

การพัฒนาซิลเวอร์นาโนสำหรับยับยั้งแบคทีเรียบนผ้ายีนส์ Development of Anti- Bacterial Nano Silver for Denim

กมลชนก ปานคำ (Kamonchanok Parnkham)* ดร.รินา ภัทรมานนท์ (Dr.Rina Patramanon)**

ดร.เยาวพา ตริกมล (Dr.Yaowapa Treekamol)***

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยการเติมสารยึดติดคือกรดซิตริกสำหรับใช้เคลือบบนผ้าโดยวิธีการสเปรย์ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวช่วยให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนติดกับพื้นผิวของผ้าผ่านอันตรกิริยาทางเคมี แบ่งออกเป็น 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.05 0.10 และ 0.20 โมลาร์ ทำปฏิกิริยากับอนุภาคซิลเวอร์นาโนความเข้มข้น 64 µg/mL ในอัตราส่วน 1:1 จากการศึกษาสัณฐานวิทยาพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดเฉลี่ย 8.7 ± 3.2 นาโนเมตร และผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียตามวิธีมาตรฐาน AATCC100-2004 พบว่าผ้าที่ผ่านการเคลือบด้วยสเปรย์ซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Escherichia coli* และแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* สูงกว่า 96 เปอร์เซ็นต์แม้ผ่านการสเปรย์ทิ้งไว้นาน 14 วัน ผลที่กล่าวมาชี้ให้เห็นว่าสเปรย์ซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้นานสำหรับยีนส์

ABSTRACT

The aim of this study is to develop anti-bacteria efficiency of silver nanoparticle (AgNPs) by adding a binder, citric acid (CA) using spray coating method. CA chemically interacted onto both cotton fibers and AgNPs. CA was divided into 3 concentrations including 0.05, 0.10 and 0.20 molar. They were mixed with AgNPs dispersion concentration of 64 µg/mL with ratio of 1:1. The study found that AgNPs were in spherical shape with an average diameter around 8.7 ± 3.2 nm. The anti-bacteria efficiency activity test by AATCC100-2004 method against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. It was found that antibacterial efficiency was higher than 96 % and lasted up to 14 days after spraying. These results suggested that Ag@Citric spray can be used as a long-term anti -bacterial spray to denim products.

คำสำคัญ: อนุภาคซิลเวอร์นาโน สารช่วยยึดติด การยับยั้งแบคทีเรีย

Keywords: Silver nanoparticle, Binder, Anti-bacterial

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวัสดุศาสตร์และนาโนเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***อาจารย์ สาขาวิชาฟิสิกส์ หลักสูตรวัสดุศาสตร์และนาโนเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

เสื้อผ้า เครื่องนุ่งห่มเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่สำคัญในการดำรงชีวิตประจำวันของมนุษย์ ชนิดของเส้นใยที่นิยมสวมใส่อยู่ในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น ฝ้าย ไหม ยีนส์ หนัง หรือเส้นใยสังเคราะห์อื่น ๆ ยีนส์ ถือเป็นเส้นใยที่ได้รับความนิยมมากเนื่องจากมีลักษณะเฉพาะที่โดดเด่น คือ มีความทนทานของตัวเนื้อผ้า หรือทนทานต่อสภาวะอากาศต่าง ๆ และเนื้อด้วยเนื้อผ้าเหล่านี้มีราคาค่อนข้างสูงทำให้การซักทำความสะอาดเป็นสิ่งที่ไม่สะดวกสบายนัก เพราะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีให้ซีดจาง และรูปทรงของผลิตภัณฑ์อย่างมาก ดังนั้นผลิตภัณฑ์ในกลุ่มผ้าเหล่านี้จึงมักไม่นิยมซักบ่อย ๆ เพื่อให้สีและรูปทรงของผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพเช่นเดิม ผู้บริโภคจึงประสบปัญหาในเรื่องของความสะอาดและกลิ่นที่เกิดจากการใช้งานซ้ำ ๆ โดยที่ไม่ผ่านการซัก ผ้ายีนส์ส่วนใหญ่ทำมาจากเส้นใยจากธรรมชาติ คือ เส้นใยฝ้ายซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก มีคุณสมบัติสามารถดูดซับน้ำ เหงื่อ ได้รวดเร็ว ระบายอากาศและความชื้นได้ดี (Yang et al., 2017). ทำให้เกิดความสะอาดสบายเมื่อสวมใส่ อย่างไรก็ตามข้อเสียเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการดูดซับเหงื่อที่ต่ำ มักจะเกิดปัญหาในเรื่องของการอับชื้นที่เกิดจากไขมันและเหงื่อของผู้ใช้งาน จึงเป็นแหล่งสะสมอาหารที่ดีที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์และอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพ อีกทั้งยังอาจทำลายเส้นใยของผ้าได้ การจัดการกับแบคทีเรียจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหากลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ ดังนั้นการใช้สารยับยั้งแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกที่จะสามารถช่วยแก้ปัญหานี้ได้ หนึ่งในนาโนเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับฆ่าเชื้อแบคทีเรีย คือ อนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งเป็นที่รู้กันดีว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ด้วยความเข้มข้นต่ำและแสดงกลไกการยับยั้งแบคทีเรียได้ (กานต์พิมล, รินา, 2560; Tang, Zheng, 2018). Xia et al. (2019) รายงานว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (100 ppm) ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีความเป็นพิษน้อยและปลอดภัยต่อเซลล์มนุษย์สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุเคลือบที่ปลอดภัย การนำสารละลายคอลลอยด์อนุภาคซิลเวอร์นาโนมาใช้สเปรย์บนเสื้อผ้าพบว่าสามารถลดปัญหาจากการเกิดกลิ่นอับชื้นและป้องกันแบคทีเรียได้ดี ช่วยแก้ปัญหาให้กับสิ่งทอที่ไม่สะดวกในการซักและป้องกันแบคทีเรียมาเกาะบนสิ่งทอซึ่งจะทำลายเส้นใยของผ้า อย่างไรก็ตามอันตรกิริยาที่ไม่แข็งแรงระหว่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนและพื้นผิวของผ้าทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนถูกออกซิไดซ์โดยอากาศอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียไม่ยาวนาน จากการศึกษาวิธีการแก้ไขปัญหานี้สามารถทำได้โดยการเพิ่มสารช่วยยึดติด (Hebeish et al., 2011). ในงานวิจัยนี้ได้ใช้สารช่วยยึดติด คือ กรดซิตริก (citric acid) กรดซิตริกเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ตามธรรมชาติในผักและผลไม้โดยเฉพาะผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาว ไม่มีความเป็นพิษ และราคาถูก สูตรทางเคมีคือ $C_6H_8O_7$ โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริกประกอบไปด้วยหมู่คาร์บอกซิล (Apelblat, 2014). สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลจากเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผ้าด้วยพันธะไฮโดรเจน และกรดซิตริกจะยึดติดกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยการทำอันตรกิริยาระหว่างอะตอม AgNPs และ O ซึ่งมาจากหมู่คาร์บอกซิลของกรดซิตริก หรือยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของกรดซิตริกและหมู่ไฮดรอกซิลของกรดแทนนิกที่ล้อมรอบอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งกรดซิตริกทำหน้าที่เป็นสารช่วยยึดติดระหว่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนกับผ้า และจะช่วยในการกระจายตัวของอนุภาคและควบคุมการปลดปล่อยไอออนของอนุภาค ซิลเวอร์นาโน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาเพื่อเตรียมอนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยการเติมสารช่วยยึดติดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบบนผ้าโดยวิธีการสเปรย์ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยทดสอบกับเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อเตรียมอนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยการเติมสารยึดติดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับใช้กับการเคลือบบนผ้าโดยวิธีการสเปรย์
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโนหลังจากเติมสารช่วยยึดติด

วิธีการวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้แบ่งเป็น 4 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็นการเตรียมผ้าฝ้ายสำหรับการทดสอบ ส่วนที่สองเป็นวิธีการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้และค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ส่วนที่สามคือการเตรียมอนุภาคซิลเวอร์นาโนและสารช่วยยึดติดและส่วนที่สี่ทำการเคลือบสารตัวอย่างลงบนผ้าโดยวิธีการสเปรย์เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมชิ้นตัวอย่างแผ่นผ้าทดสอบ

ตัดผ้าเป็นวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4.8 เซนติเมตร จากนั้นนำผ้าไปผ่านการซักทำความสะอาด โดยเตรียมเอทานอลใส่ปิกรเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำผ้าที่ตัดเตรียมไว้จุ่มลงในปิกรเกอร์ และทำความสะอาดด้วยเครื่องทำความสะอาดแบบอัลตราโซนิก เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวนสองครั้ง ครั้งละ 30 นาที แล้วนำผ้าไปตากหรืออบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้และค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ของอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยวิธี Serial dilution plate count

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E.coli*) และ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนเชิงปริมาณ โดยการเตรียมเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด (Nutrient Broth, NB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการ Sub-culture เชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด เป็นเวลา 1.5 – 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการเตรียมความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ประมาณ 10^5 กลุ่มแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) และเตรียมความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ 2-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) จากนั้นเติม 50 ไมโครลิตร ของทั้งอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวลงบน 96-well plate โดยมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแทนการเติมอนุภาคเงินนาโนเพื่อเป็นกลุ่มตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (Negative control) จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลานำมาดูความขุ่นใสของสารละลาย ซึ่งความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (หลุมที่มีสารละลายที่ใส) จะถือเป็นค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal inhibitory concentration, MIC) ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อเชื้อแบคทีเรียนั้น นอกจากนี้ยังสามารถหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) ได้โดยการนำสารละลายในหลุมที่พบสีใสมาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient agar, NA) และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลานำมาดูว่าความเข้มข้นใดที่ต่ำสุดของอนุภาคเงินนาโนที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้ออีกถือว่าเป็นค่า MBC ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อเชื้อแบคทีเรียนั้น

การเตรียมอนุภาคซิลเวอร์นาโนและสารช่วยยึดติด

เตรียมอนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ โดยความเข้มข้นเป็นค่าที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโน คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ผสมกับกรดซิตริกในอัตราส่วนที่เหมาะสม แบ่งออกเป็น 3 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อให้ได้สารที่เตรียมนั้นมีความเสถียรและกระจายตัวได้ดีด้วยเครื่องกวนสารละลายชนิดให้ความร้อน (Hot plate stirrer) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง เพื่อให้ได้สารละลายที่ผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนและกรดซิตริก (Ag@Citric) นำไปสเปรย์ลงบนพื้นผิวผ้า จากนั้นนำไปวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีด้วยเทคนิค TEM, UV-Vis และการศึกษาประจุและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่ผิวของสารตัวอย่าง

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนผสมและความเข้มข้นระหว่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนกับสารช่วยยึดติด

Sample	Binder	Concentration of binder (Molar, M)	Concentration of AgNPs ($\mu\text{g/mL}$)	Ratio (volume total 100 mL)
1.		0.05		
2.	Citric acid	0.10	64	1:1
3.		0.20		

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบนผ้าด้วยการทดสอบเชิงปริมาณ (Quantitative Test) โดยวิธีมาตรฐาน AATCC 100-2004 ทั้งในระยะสั้นและยาวที่อนุภาคซิลเวอร์นาโนยังคงมีประสิทธิภาพบนผ้า

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ของแผ่นผ้าทดสอบทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ได้แก่ S1. Ag@Citric-0.05 M, S2. Ag@Citric-0.10 M และ S3. Ag@Citric-0.20 M โดยวิธีมาตรฐาน AATCC 100-2004 โดยเริ่มจากการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด (Nutrient Broth, NB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการ Sub-culture เชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เป็นเวลา 1.5 – 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการเตรียมความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ประมาณ 10^{5-6} กลุ่มแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) การเจือจางเชื้อทำการปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^5 CFU/mL ด้วย PBS buffer และนำตัวอย่างผ้าที่จะทดสอบใส่ลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 250 มิลลิลิตร โดยการวางซ้อนกัน 2 ชั้นงกลม จากนั้นหยดเชื้อ 1 ± 0.1 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นผ้าทดสอบ และบ่มที่ 35.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดสอบที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง โดยการเติม PBS buffer ปริมาตร 100 ± 1.0 มิลลิลิตร และเขย่า 1 นาที เจือจางเชื้อและนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี drop plate โดยใช้อาหารเพาะเชื้อแบบแข็ง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำเพื่อความแม่นยำและน่าเชื่อถือของข้อมูล) (Grissana et al., 2019). จากนั้นจึงนำมาคำนวณร้อยละการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (% kill) ดังสมการ

$$\% \text{ kill} = (CFU/mL_{\text{control},0h} - CFU/mL_{\text{sample},24h}) / CFU/mL_{\text{control},0h} \times 100$$

สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสาขาวัสดุศาสตร์และนาโนเทคโนโลยี อาคารวิทยวิภาส และสาขาวิชาชีวเคมี ตึก SC.07 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ใช้ระยะเวลาในการทดลอง 365 วัน (52 สัปดาห์)

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้และค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ของอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยวิธี Serial dilution plate count

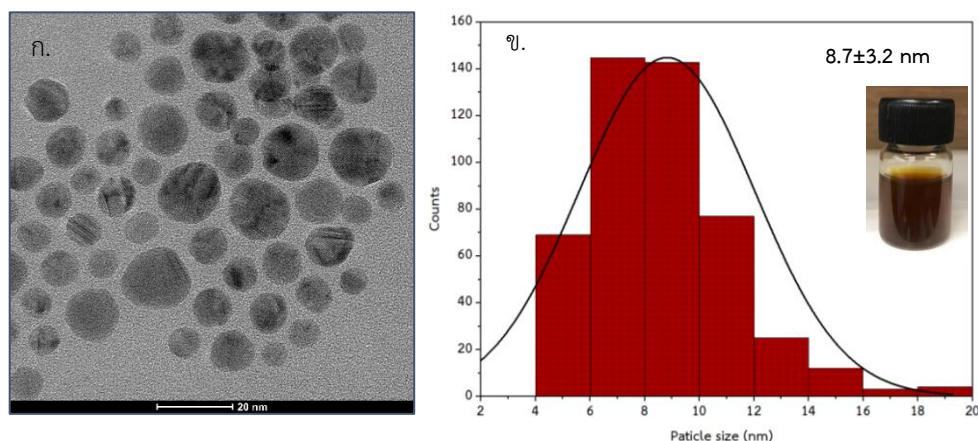
เมื่อนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาทดสอบเพื่อหาค่า MIC และ MBC พบว่าความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 µg/mL ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 32 และ 64 µg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC และ MBC ระหว่างแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด พบว่าค่า MIC และ MBC ของเชื้อ *S. aureus* มากกว่าเชื้อ *E. coli* นั้นเป็นเพราะว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของ peptidoglycan บนผนังเซลล์ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบจึงอาจทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สูงกว่าในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Steward, 2019).

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal bactericidal concentration, MBC) ของอนุภาคซิลเวอร์นาโน

แบคทีเรียทดสอบ	ความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน (µg/mL)	
	MIC (mean ± SD)	MBC (mean ± SD)
<i>E. coli</i> (แกรมลบ)	2.00 ± 0.01	4.00 ± 0.01
<i>S. aureus</i> (แกรมบวก)	32.00 ± 0.10	64.00 ± 0.20

ลักษณะทางกายภาพและทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคซิลเวอร์นาโน

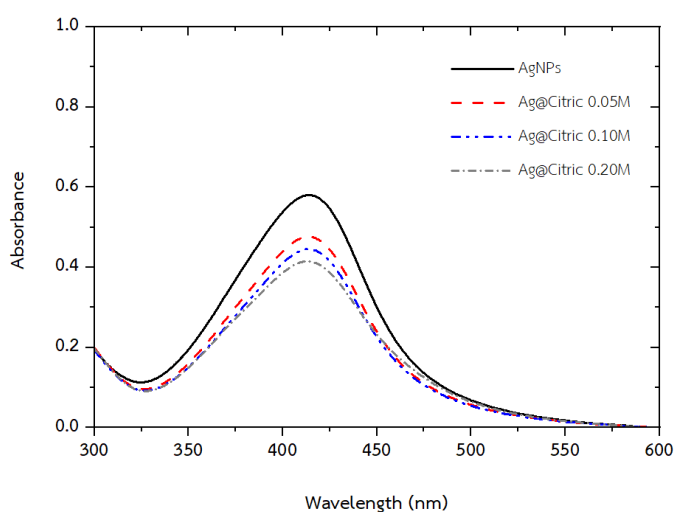
ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเกตได้จากการมองเห็นด้วยตาเปล่า พบว่าเป็นสารคอลลอยด์สีเหลืองน้ำตาล ศึกษาสัณฐานวิทยาของอนุภาคซิลเวอร์นาโนซึ่งศึกษาเพื่อวัดขนาด รูปร่าง และดูการกระจายขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) และทำการวัดขนาดอนุภาคด้วยโปรแกรม Image J จาก TEM micrograph พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีรูปร่างเป็นทรงกลม และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 8.7±3.2 นาโนเมตร



ภาพที่ 1 ก. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนและ ข. การกระจายขนาด (Size distributions) ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนวัดขนาดอนุภาคด้วยโปรแกรม ImageJ (ภาพแทรกใน ข. อนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์)

ผลการศึกษาด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง

ผลการศึกษาด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible spectrophotometer) ของสเปรย์ Ag@Citric ทั้ง 3 ตัวอย่าง ทำการวัดในช่วงความยาวคลื่น 300-600 นาโนเมตร จากภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่าความยาวคลื่น (Wavelength) ผลการทดสอบพบว่าสเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 414 นาโนเมตร และเมื่ออยู่ในสภาวะของการเป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโนคอมโพสิตกับกรดซิตริกในแต่ละตัวอย่างจะพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 414 นาโนเมตร ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าเมื่อมีการเติมกรดซิตริกจะไม่ทำให้เกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาค หรือไม่ส่งผลให้ขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนเปลี่ยนแปลง



ภาพที่ 2 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Vis ของอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) และ Ag@Citric ทั้ง 3 ตัวอย่าง

ผลการศึกษาประจุผิวและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า

การศึกษาประจุผิวและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (Zeta potential) เพื่อศึกษาคุณสมบัติการกระจายตัวในระดับคอลลอยด์ของอนุภาคในสารตัวอย่าง ซึ่งค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าสามารถบ่งบอกแนวโน้มว่าอนุภาคจะมีการเกาะตัวกันเป็นก้อนหรือไม่ จากผลการทดสอบพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่ผิวเป็นลบ คือ -46.7 ± 2.2 มิลลิโวลต์ เนื่องจากถูกล้อมรอบด้วยกรดแทนนิกที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) ที่มีสภาพเป็นลบ มีการกระจายตัวที่ดี และ Ag@Citric ทั้ง 3 ตัวอย่าง ศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่ผิวมีค่าเป็นลบ -38.4 ± 1.9 , -37.4 ± 4.3 และ -32.4 ± 2.0 มิลลิโวลต์ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคซิลเวอร์นาโน นั้นแสดงว่ามีอันตรกิริยาเกิดขึ้นระหว่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนและสารยึดติด เนื่องจากค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเติมสารช่วยยึดติดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จะสังเกตได้ว่ามีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเป็นบวกมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารช่วยยึดติดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยคาดว่าอาจเกิดจากสารช่วยยึดติดเกิดอันตรกิริยากับพื้นผิวของอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยทั่วไปค่าศักย์ไฟฟ้ามีค่าเป็นลบมาก ๆ จะแสดงให้เห็นว่าจะไม่มีแรงหรือมีแรงน้อยลงในการทำให้อนุภาคเกิดการจับตัวกัน นั่นคือเกิดการหักล้างต่อกันเกิดสภาวะการกระจายอย่างสม่ำเสมอ แต่ถึงอย่างไรก็ตามจากผลลัพธ์พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างที่มีการเติมกรดซิตริกมีการกระจายตัวของอนุภาคที่ดี

ตารางที่ 3 แสดงค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าและผลลัพธ์การกระจายตัวของอนุภาคในสารตัวอย่าง

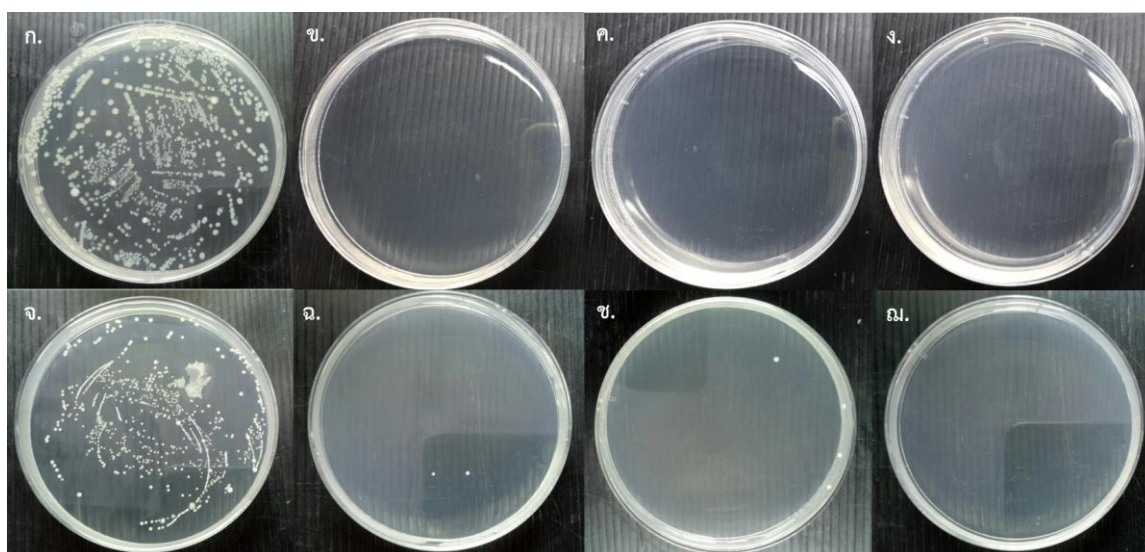
Sample solution	Zeta Potential (mV)	Zeta Potential Distribution
AgNPs	- 46.7 ± 2.2	Good
S1. Ag@Citric-0.05 M	- 38.4 ± 1.9	Good
S2. Ag@Citric-0.10 M	- 37.4 ± 4.3	Good
S3. Ag@Citric-0.20 M	- 32.4 ± 2.0	Good

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ในการทดสอบส่วนนี้จะทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ในระยะสั้นและระยะยาวของผ้าที่ผ่านการเคลือบด้วยสารตัวอย่างและไม่ผ่านการเคลือบ

ระยะสั้น

จากผลการทดสอบ จะเห็นได้ว่าเมื่อนำผ้าที่ผ่านการสเปรย์ด้วยสารแต่ละตัวอย่าง ทิ้งไว้ 1 วัน มาทำการทดสอบและสามารถสังเกตด้วยตาเปล่าดังแสดงในภาพที่ 3 ได้ว่าแบคทีเรียไม่มีการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือมีการเจริญเติบโตเพียง 1-2 โคโลนี ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผ้าที่ไม่ได้ผ่านการเคลือบ และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากการนับจำนวนโคโลนีของตัวอย่างทั้งหมด พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้สูงถึง 99.900 ± 0.005 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงถึง 99.840 ± 0.030 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าระดับความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีเยี่ยม



ภาพที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของสเปรย์นาโนแต่ละสูตรด้วยวิธีมาตรฐาน AATCC 100-2004 (ทดสอบประสิทธิภาพในระยะสั้น 1 วัน) ก-ง คือ ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ จ-ฉ ทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ของผ้าที่ไม่เคลือบด้วยสารตัวอย่างและผ้าเคลือบด้วยสารตัวอย่างที่ 1-3 เรียงตามลำดับ

ระยะยาว

ตารางที่ 4 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ระยะยาวหลังจากสเปรย์สารตัวอย่างบนผ้า 14 วัน

Sample	การยับยั้งแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
S1. Ag@Citric-0.05 M	95.4 ± 0.2	93.6 ± 0.1
S2. Ag@Citric-0.10 M	96.7 ± 0.2	95.2 ± 0.3
S3. Ag@Citric-0.20 M	98.0 ± 1.5	96.1 ± 0.1
ผ้าเคลือบด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโนปราศจากสารช่วยยึดติด	89.7 ± 0.8	84.2 ± 0.4

จากตารางที่ 4 พบว่าแผ่นผ้าที่เคลือบด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยปราศจากสารช่วยยึดติดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 89.7 ± 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 84.2 ± 0.4 เปอร์เซ็นต์ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสูงสุดต่อเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เท่ากับ 98.0 ± 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 96.1 ± 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับของผ้าที่ถูกล้างด้วยตัวอย่างที่ 3 โดยความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอยู่ในระดับดี และเมื่อเปรียบเทียบค่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของผ้าทั้ง 4 ตัวอย่าง จากตารางที่ 4 สามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ Ag@Citric-0.20 M > Ag@Citric-0.10 M > Ag@Citric-0.05 M > ผ้าเคลือบด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโนปราศจากสารช่วยยึดติด ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซิตริกส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโนสูงขึ้น นั่นอาจเป็นเพราะมีแรงยึดติดที่แข็งแรงระหว่างผ้ากับอนุภาคซิลเวอร์นาโน จากผลที่กล่าวมาข้างต้นยืนยันได้ว่าการเติมสารช่วยยึดติดทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่สูงกว่าและออกฤทธิ์ยาวนาน อนุภาคซิลเวอร์นาโนยังคงติดกับพื้นผิวของผ้าและออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อถึงแม้ผ่านการสเปรย์ทิ้งไว้ 2 สัปดาห์เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคเงินนาโนที่ไม่มีสารช่วยยึดติด

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้เตรียมในการทดลองมีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 8.7 ± 3.2 nm ลักษณะที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าคือเป็นสีเหลืองน้ำตาล และความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 64 µg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของมนุษย์ ผลการเตรียมอนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยเติมสารช่วยยึดติดคือกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.05 0.10 และ 0.20 โมลาร์ พบว่าไม่ทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนเกาะกลุ่มกัน ขนาดไม่เปลี่ยนแปลง การดูดกลืนแสงของทั้ง 3 ตัวอย่างดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 414 นาโนเมตรซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ไม่มีการเติมสารช่วยยึดติดและมีการกระจายตัวของอนุภาคในสารตัวอย่างที่ดี มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่เป็นลบสูง สำหรับผลของการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในระยะสั้น (หลังจากสเปรย์สารตัวอย่างบนผ้าไว้ 1 วัน) พบว่าอยู่ในระดับดีเยี่ยมสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้สูงถึง 99.840 ± 0.030 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในระยะยาว (หลังจากสเปรย์สารตัวอย่างบนผ้าไว้ 14 วัน) พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงสุดอยู่ที่ 98.0 ± 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยืนยันได้ว่าการมีสารช่วยยึดติดทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีความคงทนและออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้มีประสิทธิภาพและยาวนานกว่าการใช้เพียงอนุภาคซิลเวอร์นาโน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักสนับสนุนกองทุนวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนห้องเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- กานต์พิมล กรไกร, รินา ภัทรมานนท์. อนุภาคเงินนาโนสังเคราะห์ด้วยสารสกัดจากพืชและความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์. ว.วิทย์.มช. 2560; 45(1): 34-52.
- Apelblat A. (Ed.) Citric acid chemistry. In Citric Acid; Springer: Cham, Switzerland, 2014; 213–266.
- Hebeish A, El-Naggar M. E, Fouda Moustafa M. G, Ramadan M. A, Al-Deyab Salem S, El-Rafie M. H. Highly effective antibacterial textiles containing green synthesized silver nanoparticles. Carbohydrate Polymers 2011; 86(2): 936-940.
- Pook-In G, Seansupa K, Upakut S. Inhibition of Staphylococcus aureus by the cotton fabrics treated with the crude finish produced from Streptomyces sp. strain AC4. Journal of Food Health and Bioenvironmental Science 2019; 12(1): 44-53.
- Steward, K., Gram Positive vs Gram Negative, in Immunology and Microbiology 2019: Technology Networks.
- Tang S, Zheng J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. Adv Healthc Mater 2018; 7(13): 1701503-1701512.
- Xia Q, Yang L, Hu K, L K, Xiang J, Liu G, et al., Chromium Cross-Linking Based Immobilization of Silver Nanoparticle Coating on Leather Surface with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity and Durability. ACS Appl Mater Interfaces 2019; 11(2): 2352-2363.
- Yang Z, Zhang Y, Fu F, Liu XD. Single-faced flame resistance of cotton fabrics modified via mist Copolymerization. RSC Adv 2017; 7: 53871-53877.