

การพัฒนาไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ
และมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียโดยใช้อนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์
จากสารสกัดน้ำกระชายขาว

Development of thermosensitive chitosan/collagen hydrogel with
antibacterial properties using biosynthesized silver nanoparticles
from aqueous extract of fingerroot

ชานนท์ สมจิตกรกุล¹ เอกรัฐ หิตโกเมท² ชिरาวุฒิ เพชรเย็น^{1,3} และ ปัญจพร วงศ์วิทยากุล^{*2}
Chanon Somjitkul¹, Ekarat Hitakomate², Chiravoot Pechyen^{1,3},
and Panjaporn Wongwitthakakool^{*2}

สาขาวิชาเทคโนโลยีวัสดุและสิ่งทอ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์¹

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์²

ศูนย์แห่งความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีสมัยใหม่และการผลิตขั้นสูง

สำหรับนวัตกรรมทางการแพทย์แห่งมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์³

Department of Materials and Textile Technology, Faculty of Science and Technology,
Thammasat University¹

Faculty of Dentistry, Thammasat University²

Center of Excellence in Modern Technology and Advanced Manufacturing for Medical Innovation,
Thammasat University³

E-Mail: panja_w@tu.ac.th

Received : May 23, 2024
Revised : September 26, 2024
Accepted : November 29, 2024

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก โดยช่วยกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่และนำส่งสารออกฤทธิ์ งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการเตรียมไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย โดยการเติมอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จากสารสกัดกระชายขาว (โบเซนเบอร์เกีย โรหุนดา) เป็นตัวรีดิวซ์ อนุภาคนาโนเงินจึงถูกแสดงคุณลักษณะด้วยการทดสอบสมบัติทางทางสเปกโตรโฟโตเมตริก ลักษณะสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวภาพ พบว่าอนุภาคนาโนเงินมีลักษณะทรงกลมขนาด 20 - 40 นาโนเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส และซูโดโมนาส แอรูจิโนซา อนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ขึ้นถูกผสมกับไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล

ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางรีโอโลยี สันฐานวิทยาเชิงโครงสร้าง และชีวภาพ พบว่าการเติมอนุภาคนาโนเงินช่วยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิการเกิดเจลและคุณสมบัติทางรีโอโลยี รวมถึงเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียเมื่อเทียบกับไฮโดรเจลที่ไม่มีอนุภาคนาโนเงิน

คำสำคัญ: ไคโตซาน คอลลาเจนไฮโดรเจล ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ อนุภาคนาโนเงิน

ABSTRACT

Thermosensitive hydrogels have been developed for use in bone tissue engineering, promoting new bone formation and delivering active substances. This research focuses on the preparation of chitosan/collagen hydrogels with antibacterial properties by incorporating silver nanoparticles synthesized using an extract of fingerroot (*Boesenbergia rotunda*) as a reducing agent. The silver nanoparticles were characterized by spectrophotometric analysis, morphology, and biological properties, and were found to be spherical in shape with a size range of 20 – 40 nm. They exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The synthesized silver nanoparticles were then mixed with the chitosan/collagen hydrogel at a concentration of 1% (w/v), and their rheological, structural, and biological properties were evaluated. It was found that the addition of silver nanoparticles altered the gelation temperature, rheological properties, and significantly enhanced the antibacterial efficiency compared to hydrogels without silver nanoparticles.

Keywords : Chitosan, Collagen Hydrogel, Thermosensitive, Silver nanoparticles

บทนำ

การปลูกถ่ายกระดูก (bone grafting) เป็นวิธีการที่แพทย์ใช้กันอย่างแพร่หลายในศัลยกรรม รากเทียมและศัลยกรรมปริทันต์ โดยการปลูกถ่ายกระดูกสามารถทำได้ทั้งจากการใช้เนื้อเยื่อกระดูกของ ตัวผู้ป่วยเอง (autogenous bone) หรือจากบุคคลอื่น (allogenic bone) ข้อเสียของการใช้เนื้อเยื่อ จากผู้ป่วยเองคือการเกิดการบาดเจ็บซ้ำซ้อนจากการผ่าตัดเพื่อเก็บเนื้อเยื่อ ส่วนการใช้กระดูกจากบุคคล อื่นมีปัญหาเรื่องความเข้ากันได้และขนาดที่เหมาะสมของกระดูก จึงมีการใช้วัสดุปลูกถ่ายกระดูก ทดแทน เช่น กระดูกวัว (xenogenic bone) และวัสดุสังเคราะห์ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

ไฮโดรเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ (thermosensitive hydrogel) ได้รับความนิยมในการใช้เป็นวัสดุปลูกถ่ายทดแทน เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็งที่อุณหภูมิของร่างกาย โครงสร้างของไฮโดรเจลคล้ายกับเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ทำให้สนับสนุนการเกาะติดของเซลล์ (cell attachment) การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ (cell differentiation) (Liu *et al.*, 2023) ไคโตซาน (chitosan) เป็นอะมิโนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากไคติน (chitin) มีความสามารถในการเข้ากับร่างกายได้ดี (biocompatibility) และสามารถย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability) ได้ จึงถูกนำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจล โดยมีเบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (b-glycerophosphate) เป็นสารเชื่อมขวาง (crosslinking agent) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของไฮโดรเจล การเติมคอลลาเจน (collagen) ลงในสารละลายไคโตซานจะช่วยปรับปรุงสมบัติทางชีวภาพของไฮโดรเจลให้ดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะในด้านการเกาะติดและการแบ่งตัวของเซลล์ (Xiong and Xiong, 2022)

จากการศึกษาพบว่าไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่มีเบต้ากลีเซอโรฟอสเฟตเป็น สารเชื่อมขวาง มีสมบัติพิเศษที่ช่วยปรับปรุงความแข็งแรง ความสามารถในการรับแรงอัด (compressibility) และการติดกัน (cohesiveness) ของไฮโดรเจล นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรเจลนี้มีความเสถียรต่อค่าพีเอช (pH stability) และเข้ากับร่างกายได้ดี เหมาะสมที่จะใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) สำหรับการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (tissue regeneration) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการรักษาการติดเชื้อและอักเสบหลังการผ่าตัด (Dang *et al.*, 2017)

การติดเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการปลูกถ่ายกระดูกและศัลยกรรมปริทันต์เป็นปัญหาที่พบได้บ่อย อนุภาคนาโนเงินเป็นหนึ่งในสารต้านแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง ไม่เพียงแต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่ยังมีฤทธิ์ต้านไวรัสและเชื้อราอีกด้วย การเติมอนุภาคนาโนเงินในไฮโดรเจล จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่พบในแผลผ่าตัด เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Yathavan *et al.*, 2023) โดยอนุภาคนาโนเงินมีกลไกในการเข้าไปทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ในเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นรวมตัวกับดีเอ็นเอและจับตัวเป็นก้อนกับไซโตพลาซึมของแบคทีเรียที่ถูกทำลาย ทำให้เกิดการรั่วซึมของ 15

ผู้วิจัยจึงมีความต้องการที่จะศึกษาการสังเคราะห์ไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และเพื่อศึกษาผลของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จากสารสกัดน้ำของกระชายขาวต่อสมบัติต่าง ๆ ของไฮโดรเจล เพื่อพัฒนาให้ไฮโดรเจลสามารถป้องกันการเกิดและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ โดยใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์โคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และมีคุณสมบัติด้านแบคทีเรีย

- 1.1 สังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากกระชายขาวเพื่อใช้เป็นสารต้านแบคทีเรีย
- 1.2 ตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ของอนุภาคนาโนเงินจากกระชายขาว
- 1.3 สังเคราะห์โคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล ที่มีอนุภาคนาโนเงินจากกระชายขาว พร้อมทั้งตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

2. เพื่อศึกษาผลของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ด้วยสารสกัดน้ำของกระชายขาว ต่อคุณสมบัติทางกายภาพและพฤติกรรมหย่นหด ของโคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล

- 2.1 วิเคราะห์พฤติกรรมทางรีโอโลยีของไฮโดรเจล
- 2.2 วัดความพรุนของไฮโดรเจล และโครงสร้างสัณฐานของไฮโดรเจล
- 2.3 ตรวจสอบสมบัติทางเคมี และทางชีวภาพของไฮโดรเจล

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดน้ำของกระชายขาว

นำส่วนรากของกระชายขาวสด 20 กรัม มาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ต้มกระชาย 20 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองกระชายออกจากสารละลายด้วยกระดาษกรอง (วอทแมน เบอร์ 1) แล้วนำไปเก็บไว้ในเครื่องทำความเย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ทดสอบ โดยกระชายขาวสด 20 กรัม จะสามารถผลิตน้ำกระชายได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน

นำสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3 , Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดน้ำกระชายขาว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตรในขวดปริมาตร นำสารละลายผสมไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสารละลายใสไม่มีสีกลายเป็นสารละลายสีน้ำตาลแดง สีของสารละลายที่เข้มข้นแสดงถึงการเกิดของอนุภาคนาโนเงิน (Sarwer *et al.*, 2022) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อให้อนุภาคนาโนเงินตกตะกอน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ที่ความเร็วรอบ 20,000 รอบต่อนาที แต่ละรอบจะทำการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น เมื่อเสร็จสิ้น

จะนำตะกอนอนุภาคนาโนมาแขวนลอยในสารสกัดน้ำกระชายขาว สัดส่วนน้ำกระชายขาว 1 มิลลิลิตร ต่ออนุภาคนาโน 1 มิลลิกรัม

การตรวจสอบลักษณะของอนุภาคนาโนเงิน

นำสารละลายอนุภาคนาโนเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวิเคราะห์การดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrometer; BIORAD SmartspecTM3000) ที่ Resolution 1 นาโนเมตร ในช่วงความยาวคลื่น 300 - 800 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเกิดอนุภาคนาโนเงิน เปรียบเทียบกับสารละลายอนุภาคนาโนเงินทางการค้า

ตรวจสอบโครงสร้างพื้นฐานและขนาดของอนุภาคนาโนเงินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM, JEOL JEM-2010) ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 200 กิโลโวลต์ โดยก่อนการวิเคราะห์ให้นำสารละลายอนุภาคนาโนเงินไปเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonocate) เป็นระยะเวลา 5 นาที ทำการหยดสารละลายอนุภาคนาโนเงินลงบนตะแกรงทองแดงที่เคลือบคาร์บอน (Carbon coated copper grid) นำไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องอบสูญญากาศ (vacuum dry) ก่อนทำการถ่ายภาพ TEM

การตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเชื้อ สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923) และ ซูโดโมนาสแอโรจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853) บน Sabouraud dextrose agar (SDA, Difco, USA) มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งชนิด Brain heart infusion (BHI) agar ที่เติม 10% horse serum และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน นำเชื้อมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว BHI broth ที่มี 10% Horse serum แล้วมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1.5×10^6 CFU/mL และเจือจางลงทีละ 10 เท่าลงอีก 2 ครั้ง

หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธีการเจือจาง microbroth dilution โดยนำสารละลายอนุภาคนาโนเงิน และแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเจือจางเป็นลำดับส่วนลงทีละ 2 เท่า ด้วย BHI broth ใส่ใน 96-well microtiter plate จากนั้นเติมแบคทีเรียที่ปรับความเข้มข้นแล้วลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ที่มีสารทดสอบอยู่ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน อ่านผลการเจริญของแบคทีเรียจากการสังเกตความขุ่นของเชื้อที่ทดสอบในแต่ละหลุม เปรียบเทียบกับหลุมควบคุมซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอย่างเดียว และหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารทดสอบในหลุมทดลองที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum bactericidal concentration, MBC) โดยส่วนผสมสารละลายอนุภาคนาโนเงินที่จากหลุมทดสอบของการทดลองหาค่า MIC ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อมา spread plate บนอาหาร BHI agar นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 5 วัน อ่านผลโดยดูการเจริญของ

เชื้อทดสอบ แผลผลโดยอ่านค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ฆ่าเชื้อได้ 99.99% ซึ่งจะเป็นค่า MBC และดูค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสายละลายอนุภาคนาโนเงินที่เพิ่มขึ้นกับปริมาณของเชื้อที่ลดลง

การสังเคราะห์ไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล

เตรียมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในตัวทำละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และเตรียมสารละลายคอลลาเจน ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร นำสารละลายทั้งสองชนิดมาผสมกันด้วยสัดส่วนระหว่างไคโตซานต่อคอลลาเจน 3:1 เติมนูภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้ลงไป ความเข้มข้นร้อยละ 0 และ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยกวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที จากนั้นค่อย ๆ หยดเบต้ากลีเซอรอเฟอสเฟต ความเข้มข้น ร้อยละ 56 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรลงไปให้มีความเข้มข้นในไฮโดรเจล ร้อยละ 14 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บสารละลายไฮโดรเจลไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองลำดับถัดไป

การทดสอบสมบัติรีโอโลยี

วิเคราะห์พฤติกรรมทางรีโอโลยีของไฮโดรเจล ได้แก่ มอดุลัสสะสม (storage modulus, G') และมอดุลัสสูญเสีย (loss modulus, G'') ด้วย Oscillatory Rheometer (Thermo Scientific: HAAKE MARS) ตรวจดูอุณหภูมิการเกิดเจล (gelation temperature) โดยให้ความร้อนตั้งแต่ 4 ถึง 45 องศาเซลเซียส ที่ ความเครียด ร้อยละ 1 และความถี่ 1 เฮิร์ตซ์ และวัดเวลาการเกิดเจล (gelation time) จากการทำ time sweep ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเครียด ร้อยละ 1 และความถี่ 1 เฮิร์ตซ์

การวัดความพรุน (porosity) ของไฮโดรเจล

นำไฮโดรเจลไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเป็นไฮโดรเจลไลโอฟิลไลซ์ (lyophilized hydrogel) โดยทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาความพรุนด้วยระบบสแกน Micro CT (BRUKER SKYSCAN 1173 Micro-CT) ซึ่งทำงานที่ 58 กิโลโวลต์ และ 24 มิลลิแอมป์ ด้วยความละเอียด 20 ไมโครเมตร

การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจล

นำตัวอย่างไลโอฟิลไลซ์ไปเคลือบผิวหน้าด้วยทองคำ ตรวจสอบลักษณะของรูพรุนของไฮโดรเจลโดยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM, JEOL JCM-600)

การตรวจสอบลักษณะทางเคมีของไฮโดรเจล

หมู่ทางเคมีของไฮโดรเจลถูกพิจารณา ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR, Thermo Scientific: Nicolet is5) โดยนำ

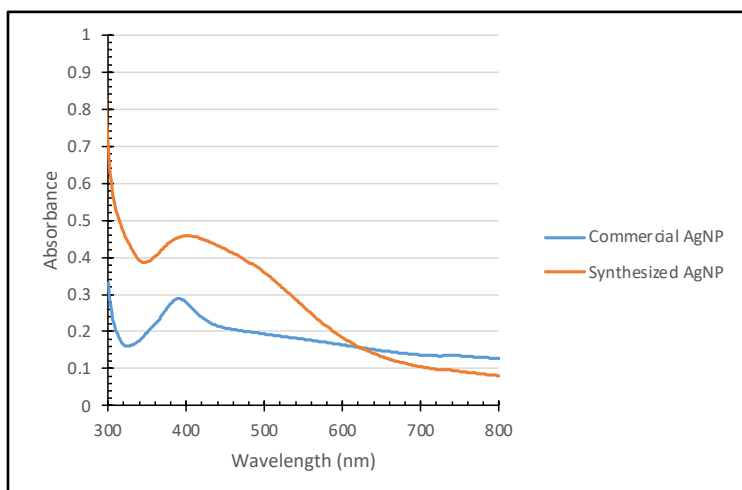
ตัวอย่างไฮโดรเจลไอโอไฟโลซีไปสแกนในช่วงเลขคลื่น 4000 ถึง 600 cm^{-1} จำนวน 64 ครั้ง ความละเอียด 4 cm^{-1}

การประเมินคุณสมบัติต้านจุลชีพของไฮโดรเจล

เตรียมชิ้นงานตัวอย่างไฮโดรเจลในแม่พิมพ์ทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สูง 3 มิลลิเมตร จำนวนชิ้นงานตัวอย่างแต่ละกลุ่มทดสอบ คือ 3 ชิ้น ($n=3$) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบเพื่อให้เกิดเจลสมบูรณ์ จากนั้นนำชิ้นงานตัวอย่างไปฆ่าเชื้อภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 30 นาที ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพด้วย disc diffusion method โดยมีกลุ่มควบคุมแบบบวก (positive control) ได้แก่ Ciprofloxacin นำชิ้นงานตัวอย่าง วางลงบน Sabouraud dextrose agar (SDA, Diffco, USA) ที่เพาะเชื้อ สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923) และซูโดโมนา สแอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853) (American Type Culture Collection) ไว้ และนำไปบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพชื้น หลังจากนั้นวัดบริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) และนับจำนวนโคโรนียของแบคทีเรีย

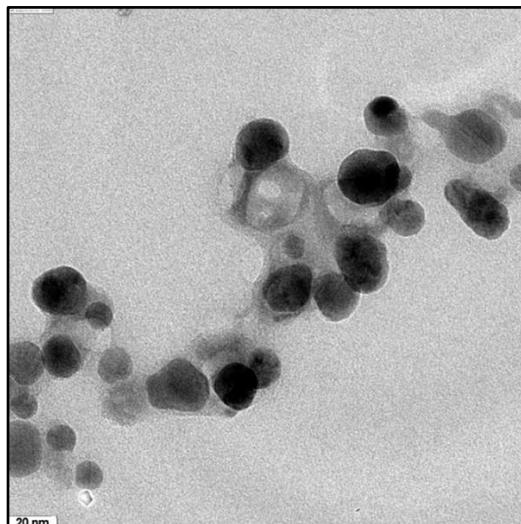
ผลการวิจัย

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากการใช้สารสกัดน้ำกระชายขาวเป็นตัวรีดิวซ์ ได้อนุภาคนาโนเงินที่มีการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นประมาณ 400 - 420 นาโนเมตร ทดลองเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนเงินทางการค้า ผลการทดลองแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 UV-Vis absorption spectrum ของอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ (Synthesized AgNP) และอนุภาคนาโนเงินทางการค้า (Commercial AgNP)

ผลการตรวจสอบขนาดอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้จาก TEM แสดงในภาพประกอบ 2 พบว่าอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นทรงกลมและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 20 - 40 นาโนเมตร



ภาพประกอบ 2 ภาพถ่าย TEM ของอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์

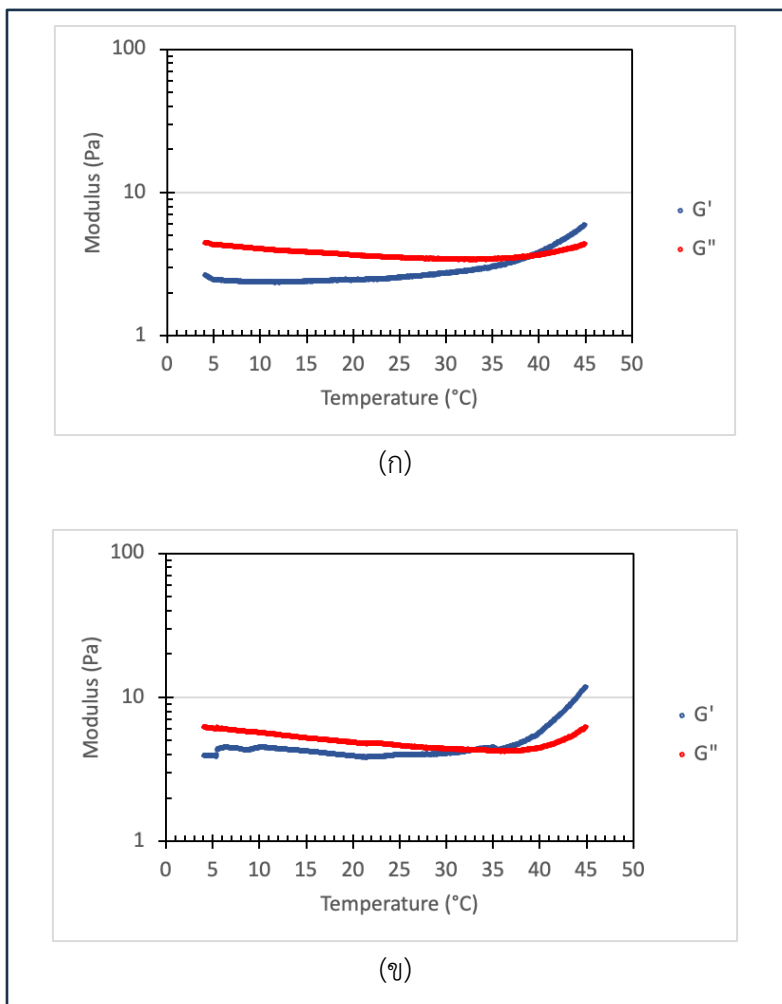
ความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum bactericidal concentration, MBC) ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า ค่า MIC และ MBC ของอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ต่อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* มีความเข้มข้นเท่ากัน และค่า MIC ต่ำกว่า MBC

ตารางที่ 1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนเงิน

Bacteria	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	3.125	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	3.125	6.25

การศึกษากระบวนการในการเกิดเจลโดยพิจารณาจากพฤติกรรมหยุ่นหนืด (viscoelastic behavior) โดยวัดมอดุลัสสะสม (Storage modulus, G') และมอดุลัสสูญเสีย (Loss modulus, G'') ของไฮโดรเจล ในช่วงอุณหภูมิ 4 ถึง 45 องศาเซลเซียส ถูกแสดงในภาพประกอบ 3 จะเห็นว่า ในช่วงเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส G' น้อยกว่า G'' และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ G' และ G'' มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และความแตกต่างระหว่าง G' และ G'' ลดลง จนกระทั่งถึงอุณหภูมิหนึ่งค่า G' เท่ากับ G'' แสดง

การเปลี่ยนแปลงจากโซลเป็นเจล (sol-gel transition) หลังการเกิดเจล ค่า G' มากกว่า G'' เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น อุณหภูมิการเกิดเจล (อุณหภูมิที่ ค่า G' เท่ากับ G'') และค่ามอดุลัส สรุปลไว้ในตารางที่ 2



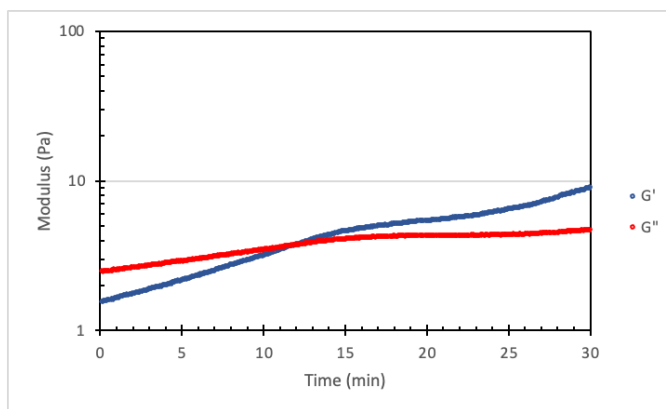
ภาพประกอบ 3 พฤติกรรมหยุ่นหนืด ได้แก่ มอดุลัสสะสม (Storage modulus, G') และมอดุลัสสูญเสีย (Loss modulus, G'') เทียบกับอุณหภูมิ (Temperature) ของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดร-เจล; (ก) ปราศจากอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ และ (ข) อนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์สังเคราะห์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิการเกิดเจล และค่ามอดุลัส ไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล มีอุณหภูมิการเกิดเจลที่ 39.04 องศาเซลเซียส การเติมอนุภาคนาโนเงินมีผลต่ออุณหภูมิการเกิดเจล โดยเมื่อเพิ่มอนุภาคนาโนเงินปริมาณร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของไฮโดรเจล อุณหภูมิการเกิดเจลลดลงเหลือ 32.94 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าค่ามอดุลัสของไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินอยู่มีค่าสูงกว่าไฮโดรเจลที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงิน

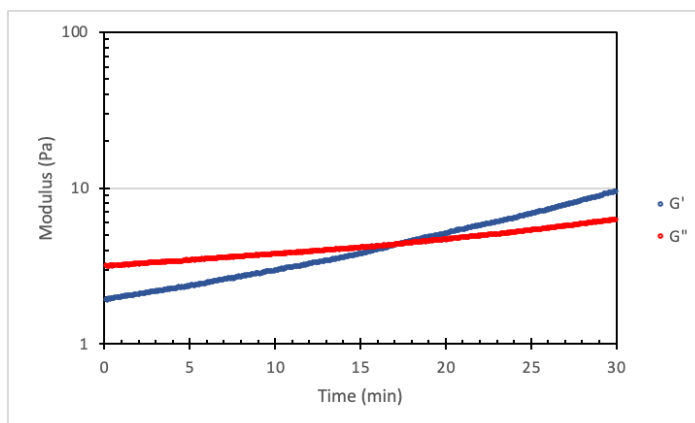
ตารางที่ 2 อุณหภูมิการเกิดเจล (Gelation temperature) และมอดุลัส (G' และ G'') ของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล

AgNP concentration (% w/v)	Gelation temperature (°C)	$G' = G''$ (Pa)
0	39.04	3.618
1	32.94	4.310

เมื่อวัดค่าเวลาการเกิดเจลของไฮโดรเจลด้วยการทดสอบทางรีโอโลยี โดยการทำให้ time sweep ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภาพประกอบ 4 แสดงพฤติกรรมหุ่ยนหนืดของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่เติมอนุภาคนาโนเงินเทียบกับเวลา พบว่าที่เวลาเริ่มต้น G' น้อยกว่า G'' อย่างไรก็ตามความแตกต่างระหว่าง G' และ G'' ลดลงเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ทั้ง G' และ G'' เพิ่มขึ้นกับการเพิ่มเวลา เวลาการเกิดเจล และค่ามอดุลัส สรุปไว้ในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า ไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล มีเวลาการเกิดเจล 11.88 นาที การเพิ่มปริมาณอนุภาคนาโนเงินร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่งผลให้เวลาการเกิดเจลของไฮโดรเจลยาวขึ้น ค่ามอดุลัสที่ตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงจากโซลเป็นเจล ของไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบสูงกว่าไฮโดรเจลปราศจากอนุภาคนาโนเงิน



(ก)



(ข)

ภาพประกอบ 4 พฤติกรรมหนืดหนืด ได้แก่ มอดุลัสสะสม (Storage modulus, G') และมอดุลัสสูญเสีย (Loss modulus, G'') เทียบกับเวลา (Time) ของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล; (ก) ปราศจากอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ และ (ข) อนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

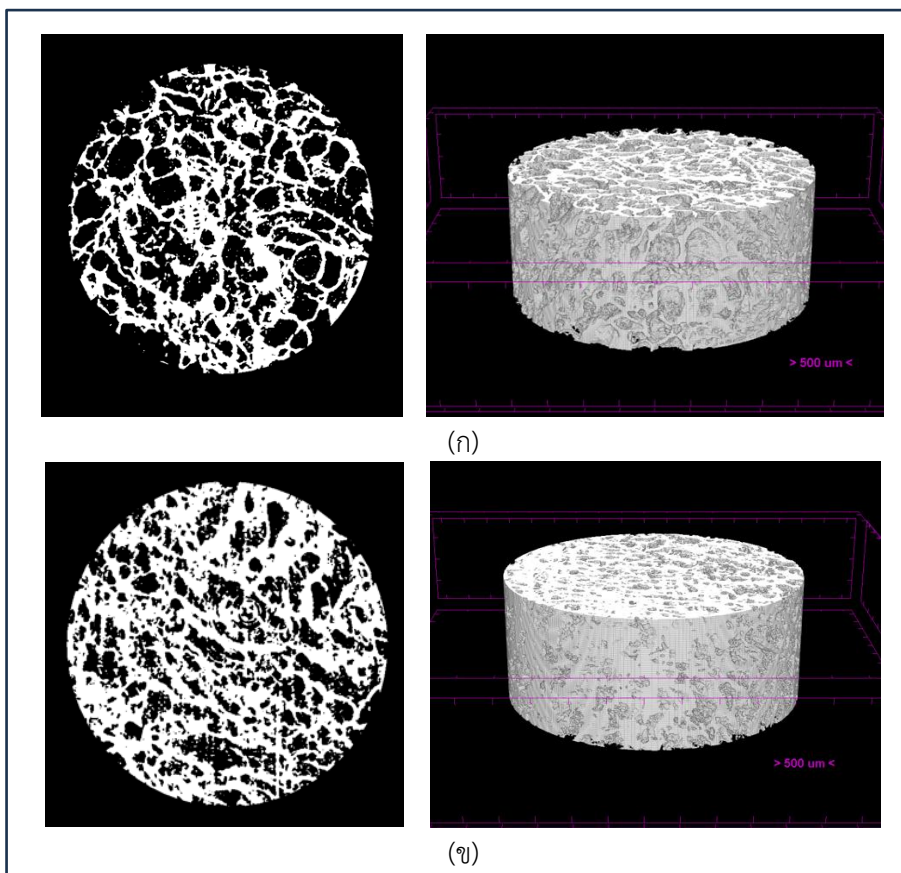
ตารางที่ 3 เวลาการเกิดเจล (Gelation time) และมอดุลัส (G' และ G'') ของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล

AgNP concentration (% w/v)	Gelation time (min)	$G' = G''$ (Pa)
0	11.88	3.765
1	17.26	4.395

การวัดความพรุนของไฮโดรเจลไลโอฟิลิซต์ด้วยระบบสแกน Micro CT มีผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปภาพประกอบ 5 พบว่า ร้อยละความพรุนของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล ที่มีอนุภาคนาโนเงินมีปริมาณน้อยกว่าไฮโดรเจลที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงิน และเมื่อพิจารณาภาพถ่ายจะเห็นว่ารูพรุนมีลักษณะเป็น interconnection ระหว่างรูพรุน

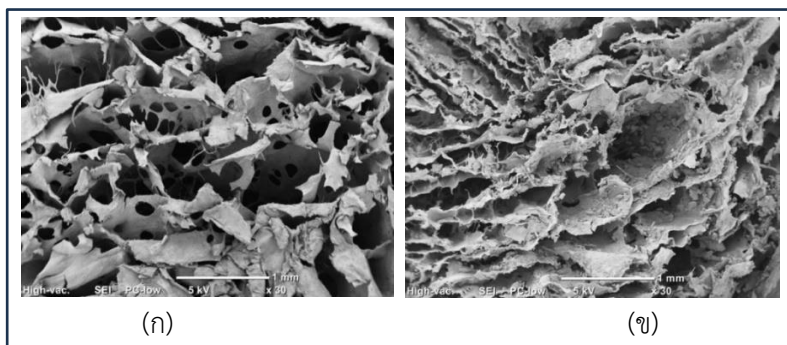
ตารางที่ 4 ร้อยละความพรุน (% Porosity) ของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล

AgNP concentration (% w/v)	Porosity (%)
0	57.96±0.74
1	38.8±1.58



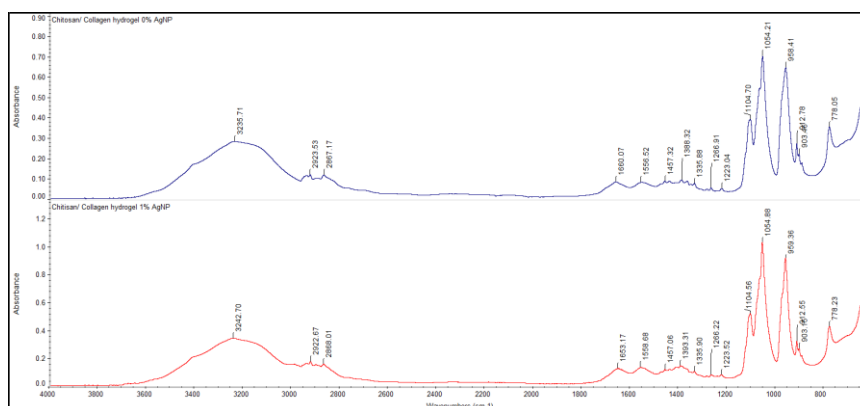
ภาพประกอบ 5 ภาพถ่าย Micro CT ของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลไลโอฟิลิซ์; (ก) ปราศจากอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ และ (ข) อนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ภาพประกอบ 6 แสดงภาพถ่าย SEM ของไฮโดรไฮโดรเจลไลโอฟิลิซ์ เห็นได้ว่าขนาดรูพรุนของไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบมีขนาดเล็กกว่าไฮโดรเจลปราศจากอนุภาคนาโนเงิน แต่ยังมีลักษณะเป็น interconnection ระหว่างรูพรุน โดยมีคอลลาเจนไฟเบอร์อยู่ด้วย อย่างไรก็ตามที่ผนังรูพรุนของไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบมีเฟส (phase) ขนาดเล็กกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ



ภาพประกอบ 6 ภาพถ่าย SEM ของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลไลโอฟิลิซ์; (ก) ปราบจากอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ และ (ข) อนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

FTIR spectra ของไฮโดรเจล แสดงไว้ในภาพประกอบ 7 จะเห็นว่า ไฮโดรเจลไลโอฟิลิซ์ที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงินแสดงการปรากฏของพีคในตำแหน่งเลขคลื่นเดียวกัน โดยพีคที่ปรากฏแสดงหมู่เอไมด์ ที่เป็นหมู่ฟังก์ชันของไคโตซานและคอลลาเจน โดยพีคที่ปรากฏในช่วงเลขคลื่น 1660.07 cm^{-1} เป็น stretching vibration ของหมู่ carbonyl ($\text{C}=\text{O}$), 1556.52 cm^{-1} เป็น N-H bending และ C-N stretching vibration, 1388.32 cm^{-1} เป็น C-N stretching และยังพบ broad band ในช่วง $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (OH) จากพันธะ C-OH ร่วมกับการดูดซับโมเลกุลของน้ำ อย่างไรก็ตาม ยังพบการซ้อนทับของพีคที่ตำแหน่ง 3400 cm^{-1} ซึ่งเป็น N-H stretching และที่ $2923.53\text{--}2857.17\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็น C-H stretching vibration จากพันธะ CH, CH_2 และ CH_3 อีกด้วย สำหรับตำแหน่ง $1104.70\text{--}1054.21\text{ cm}^{-1}$ แสดง C-O stretching vibration ทั้งไฮโดรเจลที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงินและมีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบแสดงการปรากฏของพีคในตำแหน่งเลขคลื่นเดียวกัน



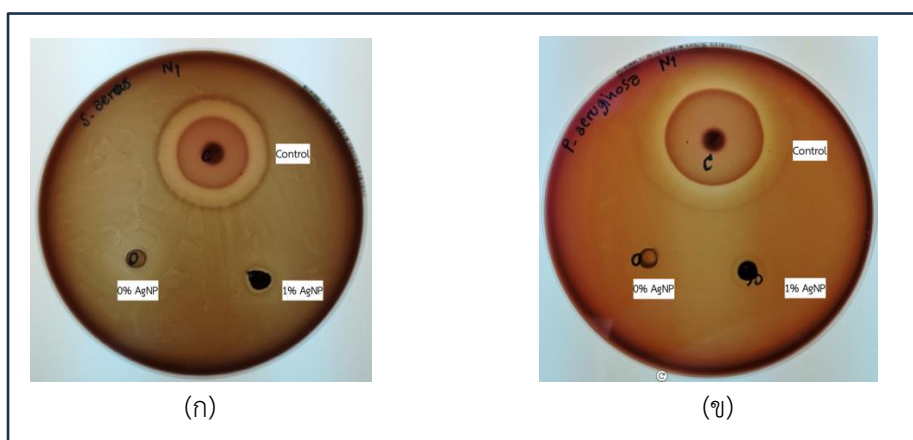
ภาพประกอบ 7 FTIR spectra ของไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลไลโอฟิลิซ์ที่มีอนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ความเข้มข้นร้อยละ 0 และ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v)

ตารางที่ 5 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ รอบไฮโดรเจลที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงินและที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบอยู่ ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากผลการทดลองจะเห็นว่า ไฮโดรเจลที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงินไม่แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ รอบไฮโดรเจล การเติมอนุภาคนาโนเงินลงในไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ กับทั้ง *S. aureus* และ *P. aeruginosa* อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบบวก พบว่าบริเวณยับยั้งเชื้อรอบไฮโดรเจลมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มควบคุมแบบบวก ดังแสดงในภาพประกอบ 8

ตารางที่ 5 ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ รอบไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล

Bacterial strains	Zone of inhibition (cm)		
	Positive control ^a	0 % AgNP	1 % AgNP
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.0 ± 0	0	0.8 ± 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.0 ± 0	0	1.0 ± 0.1

^a Ciprofloxacin



ภาพประกอบ 8 ภาพถ่ายการเจริญเติบโตของ (ก) *S. aureus* และ (ข) *P. aeruginosa* ที่เพาะเลี้ยงด้วยแผ่น ไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ความเข้มข้นร้อยละ 0 และ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v)

อภิปรายผล

อนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้ปรากฏ Surface Plasmon Resonance (SPR) ที่ตำแหน่งเดียวกันกับอนุภาคนาโนเงินทางการค้าที่มีขนาดอนุภาค 20 - 40 นาโนเมตร และจากภาพถ่าย TEM ก็ยืนยันว่า อนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 20 - 40 นาโนเมตร ซึ่งขนาดของอนุภาคนาโนเงินมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ อนุภาคนาโนเงินที่มีขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Bruna *et al.*, 2021) เนื่องจากมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียมาก จากผลการทดลองจึงพบว่า อนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์ มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ต่ำ โดย *S. aureus* อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก และ *P. aeruginosa* อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ มีรายงานว่าแบคทีเรียแกรมลบไวต่ออนุภาคนาโนเงินมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ผนังเซลล์ที่หนาอาจลดการแทรกซึมของอนุภาคนาโนเงินเข้าไปในเซลล์ได้ (Yin *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตามอนุภาคนาโนเงินชีวสังเคราะห์จากกระชายขาวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีแนวโน้มสอดคล้องกับงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนเงินนาโนที่สังเคราะห์จากกระชายขาว มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยอนุภาคเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียผ่านกลไกการทำลายโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ความสามารถในการอยู่รอดลดลงจนแบคทีเรียตายในที่สุด (Kaul *et al.*, 2023)

จากพฤติกรรมหนืดที่แสดง ในภาพประกอบ 3 และ 4 พบว่า ค่า G' น้อยกว่า G'' ที่อุณหภูมิต่ำ แสดงถึงการเป็นของเหลวของโคโตะซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล ไฮโดรเจลสามารถไหลได้ที่อุณหภูมิและเวลาก่อนการเกิดเจล จึงแสดงให้เห็นว่า G'' (viscous behavior) มีอำนาจเหนือ G' (elastic behavior) เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ไฮโดรเจลเริ่มเกิดพันธะเชื่อมขวางระหว่างโคโตะซานและ b-GP ร่วมกับการเกิดเป็นคอลลาเจนไฟเบอร์ ซึ่งไปขัดขวางการไหลของไฮโดรเจล ทำให้ค่า G' มีค่าลดลง และยิ่งลดลงมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิมากขึ้น ในทางกลับกัน ค่า G' มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และยังมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ความแตกต่างระหว่างค่า G' และ G'' น้อยลงด้วย โดยที่อัตราในการเพิ่มขึ้นของ G' มีมากกว่าอัตราในการลดลงของ กำหนดอุณหภูมิที่ทำให้ ค่า G' เท่ากับ G'' เป็นอุณหภูมิการเกิดเจล (Couto *et al.*, 2009) จากตารางที่ 2 ที่พบว่าไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบมีอุณหภูมิการเกิดเจลต่ำกว่าไฮโดรเจลที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงิน เนื่องจากในการเกิดเจล การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้โมเลกุลของน้ำที่มีพันธะไฮโดรเจนกับสายโซ่พอลิเมอร์เกิดการสั่นและหมุน ความแรงพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์และน้ำอ่อนลง โมเลกุลน้ำจึงออกสายโซ่พอลิเมอร์ ส่งผลให้สายโซ่พอลิเมอร์สามารถสร้างพันธะกับโมเลกุลอื่นได้ (Kaur *et al.*, 2021) ทั้งนี้ อนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้เป็นสารแขวนลอยอยู่ในน้ำ เมื่อผสมลงในโคโตะซาน/คอลลาเจน

ไฮโดรเจลโดยวิธีทางตรงก่อนการเกิดเจล อาจจะไปดูดซับบนผิวของสายโซ่พอลิเมอร์ได้ ทำให้มีปริมาณพอลิเมอร์ที่จะเกิดพันธะเชื่อมขวางในการเกิดเจลจำนวนลดลง ด้วยเหตุนี้อุณหภูมิการเกิดเจลของไฮโดรเจลจึงต่ำลง อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของค่ามอดูลัสที่อุณหภูมิการเกิดเจลกับการเติมอนุภาคนาโนเงิน สามารถอธิบายด้วยการเติมอนุภาคที่มีความแข็ง (stiffness) ลงไปในไฮโดรเจล เมื่ออนุภาคนาโนเงินมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ความแข็งของไฮโดรเจลจึงเพิ่มขึ้น

ผลการศึกษาศสมบัติทางรีโอโลยีเทียบกับเวลา พบว่า เมื่อให้ความร้อนกับไฮโดรเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาเริ่มต้น G' มีค่าน้อยกว่า G'' สามารถใช้คำอธิบายเดียวกันกับผลของอุณหภูมิได้ คือ ที่เวลาเริ่มต้นไฮโดรเจลเป็นของเหลวที่สามารถไหลได้ สมบัติหยุ่นหนืดของไฮโดรเจลจึงอยู่ภายใต้อิทธิพลของ G'' มากกว่า G' แต่เมื่อเวลามากขึ้น การเกิดพันธะเชื่อมขวางระหว่างไคโตซานและ b-GP เพิ่มขึ้น ทำให้จำกัดการไหลและมีความเป็นอีลาสติกมากขึ้น ค่า G' และ G'' จึงมีค่าสูงขึ้น อย่างไรก็ตามอัตราเร็วในการเพิ่ม G' มากกว่า G'' ทำให้ความแตกต่างระหว่างค่า G' และ G'' ลดลงจนถึงเวลาที่ทำให้เกิดเจล นั่นคือ G' เท่ากับ G'' เมื่อกระบวนการเกิดเจลเกิดขึ้น G' มีค่าสูงกว่า G'' เมื่อพิจารณาเวลาในการเกิดเจลในตารางที่ 3 พบว่า เวลาในการเกิดเจลของไฮโดรเจลสูงขึ้นเมื่อเติมอนุภาคนาโนเงิน เมื่ออุณหภูมิคงที่ต้องอาศัยเวลาในการนำโมเลกุลของน้ำและอนุภาคนาโนเงินออกจากสายโซ่พอลิเมอร์เพื่อให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดพันธะเชื่อมขวาง อนุภาคนาโนเงินที่เติมลงไปมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับสายโซ่พอลิเมอร์มากขึ้น จึงทำให้ใช้เวลาในการนำออกจากสายโซ่นานมากขึ้น

ไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและมีคุณสมบัติด้านแบคทีเรียเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องและกลายเป็นเจลเมื่อถึงอุณหภูมิเฉพาะ เช่น อุณหภูมิร่างกาย (37 องศาเซลเซียส) กระบวนการเกิดเจลเกิดขึ้นเนื่องจากอุณหภูมิทำให้เกิดการถ่ายเทโปรตอนระหว่างหมู่ฟอสเฟตประจุลบ (anionic phosphate group) ของ b-GP และ หมู่เอมีนประจุบวก (cationic amine group) ของไคโตซาน ซึ่งเป็นแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) (Lavertu, Fillion, & Buschmann, 2008) การเกิด การเปลี่ยนแปลงจากโซลเป็นเจล ขึ้นอยู่กับ pH ความเข้มข้นของ b-GP และอุณหภูมิ โดย b-GP มีความเป็นเบสอ่อน เมื่อเติมลงในสารละลายไคโตซาน/คอลลาเจนในกรด จะไปทำให้สารละลายไคโตซาน/คอลลาเจนเป็นกลาง เกิดกระบวนการสร้างเจลร่วมกับการเกิดคอลลาเจนไฟเบอร์ขึ้นใหม่ (Moreira *et al.*, 2016) เจลที่เกิดขึ้นมีการเชื่อมโยงพันธะในลักษณะที่เป็นพอลิเมอร์โครงร่างตาข่าย (polymeric network) ล้อมรอบโมเลกุลของน้ำไว้ เมื่อนำน้ำออกจากไฮโดรเจลโดยการทำให้แห้ง จะเห็นเป็นรูพรุนในไฮโดรเจล จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า ความพรุนของไคโตซาน/ไฮโดรเจลลดลงเมื่อเติมอนุภาคนาโนเงินลงในไฮโดรเจล นั้นแสดงว่าอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้ส่งผลต่อพอลิเมอร์โครงร่างตาข่ายของไฮโดรเจล ซึ่งสอดคล้องกับผลของอุณหภูมิและเวลาในการเกิดเจล ที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ว่าอนุภาคนาโนเงินอาจจะไปดูดซับบนผิวของสายโซ่พอลิเมอร์ และจากภาพถ่าย SEM ที่พบว่า การเติมอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้ลงไปไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลทำให้รูพรุนมีขนาดเล็กลง และที่ผนังรูพรุนมี phase ขนาดเล็กกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

สนับสนุนคำอธิบายที่ว่า อนุภาคนาโนเงินดูดซับบนสายโซ่พอลิเมอร์ทำให้มีต่อการเกิดพอลิเมอร์ โครงร่างตาข่าย ของไฮโดรเจล และการที่รูพรุนมีขนาดเล็กและมีอนุภาคนาโนเงินกระจายตัวอยู่ในผนัง เป็นสาเหตุให้ร้อยละความพรุนลดลงนั่นเอง

จาก FTIR spectra ของไฮโดรเจล ที่แสดงไว้ในภาพประกอบ 7 ที่พบว่า การปรากฏของพีคต่าง ๆ ของไฮโดรเจลที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงินและมีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบอยู่ในตำแหน่งเลขคลื่นเดียวกัน นั้นแสดงว่าอนุภาคนาโนเงินไม่ส่งผลต่อแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตย์ ระหว่างไคโตซานและคอลลาเจน และไม่มี interaction ระหว่าง hydroxyl group ของไคโตซาน และ Ag การที่ hydroxyl group และ Ag มี interaction กัน จะทำให้พีคที่ตำแหน่ง 3235.71 cm^{-1} เลื่อนไปทางเลขคลื่นต่ำกว่า และความเข้มของ amide peak ที่ 1660.07 cm^{-1} และ 1556.52 cm^{-1} จะหายไป และมีพีคใหม่เกิดขึ้น และที่ตำแหน่ง 1388.32 cm^{-1} ที่เป็น C-N stretching และตำแหน่ง $1104.70 - 1054.21\text{ cm}^{-1}$ ที่แสดง C-O stretching vibration จะมีความเข้มลดลงด้วย (Xie, et al., 2018)

จากผลการทดลองตามตารางที่ 5 และภาพประกอบ 8 แสดงให้เห็นว่า อนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้สามารถช่วยให้ไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลมีสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังเห็นได้จากการปรากฏบริเวณยับยั้งเชื้อ ของไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบอยู่ การที่ inhibition size ของไฮโดรเจลต่อเชื้อ *S. aureus* มีขนาดเล็กกว่า inhibition size ของไฮโดรเจลต่อเชื้อ *P. aeruginosa* สามารถอธิบายได้จากความไวต่ออนุภาคนาโนของแบคทีเรียแกรมลบดังที่ได้ อธิบายไปก่อนหน้านี้ อย่างก็ตาม inhibition size ของไฮโดรเจลต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม อาจจะเป็นเนื่องมาจากการที่อนุภาคนาโนเงินในไฮโดรเจลดูดซับอยู่บนสายโซ่พอลิเมอร์และถูกล้อมรอบด้วยพอลิเมอร์โครงร่างตาข่าย ทำให้จำกัดการแพร่ออกมาสัมผัสกับเชื้อ

จากการวิจัยสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์ไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจล ที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียได้สำเร็จ โดยใช้สารสกัดน้ำกระชายขาวเป็นตัวรีดิวซ์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน โดยสามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่มีขนาด $20 - 40$ นาโนเมตร มี Surface Plasmon Resonance (SPR) เทียบเท่ากับอนุภาคนาโนเงินทางการค้า และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ การเติมอนุภาคนาโนเงิน ส่งผลต่ออุณหภูมิการเกิดเจล เวลาการเกิดเจล ร้อยละความพรุน ขนาดรูพรุน โครงสร้างสัณฐาน และคุณสมบัติทางเคมีของไฮโดรเจล โดยไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบ แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ กับ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* แต่ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ เล็กกว่ากลุ่มควบคุมแบบบวก จากผลการทดลอง พบว่าไคโตซาน/คอลลาเจนไฮโดรเจลที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นส่วนประกอบ มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นวัสดุชีวการแพทย์สำหรับการสร้างกระดูก โดยสามารถควบคุมการปล่อยยา ยับยั้งการติดเชื้อ และลดการอักเสบได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หยาดนภา ผาเจริญ วิทยาลัยวิทยาลัยแพทยศาสตร์
นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำข้อมูลวิจัย และสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ
(วช.) ที่อุดหนุนทุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2563 เพื่อใช้ศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int J Mol Sci*, 22(13). doi:10.3390/ijms22137202.
- Couto, D.S., Hong, Z., & Mano, J.F. (2009). Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 5(2), 115-123.
- Dang, Q., Liu, K., Zhang, Z., Liu, C., Liu, X., Xin, Y., ...Fan, B. (2017). Fabrication and evaluation of thermosensitive chitosan/collagen/ α , β -glycerophosphate hydrogels for tissue regeneration. *Carbohydr Polym*, 167, 145-157. doi:10.1016/j.carbpol.2017.03.053.
- Govindaraju, K., Selvaraj, T., Kiruthiga, V., & Singaravelu, G. (2010). Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *Journal of Biopesticides*, 3, 394-399.
- Hong, K.H. (2007). Preparation and properties of electrospun poly (vinyl alcohol)/silver fiber web as wound dressings. *Polymer Engineering & Science*, 47(1), 43-49.
- Huang, H., Yuan, Q., & Yang, X. (2004). Preparation and characterization of metal–chitosan nanocomposites. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 39(1-2), 31-37.
- Kaul, S., Ahmed, S., Nandini, V.V., Lathief, J., & Boruah, S. (2023). Evaluation of Physical Properties of Denture Base Resins Containing Silver Nanoparticles of *Aloe barbadensis* Miller, *Morinda citrifolia*, and *Boesenbergia rotunda* and Its Anti-microbial Effect: An In Vitro Study. *Cureus*, 15(11).

- Kaur, K., Sa'Paiva, S., Caffrey, D., Cavanagh, B.L., & Murphy, C.M. (2021). Injectable chitosan/collagen hydrogels nano-engineered with functionalized single wall carbon nanotubes for minimally invasive applications in bone. *Materials Science and Engineering: C*, 128, 112340.
- Lara, H.H., Garza-Treviño, E.N., Ixtepan-Turrent, L., & Singh, D.K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of nanobiotechnology*, 9, 1-8.
- Lavertu, M., Filion, D., & Buschmann, M.D. (2008). Heat-induced transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate produces chitosan precipitation and gelation. *Biomacromolecules*, 9(2), 640-650.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z.S., & Chen, G. (2011). Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1-16. doi:10.1155/2011/270974.
- Liu, J., Yang, L., Liu, K., & Gao, F. (2023). Hydrogel scaffolds in bone regeneration: Their promising roles in angiogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1050954.
- Moreira, C.D., Carvalho, S.M., Mansur, H.S., & Pereira, M.M. (2016). Thermogelling chitosan–collagen–bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 1207-1216.
- Murugadoss, A., & Chattopadhyay, A. (2007). A ‘green’ chitosan–silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst. *Nanotechnology*, 19(1), 015603.
- Ramteke, C., Chakrabarti, T., Sarangi, B.K., & Pandey, R.A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles from the aqueous extract of leaves of *Ocimum sanctum* for enhanced antibacterial activity. *Journal of chemistry*.
- Roy, N., & Barik, A. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles from the unexploited weed resources. *International Journal of Nanotechnology and applications*, 4(2), 95-101.
- Sarwer, Q., Amjad, M.S., Mehmood, A., Binish, Z., Mustafa, G., Farooq, A., ... Pérez de la Lastra, J.M. (2022). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Myrsine africana* leaf extract for their antibacterial, antioxidant and phytotoxic activities. *Molecules*, 27(21), 7612.

- Siripanth, J., & Wongwitthayakool, P. (2018). Flexural Strength and Viscoelastic Properties of Acrylic Resin Denture Base Material Containing Silver Nanoparticle Synthesized from Fingerroot Aqueous Extract. *Key Engineering Materials*, 777, 178-182. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.777.178.
- Wongwitthayakool, P., & Pudla, M. (2018). Thermal Properties of Acrylic Resin Denture Base Material Containing Silver Nanoparticle Synthesized from Aqueous Extract of *Boesenbergia rotunda*. *Key Engineering Materials*, 777, 173-177. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.777.173.
- Xie, Y., Liao, X., Zhang, J., Yang, F., & Fan, Z. (2018). Novel chitosan hydrogels reinforced by silver nanoparticles with ultrahigh mechanical and high antibacterial properties for accelerating wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 402-412.
- Xiong, Y., & Xiong, Y. (2022). Applications of bone regeneration hydrogels in the treatment of bone defects: A review. *Journal of Materials Science*, 1-27.
- Yathavan, B., Chhibber, T., Steinhaff, D., Pulsipher, A., Alt, J.A., Ghandehari, H., & Jafari, P. (2023). Matrix-Mediated Delivery of Silver Nanoparticles for Prevention of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation in Chronic Rhinosinusitis. *Pharmaceutics*, 15(10), 2426.
- Yin, I.X., Zhang, J., Zhao, I.S., Mei, M.L., Li, Q., & Chu, C.H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine*, 15, 2555-2562. doi:10.2147/ijn.S246764.