่างมาก โครงสร้างของไคโตซานมีลักษณะเป็นเหมือนตาข่ายคล้ายฟองน้ำที่มีช่องว่างเล็กๆ จึงทำให้ไคโตซานมีสมบัติในการดูดซับน้ำได้ดี ยอมให้อากาศผ่านได้ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดได้ดี (Hirano, 1996)

การศึกษาการผลิตแผ่นปิดแผลจากไคโตซานและคุณสมบัติของแผ่นปิดแผลที่ผลิตจากไคโตซาน มีดังนี้

ไคโตซานเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่ไม่เป็นพิษ (non-toxic) กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต และย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Khan และคณะ, 2000) ไคโตซานมีสมบัติเด่นที่สามารถใช้ในงานด้านการแพทย์ คือ ไคโตซานสามารถสมานแผล รักษาแผลไฟไหม้ ทำผิวหนังเทียม รักษากระดูกและ

เอ็น ทำไหมเย็บแผลที่ละลายได้ นอกจากนี้เป็นสารปลดปล่อยยาอย่างช้าๆ และควบคุมการย่อยสลายของเอ็นไซม์ (สุวดี, 2544)

Papineau และคณะ (1991) รายงานว่าโคโตซานที่ผสมแล็กเตตและโคโตซานที่ผสมกลูตาเมตมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* และ *Saccharomyces cereiviae* ได้

Chen และคณะ (1996) พบว่าแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ผลิตได้โดยใช้กรดแอซิดิกสามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhodotorula rubra* และ *Penicillium notatum*

Butler และคณะ (1996) พบว่าแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ได้เหมาะกับการใช้เป็นพลาสติกปิดแผล เนื่องจากมีคุณสมบัติช่วยให้เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการเกาะติดกัน นอกจากนี้เมื่อเติมสารบางชนิดลงไปผสมกับโคโตซาน ช่วยให้เกิดแผ่นฟิล์มเร็วขึ้น การเติมกลีเซอรอลทำหน้าที่เป็น plasticizer และช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของแผ่นฟิล์มโคโตซาน

Oungbho และ Muller (1997) พบว่าการรวมตัวของโคโตซานและเจลาติน ทำให้แผ่นโคโตซานมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ และมีคุณสมบัติดูดซึมของเหลวที่เกิดขึ้นบริเวณบาดแผลได้

Khan และคณะ (2000) ทำการเตรียมแผ่นฟิล์มโคโตซานเพื่อใช้เป็นวัสดุปิดแผล (wound dressing) โดยใช้โคโตซาน 1.4% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ กรดแล็กติก 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และกรดแอซิดิก 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำมาทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ได้ เช่น tensile strength elongation at break in vitro bioadhesive strength water vapor permeability พบว่าแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ได้จากการสารละลายในกรดแล็กติกมีความอ่อนตัว และยืดหยุ่นได้ดีกว่าแผ่นฟิล์มที่ได้จากสารละลายในกรดแอซิดิก นอกจากนี้แผ่นฟิล์มไม่ก่อให้เกิดผื่นแดงบริเวณผิวหนัง และไม่มีความเป็นพิษ

Tajima และคณะ (2000) ผลิตแผ่นฟิล์มปิดแผลจากเอ็นซัคซินิลโคโตซาน (N-succinyl chitosan) ผสมเจลาติน แผ่นปิดแผลที่ได้มีความอ่อนและดูดซับน้ำได้ดี ไม่มีความเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิต เมื่อนำไปปิดแผลพบว่าช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่พร้อมกับทำให้บาดแผลมีขนาดเล็กลง

Mi และคณะ (2001) เตรียมแผ่นฟิล์มโคโตซานที่มีลักษณะเป็นรูคล้ายฟองน้ำ (spong-like-asymmetric chitosan) เมื่อทดสอบสมบัติพบว่าก๊าซออกซิเจนสามารถซึมผ่านแผ่นฟิล์มได้ดี รวมทั้งช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำ และป้องกันเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกได้ดี

เมธาและคณะ (2004) ศึกษาการเตรียมแผ่นโคโตซานจากสารละลายกรดแอซิดิกหรือกรดแล็กติกที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแผ่นโคโตซานที่เตรียมจากสารละลายกรดแล็กติกมีคุณสมบัติยืดหยุ่นดี เหนียวและมีเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สูงกว่าแผ่นโคโตซานที่เตรียมจากสารละลายแอซิดิกเมื่อใช้ความเข้มข้นเดียวกัน สำหรับแผ่นโคโตซานที่เตรียมจาก

สารละลายกรดแอสติคไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดที่ใช้เตรียมแผ่นฟิล์มไคโตซานมีผลทำให้ค่าการผ่านของ ไอ้ น้ำเพิ่มมากขึ้นด้วย แผ่นไคโตซานที่เตรียมในสารละลายกรดแลคติกมีค่าการผ่านของไอ้ น้ำสูงกว่าตัวอย่างที่เตรียมในสารละลายกรดแอสติค

Deng และคณะ (2007) ทำแผ่นฟิล์มปิดแผลจากไคโตซานผสมเจลาติน โดยทดสอบสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการใช้สารยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น เซฟราดีน ซิโปรฟลาซาซิน และเพนนิซิลิน เมื่อนำแผ่นฟิล์มไปใช้กับบาดแผลที่เกิดจากการผ่าตัด พบว่าแผ่นฟิล์มปิดแผลไคโตซานนี้สามารถยับยั้ง *E. coli* K88 ได้ดีกว่าเพนนิซิลิน และยับยั้ง *Streptococcus* ได้ดีกว่าเซฟราดีน เมื่อพิจารณาบาดแผลที่ปิดด้วยแผ่นฟิล์มไคโตซานผสมเจลาตินช่วยลดขนาดของบาดแผลให้เล็กลง บาดแผลหายเร็วกว่าเมื่อใช้ผ้าปิดแผลชุปวาสลิน ดังนั้นแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมเจลาตินเป็นวัสดุที่เหมาะสมในการรักษาบาดแผลได้ดี และป้องกันจุลินทรีย์ที่จะเข้าบาดแผลด้วย

2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

การทดสอบความเป็นพิษของแผ่นฟิล์มไคโตซานที่มีต่อเซลล์สัตว์ กระทำได้ 2 แบบ ดังนี้ (Schiraldi และคณะ, 2004)

1. การทดสอบโดยตรง (direct method) ศึกษาโดยใช้เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (human lymphoblastoid cell line) เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย (suspension culture) โดยปลูกเซลล์จำนวน 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหาร DMEM เสริมด้วยซีรัม 10 % ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงที่มีแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ต้องการทดสอบอยู่ด้วย บ่มเซลล์ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37° ซ. คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % บ่มนาน 24 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนับจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย โดยเทคนิคการย้อมสีทริปแทน บลู

2. การทดสอบโดยอ้อม (indirect method) Schiraldi และคณะ (2004) อธิบายวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นฟิล์มไคโตซาน โดยการนำแผ่นฟิล์มที่ต้องการทดสอบ แช่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 24 ชม. ต่อมาแยกแผ่นฟิล์มออกไป นำส่วนที่เป็นของเหลวจากการสกัด (fluid extract) นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3T3 ต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้คือ 100 % และ 50 % ระยะเวลาการบ่มเซลล์ใน fluid extract เท่ากับ 24 ชม. เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย นำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่า ดัชนีการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (the cell proliferation inhibition, CPII) ค่าที่ได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ จากสูตรต่อไปนี้

$CPII = 100\% - (\text{mean cell number of test culture} - \text{mean cell number of control} \times 100)$

Neamark และคณะ (2007) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นฟิล์มไคโตซาน (H-chitosan) โดยทดสอบกับเซลล์ไลน์ L929 (mouse connective tissue) ซึ่งประยุกต์วิธีการทดสอบจากวิธีการตรวจสอบมาตรฐาน ISO10993-5 โดยนำแผ่นฟิล์มที่ต้องการทดสอบ แच्छงในเอทานอล 70 % นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยอาหารเพาะเลี้ยง 3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ลงในอาหาร โดยปรับอัตราส่วน น้ำหนักแผ่นฟิล์ม: ปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 10:1 (มก./มล.) และบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 24 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชม. นำของเหลวที่สกัดได้ ทำการเจือจางเป็น 2 เท่า แบบต่อเนื่อง ให้มีความเข้มข้น ดังนี้ 1, 0.5 และ 0.25 มก./มล. ต่อมาทำการปลูกเซลล์ L929 ลงใน 96-well plate จำนวนเซลล์เท่ากับ 10³ เซลล์/หลุม บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 48 ชม. จากนั้นดูดอาหารเก่าทิ้ง แล้วเติมของเหลวที่สกัดจากแผ่นฟิล์มไคโตซาน ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ใส่ลงไปแทน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 24 ชม. ทำการตรวจสอบเซลล์มีชีวิตโดย MTT assay

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 แบคทีเรีย

Bacillus subtilis

E. coli

Micrococcus luteus

Pseudomonas fluorescens

Serratia marcescens

Staphylococcus aureus

3.1.2 เซลล์เม็ดเลือดขาวของคน

เซลล์ไลน์ L929 (mouse connective tissue)

3.1.3 วัสดุและอุปกรณ์

ตู้เขี่ยเชื้อ ; ISSCO

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ; MEMMERT

ตู้ควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

ตู้อบฆ่าเชื้อ ; MEMMERT

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ; EUTECH

หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ; HIRAYAMA

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ; SHIMADZU

เครื่องหมุนเหวี่ยง ; FALCON 6/300

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ; SARTORIUS

เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง ; SARTORIUS

ไมโครมิเตอร์ ; PIPETMAN

เครื่อง Texture analyzer ; LLOYD

เครื่อง Microplate reader ; LABSYSTEMS

กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ ; NIKON

ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ผิว 25 ตารางเซนติเมตร

จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร

ปิเปตต์แก้วขนาด 1 5 และ 10 มิลลิเมตร

เครื่องดูดสารอัตโนมัติ

อุปกรณ์และเครื่องแก้วต่างๆ ; PYREX

3.1.4 สารเคมี

โคโคซานอบแห้ง (80% deacetylation) บริษัท สยามไบโอเน็ท จำกัด

เมทานอล ; CARLO

กลีเซอรอล ; AJAX FINECHEM

ฟีนอล ; MERCK

กรดแลกติก ; AJAX FINECHEM

กรดแอสติติก ; MERCK

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ; MERCK

โซเดียมซัลไฟต์ ; MERCK

โพแทสเซียมคลอไรด์ ; CARLO

โซเดียมคลอไรด์ ; MERCK

โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิค ; MERCK

โพแทสเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิค ; MERCK

เอนไซม์ไลโซไซม์ ; FULKA

โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ; MERCK

3, 5 – dinitrosalicylic acid ; MERCK

Phytohemagglutinin – M ; GIBCO

Heparin ; LEO

Colchimid ; BIONEST

Giemsa stain ; MERCK

Mitomycin C ; KYOWA

RPMI medium 1640 ; GIBCO

อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM

ซีรัม

ทริปทีน-อีดีทีเอ

สารละลาย HBSS

น้ำ DI

ทริปแทน บลู

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มโคโตซาน

เตรียมสารละลายผสมของกรดแอซิดิกเข้มข้น 1% และกรดแลคติกเข้มข้น 1% ในอัตราส่วนต่างๆ กัน ดังนี้ กรดแอซิดิก : กรดแลคติกเท่ากับ 100 : 0 70 : 30 50 : 50 และ 30 : 70 จากนั้นนำผงโคโตซาน (ที่ผ่านการบดให้มีขนาดเล็กด้วยเครื่องบด) 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายกรดที่เตรียมไว้ กวนด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก พร้อมให้ความร้อนประมาณ 50°C. จนกระทั่งได้สารละลายเนื้อเดียวกัน กรองสารละลายโคโตซานที่ได้ด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเศษผงที่ไม่ละลายออก จากนั้นนำสารละลายโคโตซานแต่ละสูตรแช่ในตู้เย็นปิดด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์เพื่อกำจัดฟองอากาศในสารละลายออก ใช้เวลาประมาณ 1 – 2 วัน

เทสารละลายโคโตซานแต่ละสูตรปริมาตร 25 มล. ลงในแบบพิมพ์ที่ทำด้วยแก้ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแผ่นฟิล์มแห้ง แช่แผ่นฟิล์มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 24 ชม. นำแผ่นฟิล์มโคโตซานทั้งหมดมาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จนน้ำกลั่นมีค่าพีเอชเป็นกลาง นำแผ่นฟิล์มเปียกที่ได้มาวัดความหนาโดยใช้ไมโครมิเตอร์และนำมาทดสอบคุณสมบัติเชิงกล ได้แก่ ค่าการต้านแรงดึง (Tensile strength) ค่าการยืด ณ จุดขาด (% Elongation at break) ตามวิธีของ Khan และคณะ (2000.) ด้วยเครื่อง Texture analyzer ทำการทดสอบแผ่นฟิล์มโคโตซานเปียกที่ได้ในแต่ละสูตร (แต่ละชุดการทดลอง ทำ 3 ซ้ำ) เพื่อหาอัตราส่วนของกรดแอซิดิกและกรดแลคติกที่เหมาะสม เพื่อให้ได้แผ่นฟิล์มโคโตซานที่มีคุณสมบัติดีที่สุดไปศึกษาต่อไป

3.2.2 การเตรียมแผ่นฟิล์มโคโตซานผสมกลีเซอรอล

เตรียมแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.2.1 โดยเติมกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 1 1.5 2 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในสารละลายโคโตซาน ทำการกวนด้วยแท่งกวนแม่เหล็กจนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน ทำการไล่อากาศและนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มตามขั้นตอนต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.2.1 นำแผ่นฟิล์มโคโตซานเปียกที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติเชิงกล คือ ค่าการต้านแรงดึง และค่าการยืด ณ จุดขาด เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มโคโตซานเปียกที่ไม่ได้ผสมกลีเซอรอล

3.2.3 ศึกษาการบวมตัวของแผ่นฟิล์มโคโตซาน

ศึกษาการบวมตัวของแผ่นฟิล์มโคโตซานที่มีคุณสมบัติเชิงกลดีที่สุดจากการทดลองในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 โดยวิธีดัดแปลงของ Schiraldi และคณะ (2004) ดังนี้ นำแผ่นฟิล์มเปียก (ความชื้น 70%) มาตัดให้มีขนาด 1 x 1 ซม. ชั่งน้ำหนักแผ่นฟิล์มก่อนแช่ในสารละลายต่างๆ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มไปใส่ในเพลทหลุมที่มีจำนวน 24 หลุม ที่เติมอาหาร RPMI สารละลาย PBS พีเอช 7.4 และน้ำกลั่น หลุมละ 1 มล. นำแต่ละเพลทบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. ตรวจสอบการพองตัว

ทุกๆ ช่วงเวลาดังนี้ 1 3 5 7 9 24 48 และ 72 ชม. แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ โดยการซังหาน้ำหนักของแผ่นฟิล์มที่เพิ่มขึ้น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าการพองตัวของแผ่นฟิล์มใน RPMI สารละลาย PBS และน้ำกลั่น

3.2.4 ศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มไคโตซานโดยเอนไซม์ไลโซไซม์

นำแผ่นฟิล์มที่มีคุณสมบัติดีที่สุดจากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 แบบเปียกมาตัดให้มีขนาด 1×3 ซม. ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำแผ่นฟิล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ไลโซไซม์ละลายใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ปริมาตร 3 มล. (กำหนดให้เอนไซม์ไลโซไซม์มีกิจกรรมเท่ากับ 1000 หน่วยต่อมล.) เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ใส่แผ่นฟิล์มไคโตซานในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่ไม่เติมเอนไซม์ บ่มหลอดทดลองทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 – 48 ชม. จากนั้นนำน้ำใสในแต่ละหลอดมาวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS (ภาคผนวก ข)

3.2.5 ศึกษาการย่อยแผ่นฟิล์มไคโตซานโดยแบคทีเรีย

เตรียมอาหารสูตรดัดแปลง M-9 (ภาคผนวก ก) โดยแบ่งอาหารเป็น 2 สูตร สูตรที่ 1 ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ เป็นแหล่งไนโตรเจน สูตรที่ 2 ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121° ซ. นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เมื่ออาหารเย็นเติมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชม. ที่มีค่าความขุ่น 0.2 ลงในอาหารแต่ละสูตร หลอดละ 0.2 มล. จากนั้นนำแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกที่ฆ่าเชื้อแล้วตามวิธีในข้อ 3.2.4 ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน สำหรับหลอดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง M-9 ที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง คือ *Bacillus subtilis* *E.coli* *Micrococcus luteus* *Serratia marcescens* *Pseudomonas fluorescens* และ *Staphylococcus aureus* หลังจากบ่มครบ 5 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดอาหารแต่ละหลอดมาวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS

3.2.6 ศึกษาการผ่านแผ่นฟิล์มไคโตซานของแบคทีเรีย

นำแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกขนาด 3×3 ซม. ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางบนอาหาร Nutrient agar ในจานเพาะเชื้อ นำแผ่นตาปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ที่หยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย 0.2 มล. (มีค่าความขุ่น 0.2) วางบนแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกตรงจุดกึ่งกลางแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ คือ *Bacillus subtilis* *E.coli* *Micrococcus luteus* *Serratia marcescens* *Pseudomonas fluorescens* และ *Staphylococcus aureus* นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 5 วัน แบคทีเรียที่ผ่านแผ่นฟิล์มได้จะเจริญบนผิวหน้าอาหารใต้แผ่นฟิล์ม

3.2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929

1. ชั่งแผ่นฟิล์มโคโตซาน เท่ากับ 280 มก.
2. ทำการฆ่าเชื้อแผ่นฟิล์มโคโตซาน ที่อุณหภูมิ 121 ° ซ. นาน 20 นาที
3. นำแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในขวดที่มีอาหาร DMEM ที่เสริมด้วยซีรัม 10 % โดยปรับน้ำหนักแผ่นฟิล์มโคโตซานต่ออาหาร เท่ากับ 20 มก./มล. นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.
4. แยกส่วนที่เป็นของเหลวซึ่งเป็นสารสกัดโคโตซานออกมา และทำการปลดเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร สารสกัดที่ได้ มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มก./มล. จากนั้นทำการเจือจางในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 5 2.5 1.25 0.625 และ 0.3125 มก./มล. และกลุ่มควบคุม คืออาหารเลี้ยงเซลล์ แต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 2 ซ้ำ
5. ทำการปลูกเซลล์ L929 จำนวน 2×10^5 เซลล์/มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มม. ปริมาตรเซลล์แขวนลอยเท่ากับ 2 มล.ต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.
6. ดูดอาหารเก่าทิ้ง จากนั้นเติมอาหารที่หมักแผ่นฟิล์มและเจือจางดังรายละเอียดในข้อ 4. ลงในจานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.
7. เมื่อครบกำหนดเวลา 24 48 และ 72 ชม. ดูดอาหารที่หมักในข้อ 6. ทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วย HBSS เพื่อขจัดซีรัมทิ้ง จากนั้นเติม 0.025 % ทริปซิน-อีดีทีเอ 1 มล./ 1 จานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 5 นาที และตรวจดูการหลุดออกของเซลล์อย่างต่อเนื่อง
8. ทำการหยุดการทำงานของทริปซิน โดยการเติมอาหารที่มีซีรัม ลงไป 1 มล./1 จานเพาะเลี้ยง
9. ดูดเซลล์แขวนลอย 0.4 มล. ใส่ลงในหลอดปั่นสารขนาด 1.5 มล. แล้วเติมสีทริปแทน บลู ลงไป 0.1 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูใส่ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ ทำการนับเซลล์มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ต่อไป

3.2.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว

ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำของคนสุขภาพดีคนละ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีสารเฮปาริน (50 I.U. ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร) เขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัวนำเลือดที่ได้จำนวน 8 หยด ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี Fetal Bovine Serum 10% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร โดย

เทคนิคปลอดเชื้อ ปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ 37° ซ. เมื่อบ่มครบชั่วโมงที่ 67 เติมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 Negative control (untreated control) เติมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร

ชุดที่ 2 Positive control เติมสารก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม คือ Mitomycin C 5 ไมโครกรัม

ชุดที่ 3 Treatment เป็นชุดทดสอบ โดยเติมสารละลายโคโคซานที่ใช้เตรียมแผ่นฟิล์ม ในระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากนั้นนำชุดการทดลองทั้ง 3 ชุด ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. และก่อนครบเวลา 72 ชั่วโมง ประมาณ 30 นาที เติมสารละลายโคโคไซด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในอาหารทั้ง 3 ชุด นำไปบ่มต่อจนครบ 72 ชม.

เมื่อครบเวลาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำสารละลายจากชุดการทดลองต่างๆ เทใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เทน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายไปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์พองตัว และโครโมโซมภายในเซลล์กระจายออกเพื่อง่ายต่อการศึกษา นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำส่วนใสทิ้งทำซ้ำเป็นจำนวน 2 ครั้ง

ทำให้เซลล์คงสภาพโดยใช้น้ำยาคงสภาพ (fixative solution) ซึ่งประกอบด้วยเมทานอล 3 ส่วน และกรดแอสติก 1 ส่วน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำเป็นจำนวน 2 ครั้ง พบว่าตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอดคือ กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นเติมน้ำยาคงสภาพลงไปอีก 3 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน นำเซลล์ที่ได้หยดลงบนสไลด์ที่สะอาด 1 – 2 หยด โดยให้แต่ละหยดอยู่ห่างกัน และหยดซ้ำรอยเดิมด้วยน้ำยาคงสภาพ ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง ทำการย้อมสีโครโมโซมด้วยสีจีมาซา (Giemsa) ความเข้มข้น 10 % (ละลายใน phosphate buffer pH 7.2) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเมื่อสไลด์ตัวอย่างแห้ง นำไปตรวจนับโครโมโซมของเซลล์ในระยะเมทาเฟส (metaphase) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลความผิดปกติที่เกิดขึ้น ดังนี้

1. ศึกษาความเป็นพิษของสารที่มีต่อเซลล์ (Cytotoxicity) วัดจากค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index หรือ MI) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวใน 2,000 เซลล์ของกลุ่มทดลองต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ในจำนวน 2,000 เซลล์ของกลุ่มควบคุม ดังนี้

$$\text{Mitotic index} = (A/B) \times 100$$

เมื่อ A = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสของเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในกลุ่มทดลอง

B = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสของเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในกลุ่ม Negative control

2. คีโมซาสารที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม ตรวจดูเซลล์ระยะเมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายดี (แต่ละเซลล์มีจำนวนโครโมโซม 46 แท่ง) วิธีตรวจผลโดยนับจำนวนการหักของโครโมโซมจากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ จดบันทึกลักษณะการหักตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 Single Chromatid Gap (SG) เกิดช่องว่างขึ้นในส่วนของโครมาทิดแท่งใดแท่งหนึ่ง แต่ยังไม่ขาดออกจากกัน แนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน การหัก 1 ตำแหน่งลักษณะนี้ บันทึกเป็น 1 SG

2.2 Isochromatid Gap (ISCG) เกิดช่องว่างขึ้นในส่วนของโครมาทิดทั้งสองแท่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ยังไม่ขาดออกจากกัน แนวการหักของทั้งสองโครมาทิดอยู่ในแนวเดียวกัน การหัก 2 ตำแหน่งในลักษณะนี้บันทึกเป็น 1 ISCG

2.3 Single chromatid break (SB) โครมาทิดแท่งใดแท่งหนึ่งหักออกจากกันโดยสมบูรณ์ ปลายของโครมาทิดที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน การหัก 1 ตำแหน่งในลักษณะนี้บันทึกเป็น 1 SB

2.4 Isochromatid Break (ISCB) โครมาทิดทั้งสองแท่งหักออกจากกันโดยสมบูรณ์ ปลายของโครมาทิดที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน การหัก 2 ตำแหน่งในลักษณะนี้บันทึกเป็น 1 ISCB

นับจำนวนการหักของโครโมโซมทั้งหมด และคำนวณหาค่าเฉลี่ยของลักษณะการหักในแต่ละกลุ่ม (ใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา 3 ซ้ำ) บันทึกภาพความผิดปกติที่เกิดขึ้น

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ผลของอัตราส่วนของกรดแอซิดต่องดแลคติกเพื่อเตรียมแผ่นฟิล์มไคโตซาน

การเตรียมแผ่นฟิล์มไคโตซานความเข้มข้น 2% เมื่อใช้สารละลายกรดแอซิดเข้มข้น 1% และกรดแลคติก 1% ในอัตราส่วน 100 : 0 70 : 30 50 : 50 และ 30 : 70 พบว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานแห้งที่ได้มีลักษณะไม่แตกต่างกัน คือ แผ่นฟิล์มมีลักษณะบาง ผิวเรียบ สีเหลืองใส แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่นต่ำ เมื่อนำแผ่นฟิล์มไคโตซานแห้งไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่ได้มาล้างน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจนมีค่าพีเอชเป็นกลาง ได้แผ่นฟิล์มไคโตซานเปียก มีลักษณะดังนี้ แผ่นฟิล์มเปียกมีสีเหลืองใส ผิวหน้าเรียบ มีลักษณะนุ่ม และมีความยืดหยุ่นดีขึ้น นำแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกแต่ละสูตรมาวัดความหนา พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกรดแลคติกมากขึ้นแผ่นฟิล์มจะมีความหนากว่าสูตรที่ไม่เติมกรดแลคติก ดังแสดงในตารางที่ 4.1

เมื่อนำแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกแต่ละสูตรมาศึกษาสมบัติเชิงกล คือค่าการต้านแรงดึง ค่าการยืด ณ จุดขาด เพื่อคัดเลือกแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด พบว่า แผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกที่เตรียมจากสารละลายกรดแอซิด 1% มีความหนา 15.63 ไมโครเมตร มีค่าการต้านแรงดึง 33.73 N/mm² มีค่าการยืด ณ จุดขาด 76.06% ดังแสดงในตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

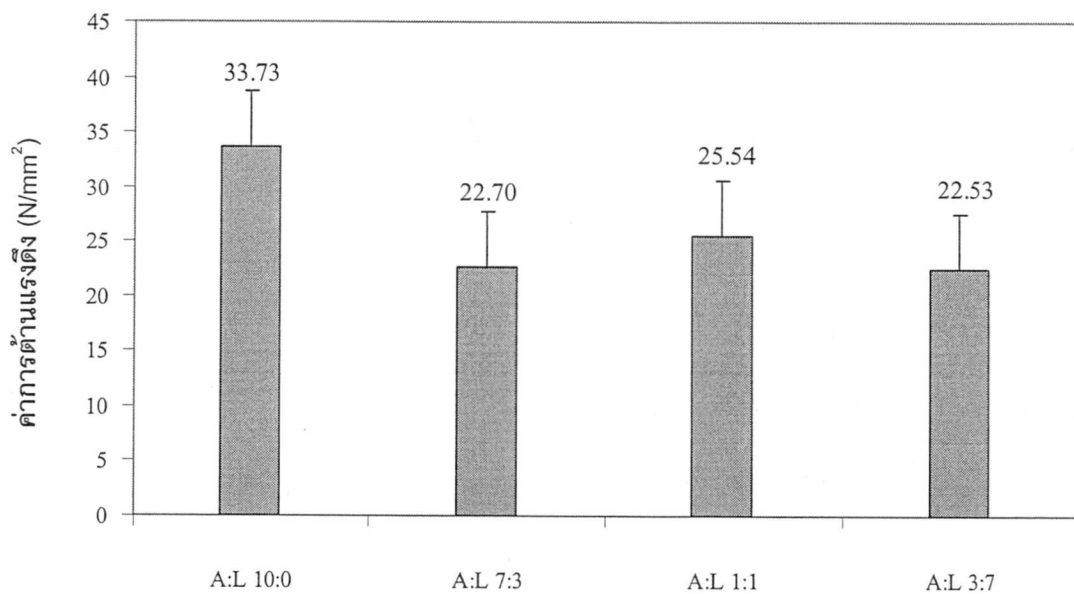
ตารางที่ 4.1 ความหนา ค่าการต้านแรงดึง และค่าการยืด ณ จุดขาดของแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกที่เตรียมจากสารละลายกรดแอซิดและกรดแลคติกในอัตราส่วนต่างๆ กัน

อัตราส่วน กรดแอซิด : กรดแลค ติก	ค่าความหนา (ไมโครเมตร)	ค่าการต้านแรงดึง (N/mm ²)	ค่าการยืด ณ จุดขาด (%)
100 : 0	15.63	33.73	76.06
70 : 30	16.12	22.70	59.22
50 : 50	18.21	25.54	78.48
30 : 70	17.92	22.53	66.16

แผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกที่เตรียมจากสารละลายกรดแลคติกในอัตราส่วน 70 : 30 จะได้แผ่นฟิล์มที่มีความหนา 16.21 ไมโครเมตร มีค่าการต้านแรงดึง 22.70 N/mm² ค่าการยืด ณ จุดขาด 59.22%

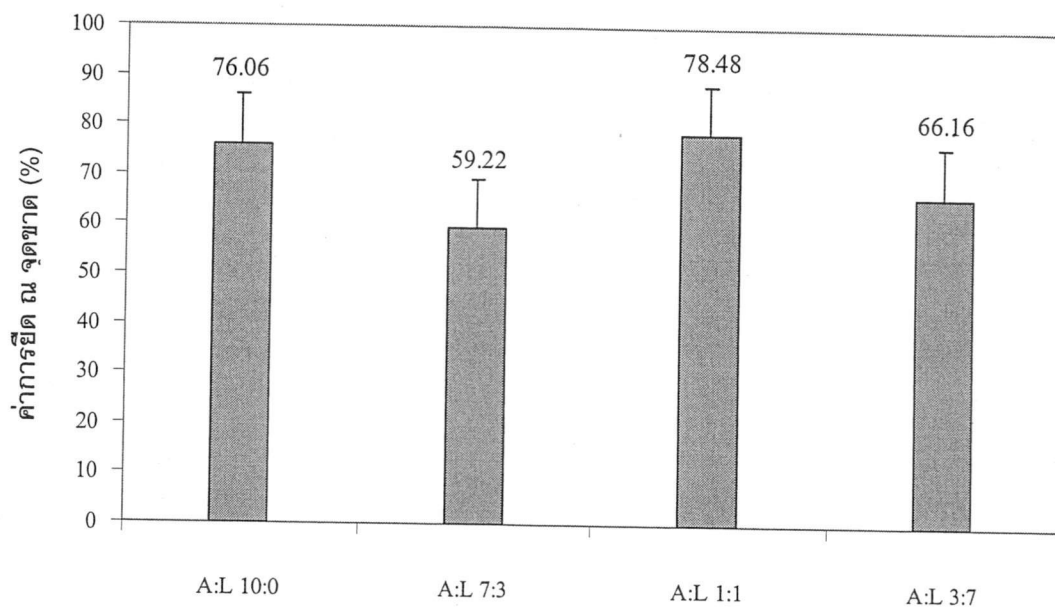
แผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกที่เตรียมจากสารละลายกรดแอซิติกและกรดแลคติกในอัตราส่วน 50 : 50 แผ่นฟิล์มมีความหนา 18.21 ไมโครเมตร มีค่าการต้านแรงดึง 25.54 N/mm² ค่าการยืด ณ จุดขาด 78.48%

สำหรับแผ่นฟิล์มที่ได้จากสารละลายกรดแอซิติกและกรดแลคติกในอัตราส่วน 30 : 70 พบว่าฟิล์มมีความหนา 17.92 ไมโครเมตร ค่าการต้านแรงดึง 22.53 N/mm² และค่าการยืด ณ จุดขาด 66.16% ดังแสดงในตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.1 และ 4.2



อัตราส่วนระหว่างกรดแอซิติก(A)และกรดแลคติก(L)

รูปที่ 4.1 ค่าการต้านแรงดึงของแผ่นฟิล์มไคโตซานแบบเปียก



อัตราส่วนระหว่างกรดอะซิติก(A)และกรดแล็กติก(L)

รูปที่ 4.2 ค่าการยืด ณ จุดขาดของแผ่นฟิล์มไคโตซานแบบเปียก

จากสมบัติของแผ่นฟิล์มไคโตซานที่เตรียมได้ จึงเลือกใช้แผ่นฟิล์มไคโตซานที่ละลายในสารละลายกรดอะซิติก 1% เนื่องจากมีค่าการต้านแรงดึงสูงสุดและค่าการยืด ณ จุดขาดใกล้เคียงกับแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ละลายในสารละลายผสมระหว่างกรดอะซิติกและกรดแล็กติกในอัตราส่วน 50 : 50 เมธาและคณะ (2004) พบว่าสารละลายกรดที่นำมาใช้ในการเตรียมแผ่นฟิล์มมีผลต่อสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มไคโตซาน แผ่นฟิล์มที่ได้จากสารละลายกรดอะซิติกมีความเหนียวและแข็งแรงกว่าแผ่นฟิล์มที่ได้จากสารละลายกรดแล็กติก

4.2 ผลของกลีเซอรอลต่อการเตรียมแผ่นฟิล์มไคโตซาน

นำสารละลายของไคโตซาน (ไคโตซาน 2 กรัม ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 1%) มาผสมกับ กลีเซอรอลในเปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน คือ 1 1.5 2% จากนั้นนำไปใส่ในแม่พิมพ์เปรียบเทียบลักษณะของแผ่นฟิล์มไคโตซาน และแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมกลีเซอรอล พบว่าลักษณะของแผ่นฟิล์มแห้งคล้ายกัน คือ แผ่นฟิล์มบางใส สีเหลืองอ่อน มีความยืดหยุ่นต่ำ เมื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มเปียก มีลักษณะสีเหลืองใส ผิวสัมผัสนุ่ม มีความชื้นประมาณ 70 – 75% และมีความยืดหยุ่นดี ผลการศึกษาลักษณะเชิงกลของแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกที่ผสมกลีเซอรอล มีดังนี้

แผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมกลีเซอรอล 1% มีความหนา 18.48 ไมโครเมตร ค่าการต้านแรงดึงเท่ากับ 21.25 N/mm² และค่าการยืด ณ จุดขาด 64.81% สำหรับแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมกลีเซอรอล 1.5% มีความหนา 20.26 ไมโครเมตร ค่าการต้านแรงดึง 23.50 N/mm² ค่าการยืด ณ จุด

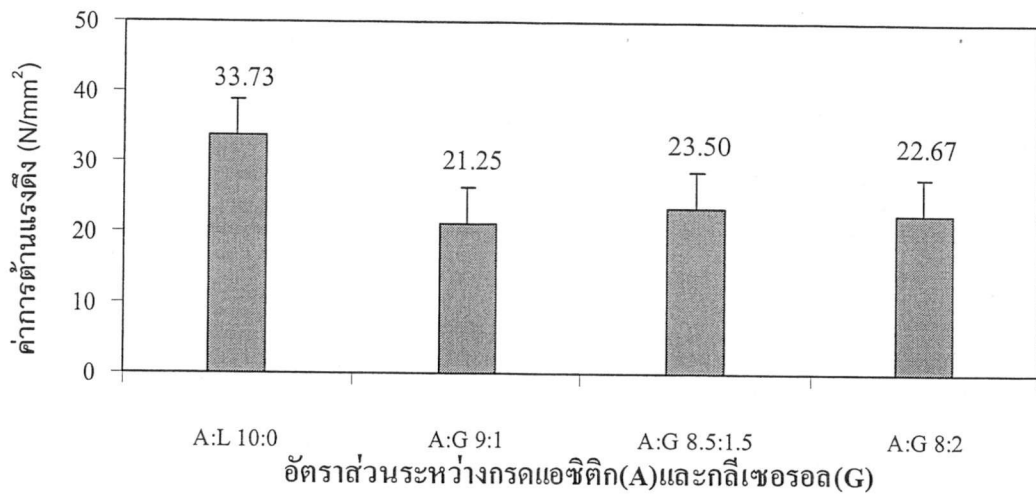
ขาดเท่ากับ 71.74% แผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมกลีเซอรอล 2% มีความหนา 23.16 ไมโครเมตร ค่าการต้านแรงดึง 22.67 N/mm² และค่าการยืด ณ จุดขาด 81.01% ดังแสดงในตารางที่ 4.2 รูปที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.2 ความหนา ค่าการต้านแรงดึง และค่าการยืด ณ จุดขาด ของแผ่นฟิล์มไคโตซาน เปียกที่ผสมกลีเซอรอล

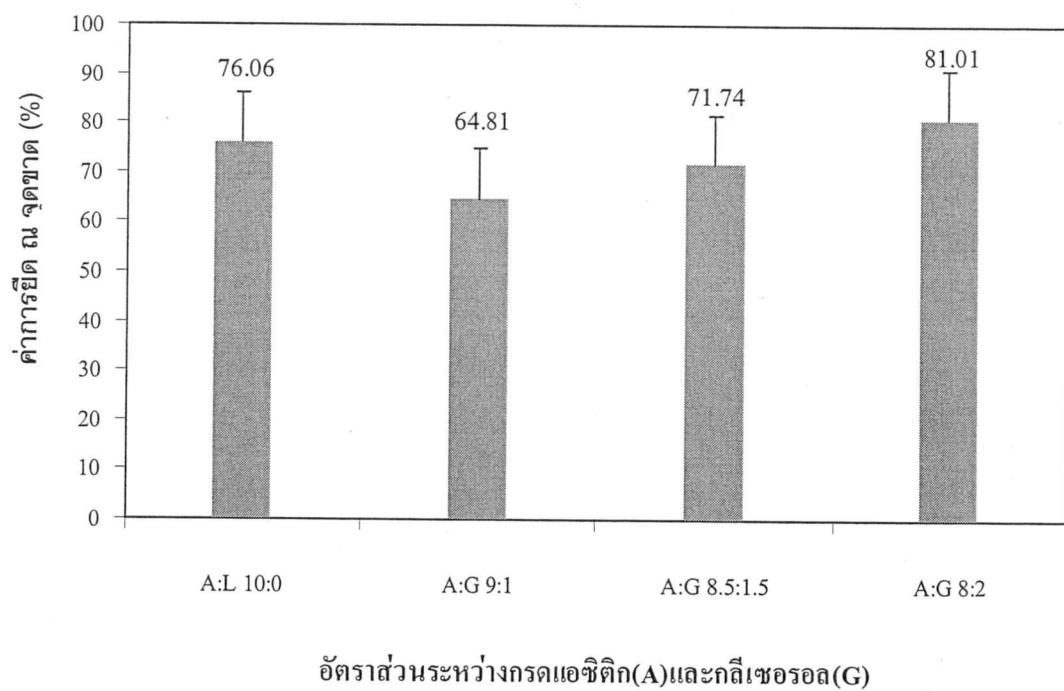
เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล (ปริมาตร/ปริมาตร)	ค่าความหนา (ไมโครเมตร)	ค่าการต้านแรงดึง (N/mm ²)	ค่าการยืด ณ จุดขาด (%)
0	15.63	33.73	26.06
1	18.48	21.25	64.81
1.5	20.26	23.50	71.74
2	23.16	22.67	81.01

เมื่อเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมกลีเซอรอลกับแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ไม่ผสมกลีเซอรอล (ผงไคโตซาน 2 กรัม ในกรดแอซิติกเข้มข้น 1%) พบว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ไม่ผสมกลีเซอรอล มีความหนา 15.63 ไมโครเมตร ค่าการต้านแรงดึง 33.73 N/mm² ซึ่งมากกว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมกลีเซอรอล (1 1.5 และ 2%) สำหรับค่าการยืด ณ จุดขาด มีค่าน้อยกว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมกลีเซอรอล 2% เล็กน้อย แสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4

กลีเซอรอลที่ผสมในแผ่นฟิล์มไคโตซาน ทำให้แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่น และมีค่าการซึมผ่านไอน้ำสูง แต่พบว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ผสมกลีเซอรอลถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า และเกิดการยุบหลังจากแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (นพรัตน์และไพรัตน์, 2541) ดังนั้นจึงเลือกแผ่นฟิล์มไคโตซานปกติมาศึกษาสมบัติอื่นต่อไป



รูปที่ 4.3 ค่าการต้านแรงดึงของแผ่นฟิล์มไคโตซานผสมกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ไม่ผสมกลีเซอรอล



รูปที่ 4.4 ค่าการยืด ณ จุดขาดของแผ่นฟิล์มไคโตซานผสมกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ไม่ผสมกลีเซอรอล

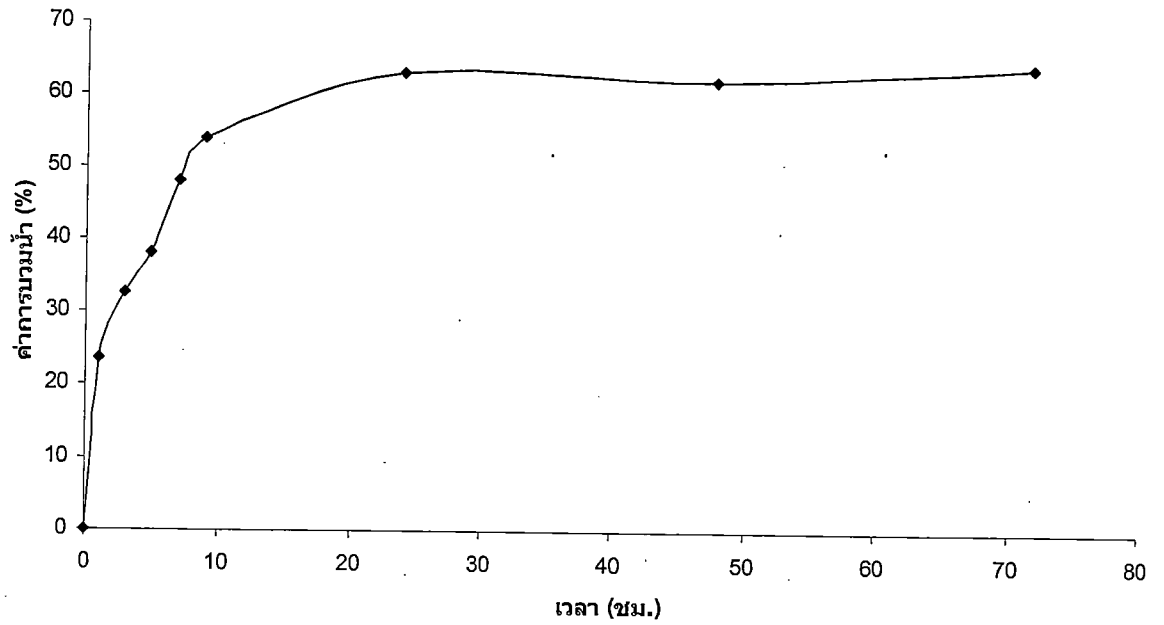
4.3 ผลการศึกษาการบวมน้ำของแผ่นฟิล์มไคโตซาน

การทดสอบการบวมน้ำของแผ่นฟิล์มไคโตซานแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการดูดซับน้ำ โดยใช้ น้ำกลั่น สารละลาย PBS และอาหาร RPM I ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชม. เพราะเมื่อนำไปเป็นวัสดุปิดแผลจะมีของเหลวที่เกิดจากบาดแผล ทำการซังหาน้ำหนักของแผ่นฟิล์มไคโตซานในช่วงเวลาต่างๆ กัน จนถึง 72 ชม. เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การบวมน้ำที่สมดุล พบว่าเมื่อใช้น้ำกลั่นการบวมน้ำของแผ่นฟิล์มเท่ากับ 51.80 % ในชั่วโมงที่ 9 และแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกสามารถบวมน้ำได้ 70.58 % ในชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 สำหรับการบวมน้ำของแผ่นฟิล์มเมื่อใช้สารละลาย PBS และอาหาร RPM I พบว่าสามารถบวมน้ำได้ 67.96 % และ 64.44 % ตามลำดับในชั่วโมงที่ 72 แสดงให้เห็นว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกมีความสามารถดูดซับน้ำและของเหลวได้ดี มีค่าการบวมน้ำอยู่ระหว่าง 64 – 70% ดังแสดงในตารางที่ 4.3 รูปที่ 4.5 – 4.7

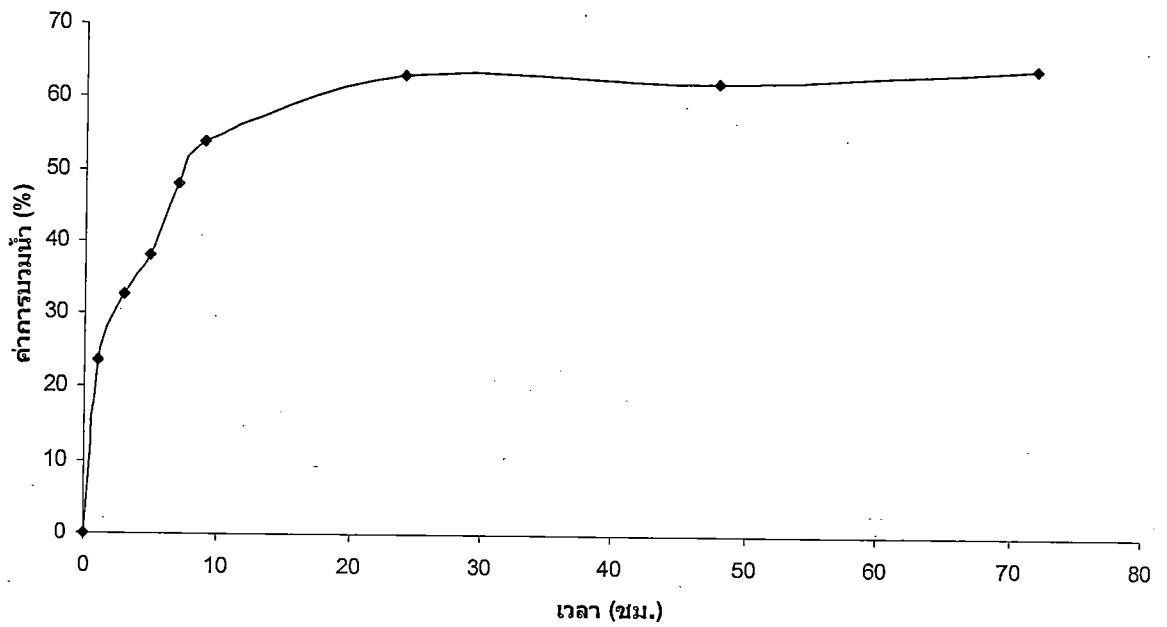
จากผลการศึกษาพบว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียก (ที่มีความชื้น 70-75%) เตรียมได้จากสารละลายกรดแอสติค มีความสามารถบวมน้ำได้ 70% ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับเมธาและคณะ (2004) พบว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานที่เตรียมจากสารละลายกรดแอสติค 0.5 โมลาร์ และ 1.0 โมลาร์ สามารถบวมน้ำได้ 70% โดยแผ่นฟิล์มมีลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงเป็นผลดีเมื่อนำไปใช้เป็นวัสดุปิดแผล

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของแผ่นฟิล์มไคโตซาน

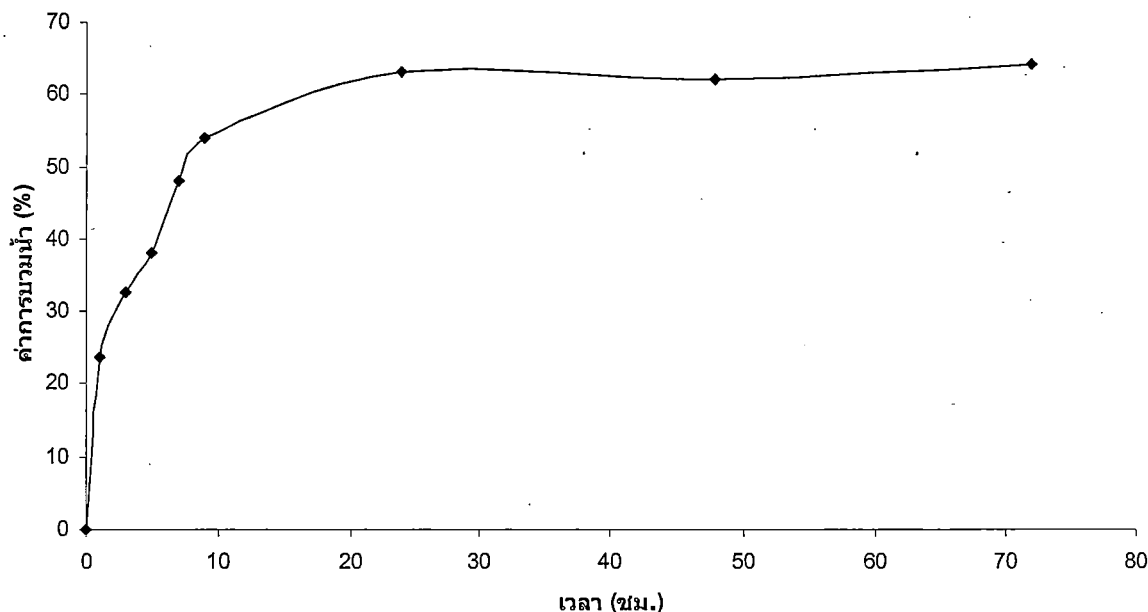
เวลา (ชม.)	ค่าการบวมน้ำ (%)		
	น้ำกลั่น	PBS	RPMI
1	21.24	33.32	23.61
3	31.82	44.72	32.58
5	36.82	46.16	38.01
7	37.54	50.06	48.05
9	51.80	48.30	53.90
24	59.36	56.56	63.05
48	67.04	57.78	62.24
72	70.58	67.96	64.44



รูปที่ 4.5 เปอร์เซนต์การบวมน้ำของแผ่นฟิล์มโพลีแลคโตซานเปียกในน้ำกลั่น



รูปที่ 4.6 เปอร์เซนต์การบวมน้ำของแผ่นฟิล์มโพลีแลคโตซานเปียกในสารละลาย PBS



รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การบวมน้ำของแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกในอาหาร RPMI

4.4 ผลการย่อยแผ่นฟิล์มไคโตซานโดยเอนไซม์ไลโซไซม์

เมื่อนำแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกบ่มกับสารละลายเอนไซม์ไลโซไซม์ (1000 หน่วยต่อมล.) ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้อง พีเอช 7 เป็นเวลา 24 – 48 ชม. เมื่อครบเวลานำน้ำใส่จากหลอดมาวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS พบว่าไม่พบน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง แสดงว่าไม่มีน้ำตาลกลูโคซามีเกิดขึ้น ดังนั้นเอนไซม์ไลโซไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียและจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถย่อยแผ่นฟิล์มไคโตซานได้

4.5 ผลการย่อยแผ่นฟิล์มไคโตซานโดยแบคทีเรีย

เมื่อนำแผ่นฟิล์มไคโตซานเปียกใส่ลงในอาหารสูตรดัดแปลง M-9 และเติมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบลงในอาหาร แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ *Bacillus subtilis* *E.coli* *Micrococcus luteus* *Pseudomonas fluorescens* *Serratia marcescens* และ *Staphylococcus aureus* นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบเวลานำสารอาหารเหลวมาทดสอบการย่อยแผ่นฟิล์มโดยนำมาวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธี DNS และดูความขุ่นจากการเจริญของแบคทีเรีย รวมทั้งตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของแผ่นฟิล์มกับชุดควบคุม (ที่ไม่ได้ใส่เชื้อแบคทีเรีย) พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ทดสอบมีการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยและไม่สามารถวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารได้ แต่พบว่าแบคทีเรียเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-9 ที่เติมยีสต์สกัดดีกว่าอาหาร M-9 ที่เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อดูลักษณะของแผ่นฟิล์ม

ในหลอดอาหารควบคุมกับหลอดอาหารที่เติมเชื้อแบคทีเรีย พบว่าลักษณะของแผ่นฟิล์มไม่มีความแตกต่างกัน แต่ลักษณะของแผ่นฟิล์มที่จมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะพองตัว มากกว่าส่วนบนของแผ่นฟิล์มที่อยู่เหนือผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองแสดงว่าแผ่นฟิล์มโคโตซานที่เตรียมขึ้นไม่ถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโคโตซานได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสิริรัตน์ และคณะ (2546) ที่พบว่าโคโตซานมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *E.coli* *Staphylococcus aureus* *Vibrio cholerae* และ *Salmonella weltevreden* เมื่อใช้สารละลายโคโตซานเข้มข้น 0.1%

4.6 ผลการศึกษาการผ่านแผ่นฟิล์มโคโตซานของแบคทีเรีย

หลังจากหยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย 0.2 มล. บนแผ่นตาปลาและนำมาวางบนแผ่นฟิล์มโคโตซาน เป็นเวลา 5 วัน ทำการตรวจเชื้อแบคทีเรียใต้แผ่นฟิล์มทุกวัน โดยใช้หลอดเชื้อตะแคงอาหาร NA ใต้แผ่นฟิล์ม นำไปเขี่ยบนอาหาร NA ในจานเพาะเชื้อใหม่ พบว่าในวันที่ 1 และวันที่ 2 แบคทีเรียทุกชนิดไม่สามารถผ่านแผ่นฟิล์มมาด้านล่างได้ จึงไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง หลังจากวันที่ 3 ไปแล้ว พบว่ามีแบคทีเรียเจริญบนแผ่นฟิล์มโคโตซานได้ แต่ไม่พบว่ามีแบคทีเรียผ่านแผ่นฟิล์มได้ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากมีการซึมผ่านของสารอาหารจากอาหาร NA จากด้านล่างผ่านแผ่นฟิล์มโคโตซานขึ้นมาด้านบน การที่แบคทีเรียไม่สามารถผ่านแผ่นฟิล์มโคโตซานได้ แสดงว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีขนาดใหญ่กว่ารูบนแผ่นฟิล์มโคโตซาน แต่ยอมให้ของเหลวผ่านได้ ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Mi และคณะ (2000) พบว่าแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ผ่านการกำจัดกรดออกโดยการแช่ในสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์และไฮเดียมคาร์บอเนตสามารถป้องกันเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้

4.7 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.3125 มก./มล. ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม เมื่อป้อนาน 24 48 และ 72 ชม. ค่าการยับยั้งเท่ากับ 5.44 9.35 และ 9.62 % ตามลำดับ และพบว่าการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดโคโตซานมากขึ้น และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ มากที่สุดที่ความเข้มข้น 5.0 มก./มล. เมื่อป้อนาน 24 48 และ 72 ชม. ค่าการยับยั้งเท่ากับ 28.75 36.18 และ 30.66 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.8

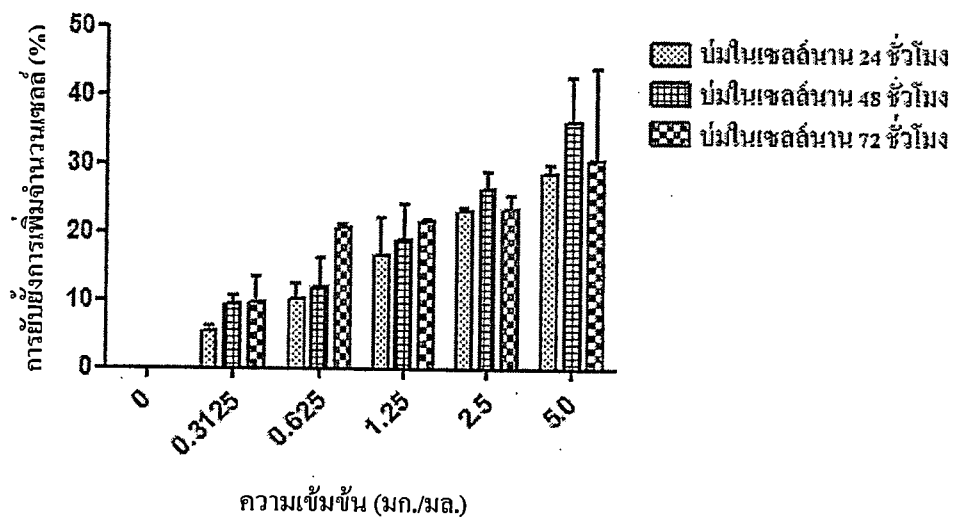
ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation inhibition index, CPII) เมื่อป้อนเซลล์ไลน์ L929 ในสารสกัดโคโคซาน นาน 24 48 และ 72 ชม.

ความเข้มข้นของสารสกัด จากแผ่นฟิล์มโคโคซาน (มก./มล.)	ระยะเวลาป้อน (ชม.)	ค่าเฉลี่ย* การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (%)
0	24	0±0 ^h
	48	0±0 ^h
	72	0±0 ^h
0.3125	24	5.44±0.73 ^{gh}
	48	9.35±1.27 ^{gh}
	72	9.62±3.73 ^{gh}
0.625	24	10.29±2.10 ^{fg}
	48	11.82±4.43 ^{efg}
	72	20.65±0.57 ^{bcde}
1.25	24	16.57±5.62 ^{def}
	48	18.97±5.21 ^{cdef}
	72	21.78±0.13 ^{bcd}
2.5	24	23.10±0.61 ^{bcd}
	48	26.43±2.52 ^{bcd}
	72	23.47±1.96 ^{bcd}
5.0	24	28.75±1.13 ^{abc}
	48	36.18±6.46 ^a
	72	30.66±13.22 ^a

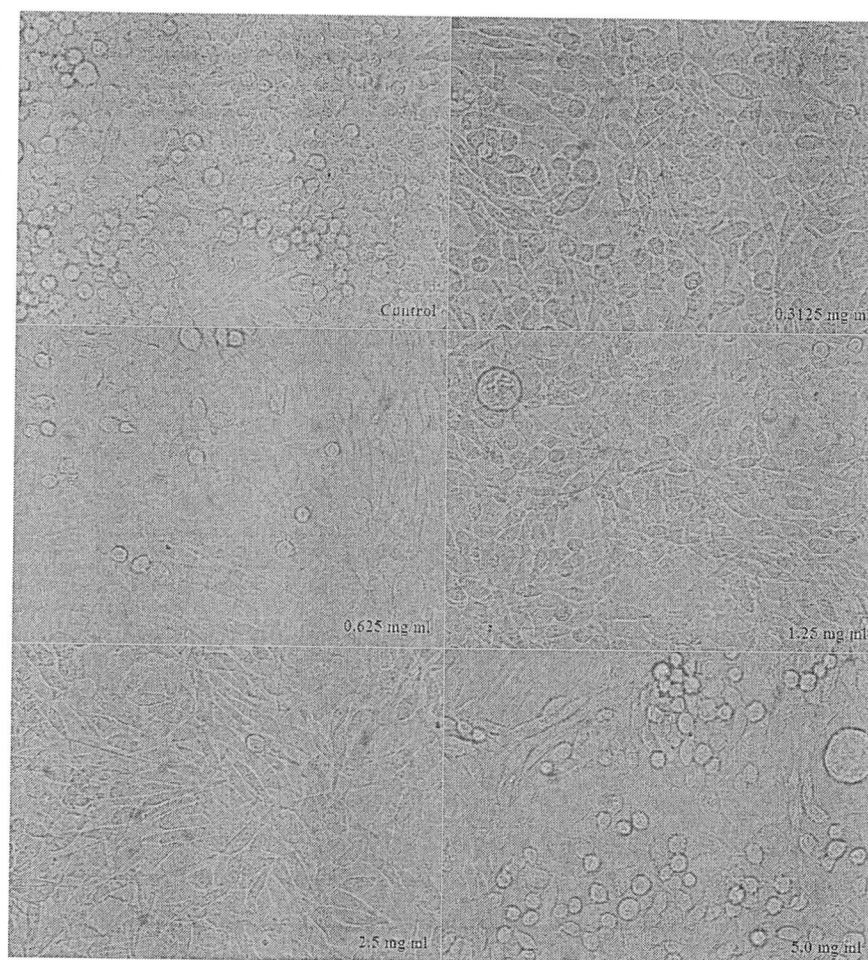
* ตัวอักษรที่อยู่เหนือตัวเลขในคอลัมน์เดียวกัน ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ที่ป้อนในสารสกัดโคโคซาน เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชม. โดยวิธีดันแคน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % พบว่าการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ช่วงเวลาที่ป้อน (ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.8) ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 ในอาหาร DMEM เสริมด้วยซีรัม 10% และเพาะเลี้ยงในสารสกัดโคโค

ซาน ความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5.0 มก./มล. โดยบ่มเป็นเวลา 72 ชม. พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่พบในแต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน ยกเว้นที่ความเข้มข้น 1.25 และ 5.0 มก./มล. พบเซลล์บวมโต 1 เซลล์ (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.8 การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์ L929 เมื่อบ่มในสารสกัดจากแผ่นฟิล์มไคโตซาน ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการบ่มต่างกัน



รูปที่ 4.9 เซลล์ไลน์ L929 เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM เสริมด้วยซีรัม 10% และในสารสกัดจากแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดนาน 72 ชม. (กำลังขยาย 200X)

4.8 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว

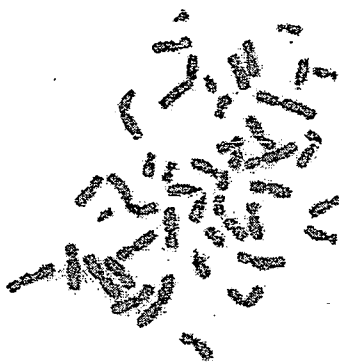
จากการนำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารละลายโคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามระยะเวลาและสภาวะที่กำหนด พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์ลดลง โดยมีค่า mitotic index เท่ากับ 78.07 63.55 57.72 และ 42.90% ตามลำดับ โดยกลุ่ม negative control ที่เป็นกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100% และกลุ่ม positive control มีค่า mitotic index เท่ากับ 53.97% ดังแสดงในตารางที่ 4.5 เมื่อนำค่าอัตราการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวของทุกระดับความเข้มข้นมาเปรียบเทียบกันพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานในอาหารเลี้ยงเซลล์มากขึ้นทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลง ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการแบ่งตัวในระยะเมทาเฟสเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารละลายโคโตซานความเข้มข้นต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control

เมื่อตรวจสอบการหักของโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในทุกความเข้มข้น พบว่าทุกระดับความเข้มข้นไม่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซมค่าเฉลี่ยจำนวนการหักของโครโมโซมที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เท่ากับ 0.02 0.0 0.08 และ 0.06 ตามลำดับ โดยกลุ่ม negative control มีค่าเป็น 0.0 ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ลักษณะของโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะเมทาเฟสที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารละลายโคโคซานแสดงในรูปที่ 4.10 และลักษณะของโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม positive control ที่เติมสารละลาย Mitomycin C มีค่าเฉลี่ยจำนวนการหักของโครโมโซมมีค่าเป็น 0.96 ในรูปแบบของ single chromatid gap (SG) single chromatid break (SB) isochromatid gap (ISCG) และ isochromatid break (ISCB) ดังแสดงในรูปที่ 4.11

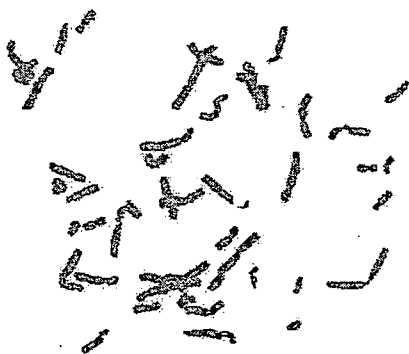
ดังนั้นสารละลายโคโคซานมีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์โดยเป็นตัวยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitotic inhibitor) หรือเรียกว่าเป็นสารชนิด mitotic poison วัตถุประสงค์อัตราการแบ่งเซลล์ พบว่าการแบ่งเซลล์ลดลงแปรผันกับปริมาณความเข้มข้นของสารละลายที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Guggi และคณะ (2004) ที่ศึกษาความเป็นพิษของสารละลายโคโคซานในรูปแบบต่างๆ กับเซลล์ L929 ด้วยวิธี MTT assay พบว่าที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้นเช่นกัน สารประเภท mitotic poison นี้จะเป็นสารที่มีผลกับ mitotic apparatus (Hsu และคณะ, 1983) โดยไปยับยั้งการทำงานของ centrioles, spindle fiber, microtubules หรือ kinetochore นอกจากนี้ยังพบว่าสาร mitotic poison มีผลให้โครโมโซมไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อมีการแบ่งเซลล์ทำให้เซลล์ลูก (daughter cell) ที่ได้จากการแบ่งเซลล์ได้รับสารพันธุกรรมไม่เท่ากัน เซลล์ลูกมีโครโมโซมที่ผิดปกติ และยังพบว่าอาจเป็นอันตรายกับการแบ่งเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์สืบพันธุ์

ตารางที่ 4.5 ผลของสารละลายโคโคซานที่มีต่อ Mitotic index และค่าเฉลี่ยจำนวนการหักของโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 50 เซลล์

ความเข้มข้นสารละลายโคโคซาน (มก./มล.)	Mitotic index	ค่าเฉลี่ยจำนวนหักของโครโมโซมต่อเมทาเฟสเซลล์ 50 เซลล์
0.0	100.0	0.0
0.5	78.07	0.02
1.0	63.55	0.0
1.5	57.72	0.08
2.0	42.90	0.06
Mitomycin C	53.97	0.96



รูปที่ 4.10 ลักษณะของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับจากสารละลายโคโคซาน



รูปที่ 4.11 ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติของกลุ่ม positive control ที่ได้รับจากสารละลาย Mitomycin C

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาพบว่าแผ่นฟิล์มไคโตซานที่มีสมบัติที่ดีที่สุดเตรียมจากไคโตซาน 2% ละลายในกรดแอซิติกเข้มข้น 1% ลักษณะแผ่นฟิล์มที่ได้มีลักษณะสีเหลืองใส ผิวหน้าเรียบ นุ่ม และมีความยืดหยุ่นดี มีความชื้นประมาณ 70% เมื่อนำมาศึกษาสมบัติเชิงกลพบว่ามีความต้านแรงดึง 33.73 N/mm² ค่าการยืด ๓ จุดขาด 76.06% เมื่อนำมาผสมกิลีเซอร์รอลระหว่าง 1 – 2% ได้แผ่นฟิล์มไคโตซานมีลักษณะสีเหลืองใส ผิวสัมผัสนุ่ม มีความยืดหยุ่นดี มีความต้านแรงดึงอยู่ระหว่าง 21.25 – 23.50 N/mm² และค่าการยืด ๓ จุดขาดอยู่ระหว่าง 64.81 – 81.01% เมื่อนำแผ่นฟิล์มไคโตซาน (2% ไคโตซานละลายใน 1% กรดแอซิติก) มาศึกษาความสามารถในการบวมน้ำในสารละลาย PBS อาหาร RPMI และในน้ำกลั่นโดยบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ค่าการบวมน้ำเท่ากับ 67.96 64.44 และ 70.58% ตามลำดับ

แผ่นฟิล์มไคโตซานที่ได้ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลโซไซม์ และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* *E.coli* *Micrococcus luteus* *Pseudomonas fluorescens* *Serratia marcescens* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้แผ่นฟิล์มไคโตซานยังสามารถป้องกันการผ่านของแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดได้

เมื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929 ที่เลี้ยงในอาหาร DMEM เสริมเซรั่ม 10% และเติมสารสกัดไคโตซานเข้มข้น 0.3125 0.625 1.25 2.5 และ 5.0 มก./มล. พบว่าการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดไคโตซานเพิ่มมากขึ้น การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. เท่ากับ 30.66% ศึกษาผลของสารละลายไคโตซานต่อการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน พบว่าสารละลายไคโตซานมีผลต่อการแบ่งเซลล์โดยทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้น คือ ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก./มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่า mitotic index เท่ากับ 78.07 63.55 57.72 และ 42.90% ตามลำดับ แต่ไม่มีผลต่อการหักของโครโมโซม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำแผ่นฟิล์มไคโตซานไปทดลองเปิดแผลที่เกิดขึ้นจริงเพื่อดูประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผล
2. ควรศึกษาสมบัติเชิงกลเพิ่มเติม เช่น การซึมผ่านของไอน้ำและการซึมผ่านของออกซิเจน
3. ควรพัฒนาสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มให้ดีขึ้นโดยผสมสารที่เพิ่มความต้านแรงดึง ค่าการยืด ๓ จุดขาด เป็นต้น

บรรณานุกรม

- นพรัตน์ มะเห และไพรัตน์ โสภโณดร. 2541. ผลของสารผสมต่อคุณสมบัติของฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากไคโตซาน. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 20(4) : 445 – 454.
- ปิยบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545. ไคติน – ไคโตซาน. [online] Available : <http://www.kmutt.ac.th/organization/research/intellect>
- เมธา รัตนกรพิทักษ์ ชลธิชา เหล็กกล้า ดวงเดือน จรโคกกรวด และพิเชษฐ์ ธีรโอ่ง. 2540. การศึกษาผลของสารละลายกรดที่ใช้ในการเตรียมแผ่นไคโตซานต่อสมบัติการบวมน้ำและการผ่านของไอน้ำ Naresuan University Journal. 12(3) : 17 – 26.
- ศูนย์วัสดุชีวภาพไคติน-ไคโตซาน 2002 ของเหลือจากทะเลสู่ไคติน – ไคโตซาน. [online] Available : <http://www.material.chula.ac.th/chitosan>
- สิริรัตน์ จงฤทธิพร อธิยา กังสุวรรณ และสุดีป कुमारรักชิต. 2546. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยไคโตซาน วารสารการประมง. 56(2) : 139 – 143.
- สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2544. การประยุกต์ใช้ไคติน/ไคโตซาน เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร หน้า 52 – 58.
- Austin, D.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P. 1981. Chitin : New facets research. Science. 212 : 749 – 753.
- Butler, B.L, Vergano, P.J., Testin, R.F., Bunn, J.M. and Wiles, J.L. 1996. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. J. Food Sci. 61 : 953 – 955.
- Chen, M., Yeh, G. and Chiang, B.H. 1996. Antimicrobial and physiochemical properties of methyl cellulose and chitosan films containing a preservative. J. Food Proc. Press. 20 : 379 – 390.
- Cheng, C.Y. and Li, Y. 2000. An *Aspergillus* chitodanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. Biotechnol. Appl. Biochem. 32 : 197 – 203.
- Deng, C.-M., He, L.-Z., Zhao, M., Yang, D. and Liu, Y. 2007. Biological properties of the chitosan – gelatin spong wound dressing. Carbohydr. Polym. 69 : 583 – 589.
- Guan, Y.L., Liu, X.F., Zhang, Y.P. and Yao, K.D. 1998. Study of phase behavior on chitosan/viscose rayon blend film. J. Appl. Polym. Sci. 67 : 1965 – 1972.

- Guggi, D., Langoth, N., Hoffer, M.H., Wirth, M. and Bernkop-Schnürch, A. 2004. Comparative evaluation of cytotoxicity of a glucosamine-TBA conjugate and a chitosan-TBA conjugate. *Int. J. Pharm.* 278: 353–360.
- Hayashi, T. and Ikada, Y. 1991. Protease immobilization onto porous chitosan beads. *J. Appl. Polym. Sci.* 46 : 1147 – 1150.
- Hirano, S. 1996. Chitin biotechnology applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2 : 237 – 258.
- Hsu, T.C., Liang, J.C. and Shirley, L.R. 1983. Aneuploidy induction by mitotic arrestants: Effects of diazepam on diploid Chinese hamster cells. *Mutation Res. Lett.* 122: 201-209.
- Khan, T.A., Peh, K.K. and Ching, H.S. 2000. Mechanical, bioadhesive strength and biological evolution of chitosan film for wound dressing. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3 : 303 – 311.
- Knorr, D. 1984. Use of chitosan polymers in food. *Food Technol.* 38 : 58 – 97.
- McGahren, W.J., Perkinson, G.A., Growich, J.A., Leese, R.A. and Ellestand, G.A. 1984. Chitosan by fermentation. *Process Biochem.* 19 : 88 - 90
- Mi, F.L., Shyu, S.S., Wu, Y.B., Lee, S.T., Shyong, J.Y. and Hauang, R.N. 2001. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials.* 22 : 165 – 173.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 : 426 – 428.
- Muzzarelli, R.A.A. 1977. Chitin. Pergamon Press, New York. 309 p.
- Neamnark, A., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Bunaprasert, T., Supaphol, P. and Rujiravanit, R. 2007. *In vitro* biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film. *Carbohydr. Polym.* 68: 116-172.
- Oungbho, K. and Muller, B.W. 1997. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. *Int. J. Pharm.* 156 : 229 - 237.
- Papineau, A.M., Hoover, D.G., Knorr, D. and Farkas, D.F. 1991. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *J. Food. Biotech.* 5 : 45 – 47.

- Paul, W. and Sharma, C.P. 2000. Chitosan and alginate dressings : A short review. *Trend Biomater. Artif. Organs.* 18(1) : 18 – 23.
- Sandford; P.A. 1989. Chitosan : commercial uses and potential applications, pp. 51-69. In G. Skjak-Braek, T. Anthonsen and P. Sandford.(eds) *Chitin and Chitosan.* Elsevier Applied Science, London.
- Schiralde, C., D'Agostino, A, Oliva, A, Flamma, F., De Rosa, A., Apicella, A., Aversa, R. and De Rosa, M. 2004. Development of hybrid materials based on hydroxyethylmethacrylate as supports for improving cell adhesion and proliferation. *Biomaterials.* 25 : 3645 – 3653.
- Shi, X.-Y. and Tan, T. – W. 2002. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its in controlled release of vitamin D₂. *Biomaterial* 23 : 4429 – 4473.
- Struszezyk, H., Pospieszny, H. and Kotlinski, S. 1989. Some new applications of chitosan in agriculture. pp. 733-742. In G. Skjak-Braek, T. Anthonsen and P. Sandford (eds) *Chitin and Chintosan.* Elsevier Applied Science, London.
- Tajima, M., Izume, M., Fukuhara, T., Kimura, T. and Kuroyanagi, Y. 2000. Development of new dressing composed of N-succinyl chitosan and gelatin. *J. Jpn. Soci. Biomater.* 18(5) : 220 – 226.
- Takedo, M. 1978. Use of chitin powder as absorbant in thin-layer chromatography, pp 355-363, In R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser (eds) *Proceeding of the First International Conference on Chitin and Chitosan MIT Sea Grant Program,* Cambridge.

ภาคผนวก ก

1. Nutrient agar (NA)

Nutrient broth (NB)	13.0	กรัม
วุ้น (Agar)	30.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2. อาหารดัดแปลง M-9 (สูตร 1)

Na_2HPO_4	1.3	กรัม
KH_2PO_4	3.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
MgSO_4	0.24	กรัม
CaCl_2	0.01	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
ปรับ pH 7.0		

3. อาหารดัดแปลง M-9 (สูตร 2)

Na_2HPO_4	1.3	กรัม
KH_2PO_4	3.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
MgSO_4	0.24	กรัม
CaCl_2	0.01	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
ปรับ pH 7.0		

4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ทำการเตรียมสารละลาย ก และข โดยทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (ทำการละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (ทำการละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ก (X) ผสมกับจำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ข (y) และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.1 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ

X	Y	พีเอช	X	Y	พีเอช
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.5	6.8	5.3	94.7	8.0

ภาคผนวก ข

การทดสอบการพองตัวของแผ่นฟิล์มไคโตซาน

1. สารเคมี

1. อาหาร RPMI pH 7.4
2. เติร์ียม Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) 1x
3. น้ำกลั่น

2. วิธีเตรียม PBS

KCl (Potassium chloride)	0.20
KH ₂ PO ₄ (Potassium phosphate monobasic)	0.20
NaCl (Sodium chloride)	8.00
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O (Sodium phosphate dibasic)	1.15

น้ำ 1 ลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้ได้ pH 7.4

(without Ca⁺⁺, Mg⁺⁺)

3. การวัดการบวมน้ำของแผ่นฟิล์ม (Water swelling measurements) (Schiraldi และคณะ, 2004)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การบวมน้ำ} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกของตัวอย่าง} - \text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}} \times 100$$

การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

1. วิธีเตรียม DNS

1.1 สารเคมี

Potassium sodium tartrate	200	กรัม
NaOH	10	กรัม
Phenol	0.2	กรัม
Na ₂ SO ₃	0.5	กรัม
3,5-dinitrosalicylic acid	10	กรัม

1.2 การเตรียม

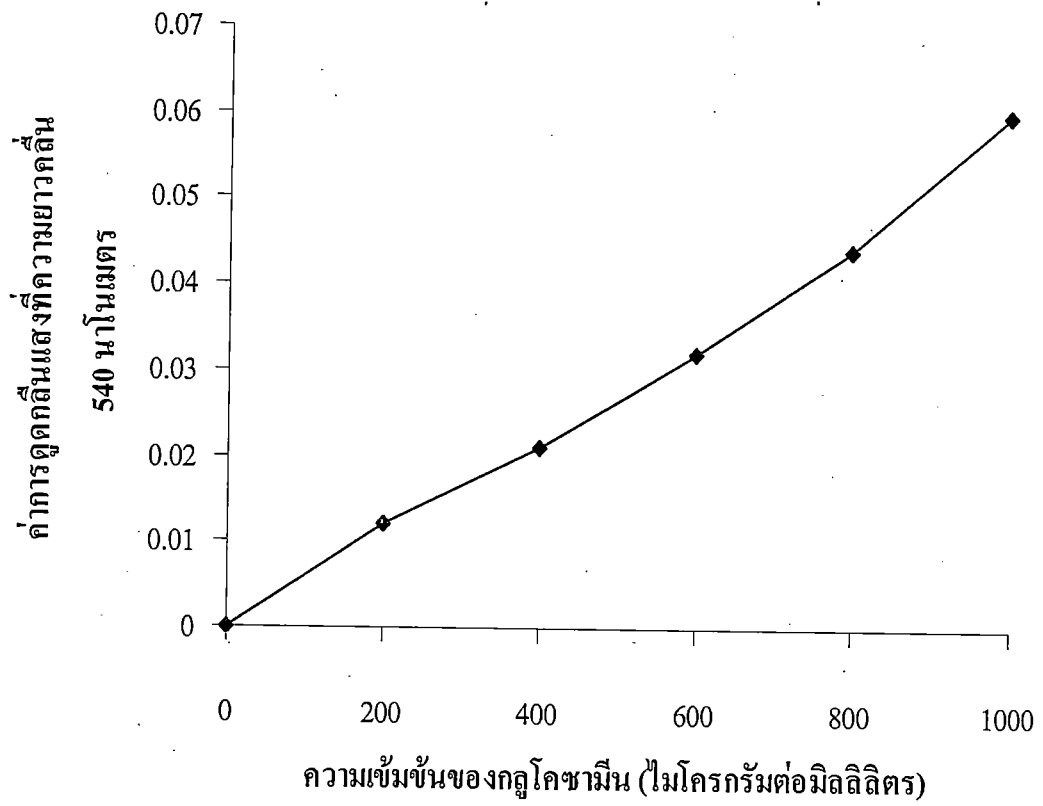
ละลาย NaOH 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 1,500 มิลลิลิตร) ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆเติม Potassium sodiumtartrate 200 กรัม เติม Phenol 0.2 กรัม เติม Na_2SO_3 0.5 กรัม และ 3,5-dinitrosalicylic acid 10 กรัม โดยค่อยๆละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จึงค่อยเติมสารเคมีตัวต่อไปตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร

2. วิธีตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่สารละลาย DNS ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3. วิธีเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคซามีน มาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) โดยชั่งกลูโคซามีน 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคซามีน 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคซามีน