

การปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของแผ่นไฮโดรเจลสำหรับใช้เป็นวัสดุปิดแผล

The Release of Silver Nanoparticles and Antibacterial Properties of Hydrogel Sheet Dressings

เพ็ญนภา การะเวก^{1,*}, รัตนกรณ เชียงหนุ่น¹, วิราณี ศรีเวียง¹, ประณิตา มีเพียร¹,
ณัฐวรรณ ศรีตะปัญญะ¹, เหนือตะวัน อารังสิริภาคย์², ธนาพล อยู่เย็น², พิมพพร อุทัยรัตน์¹
¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีนิวเคลียร์ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) นครนายก 26120

²ศูนย์ฉายรังสี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) นครนายก 26120

Pennapa Karawak^{1,*}, Rattanakorn Chiangnoon¹, Wiranee Sriwiang¹,
Pranita Meepean¹, Natawan Sritapanya¹, Nuatawan Thamrongsiripak²,
Thanapon Yooyen², Pimpon Uttayarat¹

¹Nuclear Technology Research and Development Center,

Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization), Nakhon Nayok 26120

²Irradiation center, Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization), Nakhon Nayok 26120

Received 25 September 2023; Received in revised 14 February 2024; Accepted 30 April 2024

บทคัดย่อ

ซิลเวอร์นาโนได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในแผ่นปิดแผล เนื่องจากมีสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในวงกว้าง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซิลเวอร์นาโนที่ปลดปล่อยออกจากแผ่นไฮโดรเจล และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในการทดลองใช้เทคนิคแช่แข็งสลับละลายร่วมกับการฉายลำอิเล็กตรอนเพื่อเชื่อมขวางแผ่นไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และซิลเวอร์ไนเตรด โดยระหว่างกระบวนการฉายรังสีซิลเวอร์ไนเตรดถูกรีดิวซ์ให้เป็นซิลเวอร์นาโนภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล ผลการศึกษาพบว่าซิลเวอร์นาโนถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นไฮโดรเจลโดยมีพิคค่าการดูดกลืนแสงที่ ~ 410 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy อย่างไรก็ดีเมื่อนำไปวางบนบาดแผลเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* พบว่าเกิดบริเวณที่ปราศจากการเจริญของแบคทีเรียอย่างชัดเจน เมื่อแผ่นไฮโดรเจลมีซิลเวอร์นาโนผสมอยู่ที่ 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยมีการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนที่ ~ 65 และ 225 ppm ตามลำดับจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-MS ดังนั้นแผ่นไฮโดรเจลผสมซิลเวอร์นาโนที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นแผ่นแปะผิวหนังสำหรับรักษาบาดแผลติดเชื้อ

*ผู้รับผิดชอบบทความ: Pennapa@tint.or.th

doi: 10.14456/tstj.2024.38

คำสำคัญ: แผ่นไฮโดรเจล; ซิลเวอร์นาโน; การแช่แข็งสลับละลาย; การฉายลำอิเล็กตรอน; การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

Recently the use of silver nanoparticles (AgNPs) in wound dressings has attracted considerable attention due to their potent antibacterial properties. The aim of this research was to investigate the release of AgNPs from hydrogel dressings by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) analysis and their antibacterial properties by disc diffusion assay. Freeze-thawing and electron beam (EB) irradiation techniques were used to crosslink hydrogel patches composed of silver nitrate at varied concentrations. During EB irradiation silver nitrate was reduced to AgNPs within the hydrogel matrices. Although UV-Vis spectroscopy showed the characteristics absorbance peaked at 410 nm from all AgNPs-embedded hydrogels, the disc diffusion assay showed the formation of a clear zone without bacteria only for hydrogels with AgNPs at the two highest concentrations, 0.5 and 1.0 mg/cm², against both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The corresponding amounts of released AgNPs were ~ 65 and 225 ppm, respectively, as analyzed by ICP-MS. Taken together, the AgNPs-loaded hydrogels developed by freeze-thawing and EB irradiation techniques in this study have potential as antibacterial wound dressings.

Keywords: Hydrogel dressings; Silver nanoparticles; Freeze-thaw; Electron beam irradiation; Antibacterial

1. บทนำ

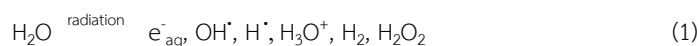
ซิลเวอร์นาโนถูกนำมาใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ในวงกว้าง (broad-spectrum bioactivities) [1] ด้วยขนาดของซิลเวอร์นาโนที่เล็กมาก จึงช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการจับกับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย อีกทั้งเมื่อซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ซิลเวอร์นาโนจะเข้าจับกับหมู่ไทออล (-SH) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และดีเอ็นเอ ทำให้กระบวนการทำงานของเอนไซม์ในระบบต่าง ๆ เช่นระบบหายใจ ผิดปกติ และดีเอ็นเอของเซลล์แบคทีเรียไม่สามารถจำลองตัวขึ้นใหม่ได้ ส่งผลให้เซลล์เสื่อมสภาพและตายในที่สุด [2, 3] นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการดื้อยาจากการใช้ซิลเวอร์นาโน ซึ่งถือเป็นข้อดีที่แตกต่าง

จากยาปฏิชีวนะที่พบว่าเมื่อมีการใช้ในปริมาณที่มากเกินไปหรือใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน จะส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย [4] ด้วยประสิทธิภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว จึงมีการนำซิลเวอร์นาโนมาใช้อย่างแพร่หลายทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวัสดุปิดแผล

การสังเคราะห์ซิลเวอร์นาโนสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น การใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี การสังเคราะห์ทางกายภาพ การเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ทางเคมี และการฉายรังสี เป็นต้น โดยการสังเคราะห์ซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิคการฉายรังสีจัดเป็นกระบวนการที่สามารถควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าทางเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งรังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ที่มีพลังงานสูง เช่น รังสีแกมมา และลำอิเล็กตรอน สามารถประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาค

นาโนของโลหะได้เป็นอย่างดี เนื่องจากรังสีสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งภาชนะ และสามารถควบคุมปฏิกิริยารีดักชันภายในช่วงระยะเวลาการฉายรังสี ทำให้ได้อนุภาคนาโนของโลหะมีขนาดสม่ำเสมอ นอกจากนี้ไม่มีการตกค้างของตัวรีดิวซ์ภายหลังการเกิดปฏิกิริยา อันถือเป็นข้อได้เปรียบกว่าวิธีทางเคมีที่จำเป็นต้องควบคุมการเกิดปฏิกิริยาให้มีความสม่ำเสมอทั่วทั้ง

ภาชนะและต้องคำนวณปริมาณของสารรีดิวซ์ให้เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมด นอกจากนี้การสังเคราะห์ซิลเวอร์นาโนจากเครื่องเร่งอิเล็กตรอนยังสามารถขยายผลไปสู่การผลิตขนาดใหญ่ได้ [5, 6] ทั้งนี้ขั้นตอนการสังเคราะห์ซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิคการฉายรังสีแสดงไว้ในสมการที่ 1-3



เริ่มโดยการเกิดเรดิโอไลซิสของน้ำ (water radiolysis) จากกระบวนการฉายรังสี ทำให้ได้อนุมูลไฮโดรเจน ($\text{H}^\cdot$) อนุมูลไฮดรอกซิล ($\text{OH}^\cdot$) ไฮโดรเนียมไอออน (H_3O^+) ไฮโดรเจน (H_2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และอิเล็กตรอนอิสระในน้ำ (e^-_{aq}) ดังแสดงในสมการที่ 1 ซึ่ง e^-_{aq} ที่เกิดขึ้นนี้ จัดเป็นตัวรีดิวซ์ที่มีประสิทธิภาพสูง และเมื่อ e^-_{aq} ทำปฏิกิริยากับซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) จึงทำให้เกิดการรีดิวซ์ Ag^+ เป็น Ag^0 ดังแสดงในสมการที่ 2 [7] จากนั้น Ag^0 จะเกิดการรวมกลุ่มกันเป็นซิลเวอร์นาโน หรือเรียกว่า นิวคลีโอ (nuclei) และเข้าสู่ระยะการก่อตัว (growth) ขึ้นทันที ซึ่งเมื่อนิวคลีโอเริ่มขยายตัว (nucleation growth) มากขึ้นอาจทำให้กลุ่มของซิลเวอร์นาโนมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเกิดเป็นตะกอนได้ [8] ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้นิวคลีโอเกิดการรวมตัวจนมีขนาดใหญ่มากเกินไป จึงต้องมีการใส่ตัวทำให้เสถียร (stabilizer) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ อาทิ พอลิไวนิลไพโรลิโดน (PVP) และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) เพื่อเข้าจับบนพื้นผิวของซิลเวอร์นาโน ทำให้ซิลเวอร์นาโนเกิดการเสถียร ดังแสดงในสมการที่ 3 [9] ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของซิลเวอร์นาโน ได้แก่ ขนาด รูปร่าง และความเข้มข้น กล่าวคือประสิทธิภาพการทำงานของซิลเวอร์นาโนจะลดลงตามขนาดอนุภาคที่เพิ่มขึ้น [1] โดย

เฉพาะซิลเวอร์นาโนที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร จะมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเชื้อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบภายในเซลล์แบคทีเรีย และเมื่อซิลเวอร์นาโนมีขนาดเล็กกว่า 10 นาโนเมตร จะสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยตรง [7, 10] งานวิจัยของ Kim และคณะ ก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบเงิน (Ag(I)-S12 inorganic-organic hybrid polymer) ตั้งต้นซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่สามารถถูกสังเคราะห์ให้เป็นซิลเวอร์นาโนได้ด้วยการฉายลำอิเล็กตรอน โดยขนาดของซิลเวอร์นาโนที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วง 3.1-100 นาโนเมตร ทั้งนี้สามารถควบคุมขนาดและการกระจายตัวในช่วงแคบของซิลเวอร์นาโนได้อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งภาชนะด้วยการปรับเปลี่ยนพลังงานกระแสไฟฟ้า และช่วงระยะเวลาในการฉายรังสี [6]

วัสดุปิดแผลที่ใช้รักษาบาดแผลมีหลายชนิด เช่น แผ่นฟิล์ม ไฮโดรเจล ไฮโดรคอลลอยด์ โฟม และอัลจินต [11] ซึ่งในกลุ่มของวัสดุปิดแผลที่หลากหลายนี้ ไฮโดรเจลซึ่งประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำและน้ำอยู่ภายในโครงสร้าง มีจุดเด่นด้านการส่งเสริมสภาวะความชุ่มชื้นที่เหมาะสมต่อการสมานแผล (moist wound environment) [12] เนื่องจากมีโครงสร้างร่างแหสามมิติที่สามารถกักเก็บความชื้นของเหลวที่ดูดซับจากแผล และใน

ขณะเดียวกันน้ำที่มีอยู่ในโครงสร้างของไฮโดรเจลสามารถถ่ายเทความชุ่มชื้นให้กับแผลได้ จึงเหมาะต่อการใช้รักษาแผลแห้งจนถึงแผลที่มีความแฉะปานกลาง [12, 13] โดยทั่วไปการขึ้นรูปไฮโดรเจลด้วยการเชื่อมขวางโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธี ได้แก่ วิธีการทางเคมี วิธีการกายภาพ และวิธีการฉายรังสี อย่างไรก็ตามการใช้สารเชื่อมขวางทางเคมี เช่น สารเคมีในกลุ่มอัลดีไฮด์ อาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่พึงประสงค์กับร่างกายได้ในภายหลัง หากมีการตกค้างภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล ในทางตรงกันข้ามวิธีการฉายรังสีซึ่งทำให้เกิดการเชื่อมขวางของพอลิเมอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรงเช่นเดียวกับการใช้สารเชื่อมขวางทางเคมี และวิธีการกายภาพที่ทำให้เกิดการเชื่อมขวางด้วยพันธะไฮโดรเจน หรือการจับกันของประจุ เช่น การใช้เทคนิคแช่แข็งสลับละลาย [12] จึงจัดเป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจลที่มีความบริสุทธิ์สูง ปราศจากสารเชื่อมขวางที่อาจเป็นอันตราย และเหมาะสำหรับการใช้งานด้านชีวการแพทย์ [14, 15]

ได้มีการนำพอลิเมอร์สังเคราะห์หลายชนิดที่สามารถละลายน้ำได้มาใช้สำหรับขึ้นรูปเป็นแผ่นไฮโดรเจล ได้แก่ พอลิเอทิลีนออกไซด์ (PEO) PVP และ PVA [16] นอกจากนี้งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มซิลเวอร์นาโนในไฮโดรเจลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ดังงานวิจัยของ Nho และคณะ [17] ที่ผสมสารประกอบเงินต่าง ๆ เช่น ซิลเวอร์ไนเตรต และซิลเวอร์ซัลฟาไดออกไซด์ ร่วมกับสารละลายผสม PVA และ PVP ก่อนนำไปขึ้นรูปเป็นไฮโดรเจลด้วยเทคนิคการแช่แข็งสลับละลาย 2 รอบ และฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 25 กิโลเกรย์ ผลการศึกษาพบว่าไฮโดรเจลที่ผสมสารประกอบเงินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* และ *Shudomonas aeruginosa* ได้โดยประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารประกอบเงินตั้งต้นภายในไฮโดรเจล ทั้งนี้ในงานวิจัยของ Nikolic และคณะ [9] ได้เตรียมไฮโดรเจลจาก

สารละลายผสม PVA และ PVP ในอัตราส่วนต่าง ๆ ร่วมกับการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 25 กิโลเกรย์ เพื่อขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจล จากนั้นนำแผ่นไฮโดรเจลที่ผ่านการอบแห้งแล้วไปทำให้บวมตัวอีกครั้งในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต และนำไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 18 กิโลเกรย์ เพื่อรีดิวซ์ซิลเวอร์ไนเตรตให้เป็นซิลเวอร์นาโน พบว่าแผ่นไฮโดรเจลผสมซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* อย่างไรก็ตามวิจัยเหล่านี้ยังไม่ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซิลเวอร์นาโนที่ปลดปล่อยออกมาจากไฮโดรเจลที่ขึ้นรูปด้วยกระบวนการทางรังสี และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค ICP-MS และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแผ่นไฮโดรเจลด้วยเทคนิค disc diffusion จากแผ่นไฮโดรเจลผสมซิลเวอร์นาโนที่ขึ้นรูปด้วยเทคนิคการแช่แข็งสลับละลาย ร่วมกับการฉายลำอิเล็กตรอน ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยทั่วไปงานวิจัยทางด้านวัสดุปิดแผลที่ผสมสารฆ่าเชื้อมักจะทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว แต่ไม่ได้วิเคราะห์สารฆ่าเชื้อในเชิงปริมาณที่ถูกปลดปล่อยออกจากวัสดุปิดแผล เพื่อบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้จุดเด่นของการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจลด้วยเทคนิคการแช่แข็งสลับละลายร่วมกับการฉายลำอิเล็กตรอนคือโครงสร้างร่างแหสามมิติภายในเจลแข็งแรงขึ้น อีกทั้งการฉายลำอิเล็กตรอนยังสามารถรีดิวซ์สารประกอบซิลเวอร์ไนเตรตให้เป็นซิลเวอร์นาโนได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารรีดิวซ์อื่น ๆ ซึ่งอาจตกค้างภายในไฮโดรเจล และสามารถขยายผลไปสู่การผลิตเชิงอุตสาหกรรมภายในระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าการฉายรังสีแกมมา ทั้งนี้ปริมาณรังสีที่ 25 กิโลเกรย์ ยังเป็นปริมาณที่นิยมใช้ในการปลอดเชื้อเครื่องมือแพทย์ [18, 19] ดังนั้นแผ่นไฮโดรเจลผสมซิลเวอร์นาโนสุดท้ายที่ขึ้นรูปได้ในงานวิจัยนี้จึงอยู่ในสภาพปลอดเชื้อพร้อมใช้งาน

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมแผ่นไฮโดรเจล

เตรียมสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (แผ่นไฮโดรเจล A-F) ดังแสดงไว้ใน Table 1 และที่ไม่ผสมสารซิลเวอร์ไนเตรด (ชุดควบคุม) เทลงบนแม่พิมพ์ขนาด 6 x 1.5 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำไปแช่แข็งที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาวางให้ละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการแช่แข็งสลับละลายทั้งหมด 2 รอบ จากนั้นนำไปฉายรังสีจากเครื่องเร่งอิเล็กตรอน (Model: MB10-50, Electron Beam Energy: 10 MeV) ที่ปริมาณรังสี 25 กิโลเกรย์ เพื่อให้ได้เป็นไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของซิลเวอร์นาโน

Table 1 The concentration of silver nitrate in the hydrogel sheets.

Hydrogel codes	Concentration of silver nitrate (mg/mL)
A	0.125
B	0.25
C	0.5
D	1.0
E	2.0
F	4.0

2.2 การวิเคราะห์ซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy

เตรียมแผ่นไฮโดรเจล A-F ให้เป็นแผ่นขนาด 1 เซนติเมตร x 1 เซนติเมตร ก่อนแช่ในน้ำปราศจากไอออน สุ่มไปเปิดเฉพาะน้ำที่เวลา 24 ชั่วโมง ไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 300-800 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.3 การปลดปล่อยซิลเวอร์ด้วยเทคนิค ICP-MS

บ่มแช่แผ่นไฮโดรเจล A-F ขนาด 1 เซนติเมตร x 1 เซนติเมตร ในกรดไนตริกความเข้มข้น 1% (v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนที่มีความเร็วรอบ 80 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สุ่มสารละลายจากหลอดตัวอย่างที่เวลา 4, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณซิลเวอร์นาโนที่ปลดปล่อยออกจากแผ่นไฮโดรเจลด้วยเครื่อง ICP-MS (Agilent

7900, Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion

เพาะเลี้ยง *S. aureus* (ATCC25923) และ *E. coli* (ATCC25922) ในอาหารเหลว nutrient broth ภายในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการบ่มมาเจือจางด้วยอาหารเหลว NB ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/ml) จากนั้นใช้สำลีก้านปลอดเชื้อเกลี่ย (swab) เชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง nutrient agar ตัดตัวอย่างแผ่นไฮโดรเจลทั้ง 6 ตัวอย่าง และชุดควบคุมให้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ด้วย cork borer ขูดตัวอย่างในน้ำกลั่นก่อนนำไปวางบนภาชนะอาหารแข็ง และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดเวลาบันทึกการเกิดบริเวณวงใส (clear zone) รอบชิ้นตัวอย่าง พร้อมทั้งคำนวณอัตราส่วนการ

ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (inhibition ratio) [20] ดังแสดงในสมการที่ 4

$$\text{Inhibition ratio} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone รอบชิ้นตัวอย่าง}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดั้งเดิมของชิ้นตัวอย่าง}} \quad (4)$$

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ลักษณะของแผ่นไฮโดรเจลผสมซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สีของแผ่นไฮโดรเจลผสมซิลเวอร์นาโนมีการเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโน โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดแผ่นไฮโดรเจลมีสีเหลืองอ่อน ก่อนจะได้ระดับความเข้มของสีขึ้นไปเป็นสีน้ำตาลเข้มและสีดำที่ความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนสูงสุด ดังแสดงใน Figure 1 ทั้งนี้เมื่อคำนวณความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนต่อพื้นที่ของแผ่นไฮโดรเจล A-F มีค่าอยู่ที่ 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ความเข้มสีของแผ่นไฮโดรเจลที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณของซิลเวอร์นาโนนี้ที่สังเกตได้ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Badi'ah และคณะ [21] ที่พบว่าคอลลอยด์ซิลเวอร์นาโนมีสีที่แตกต่างกัน เช่น สีเหลือง สีเหลืองทอง และสีเหลืองน้ำตาล โดยความเข้มของสีที่ปรับเปลี่ยนไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเริ่มต้น เช่นเดียวกันงานวิจัยของ Bhowmick และ Koul [22] พบว่าเมื่อใช้คลื่นเหนือเสียง (ultrasonic irradiation) สังเคราะห์สารละลายซิลเวอร์ไนเตรตให้เป็นซิลเวอร์นาโน สารละลายเปลี่ยนจากใสไม่มีสี เป็นสีเหลืองใส ซึ่งบ่งบอกถึงการก่อตัวของอนุภาคนาโนเงิน นอกเหนือจากสีของแผ่นไฮโดรเจลที่มีการเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนแล้วนั้น งานวิจัยนี้ยังพบว่าการเชื่อมขวางทางกายภาพของ PVA ด้วยเทคนิคการแช่แข็งสลับละลายจำนวน 2 รอบสามารถทำให้เกิดเป็นเจลได้ เนื่องจากเกิดการสร้างโครงสร้างกิ่งผลึกขึ้นผ่านพันธะไฮโดรเจนในกระบวนการแช่แข็งสลับละลาย โดยแผ่นไฮโดรเจลมีลักษณะยืดหยุ่นและมีความคงตัว

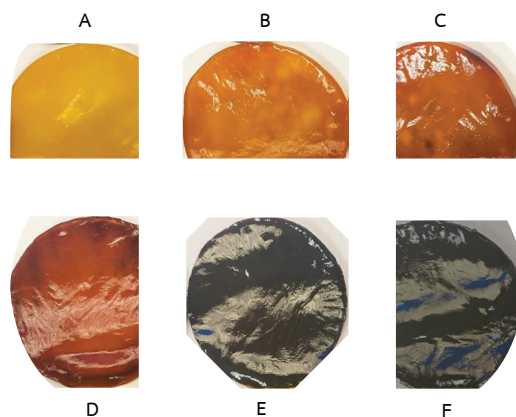


Figure 1 Characteristics of AgNPs-loaded PVA hydrogels at various AgNP concentrations prepared by freeze-thawing and EB irradiation. A, B, C, D, E and F refer to the hydrogels with completely synthesized AgNPs at 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/cm², respectively.

3.2 ผลการวิเคราะห์การปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy

ใช้เทคนิค UV-Vis spectroscopy ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพการปลดปล่อย AgNPs ออกมาจากแผ่นไฮโดรเจล ซึ่งแผ่นไฮโดรเจล A-F แสดงการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนได้ทุกแผ่น โดยการดูดกลืนแสงของน้ำที่สู่วัดจากการบ่มไฮโดรเจลที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังการบ่ม มีค่าอยู่ที่ 410 นาโนเมตร สอดคล้องกับผล

การวิจัยของ Alcântara และคณะ [7] ที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงของซิลเวอร์นาโนที่ ~ 405 นาโนเมตร ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของซิลเวอร์นาโนในสภาพคอลลอยด์ โดยพีคค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของซิลเวอร์นาโนที่ผสมในแผ่นไฮโดรเจล ดังแสดงใน Figure 2 อย่างไรก็ตามสำหรับแผ่นไฮโดรเจล E และ F ที่มีปริมาณ

ซิลเวอร์ความเข้มข้นที่ 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร พบว่าพีคการดูดกลืนแสงกว้างขึ้นไปทางช่วงความยาวคลื่นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากการรวมตัวของซิลเวอร์นาโนบางส่วนเป็นอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น [19]

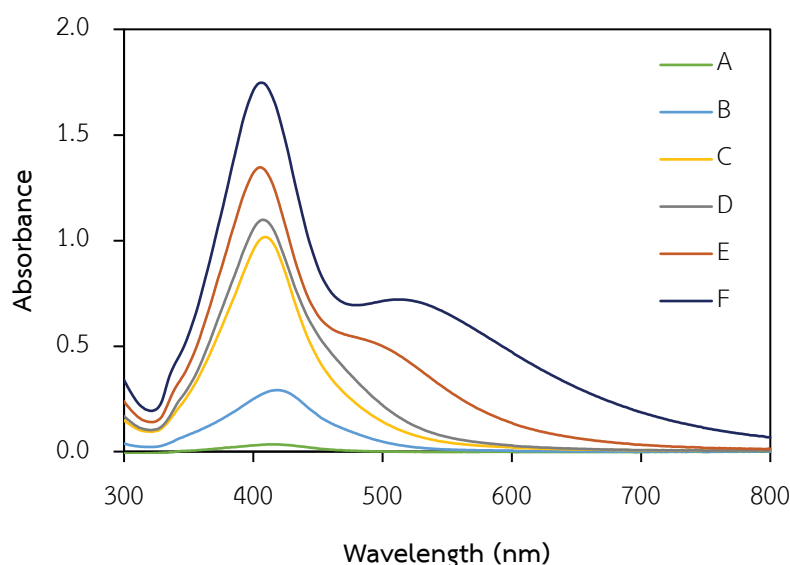


Figure 2 UV-Vis absorption spectra of AgNPs from AgNPs-loaded hydrogels at 24 h. A, B, C, D, E and F refer to the hydrogels containing AgNPs at 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/cm², respectively.

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ซึ่งจัด

เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบมากที่สุดในบาดแผลที่ติดเชื้อ และมีความต้านทานยาปฏิชีวนะ [23] ด้วยเทคนิค disc diffusion พบว่าเกิด clear zone รอบชิ้นตัวอย่างแผ่นไฮโดรเจล E และ F เท่านั้น ดังแสดงใน Figure 3

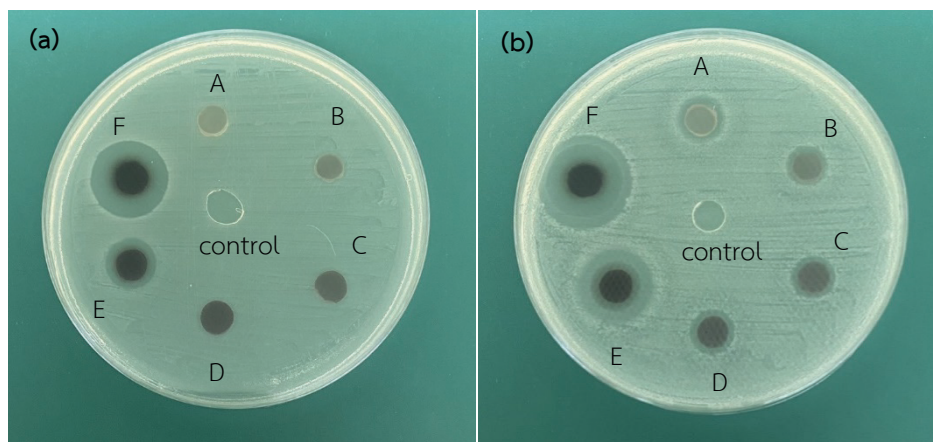


Figure 3 Disc diffusion assay to evaluate the antibacterial activity of AgNPs-loaded hydrogels against (a) *E. coli* and (b) *S. aureus*. Control refers to the hydrogel without AgNPs. A, B, C, D, E and F refer to the hydrogels with AgNPs at 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/cm², respectively.

โดยแผ่นไฮโดรเจลทั้งสองมีส่วนผสมของซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นช่วงสูงสุดในการวิจัยนี้ ในขณะที่แผ่นไฮโดรเจลผสมซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร ไม่ปรากฏ clear zone รอบขึ้นตัวอย่างเหมือนชุดควบคุม เมื่อคำนวณ

อัตราส่วนการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือ inhibition ratio จากขนาดของ clear zone ที่เกิดขึ้นพบว่าแผ่นไฮโดรเจลผสมซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นสูงสุดทั้งสองดังกล่าวมีค่า inhibition ratio สำหรับ *S. aureus* อยู่ที่ 1.3 และ 2.0 และมีค่า inhibition ratio สำหรับ *E. coli* อยู่ที่ 1.5 และ 2.1 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

Table 2 The inhibition ratios of AgNPs-loaded hydrogels against *E. coli* and *S. aureus*. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

AgNPs (mg/cm ²)	Inhibition ratio	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
A	-	-
B	-	-
C	-	-
D	-	-
E	1.5 $\pm$ 0.06	1.3 $\pm$ 0.07
F	2.1 $\pm$ 0.08	2.0 $\pm$ 0.03

ดังนั้นถึงแม้ว่าแผ่นไฮโดรเจลทั้งหมดจะสามารถปลดปล่อยของซิลเวอร์นาโนออกจากแผ่นได้ แต่ปริมาณที่มากพอที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้สอดคล้องกับความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนในแผ่นไฮโดรเจลที่ ≥ 0.5 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร

3.4 ผลการปลดปล่อยซิลเวอร์เชิงปริมาณจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-MS

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนกับความสามารถของแผ่นไฮโดรเจลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้วิเคราะห์การปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนเชิงปริมาณด้วยเทคนิค ICP-MS ซึ่งวัดปริมาณธาตุซิลเวอร์ในรูปของซิลเวอร์นาโนโดยการบ่มแช่ในกรดไนตริก ผลการวัดปริมาณซิลเวอร์นาโนที่เกิดขึ้นแสดงไว้ใน Figure 4 ปริมาณการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนจากแผ่นไฮโดรเจล A-F มีปริมาณสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สัมพันธ์กับการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแผ่นไฮโดรเจลด้วยเทคนิค disc diffusion โดยแผ่นไฮโดรเจล A-D มีปริมาณการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนอยู่ในช่วง 4-20 ppm ในขณะที่แผ่นไฮโดรเจล E และ F สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์นาโน ~ 65 และ 225 ppm ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนจากแผ่นไฮโดรเจล A-F เริ่มลดลงที่เวลา 48 ชั่วโมง ก่อนจะคงที่จนถึงระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ปริมาณการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนร่วมกับความสามารถในการยับยั้งเชื้อจะเห็นว่าปริมาณซิลเวอร์นาโน ~ 65 ppm ขึ้นไป หรือกล่าวได้ว่าแผ่นไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร ขึ้นไปนั้น สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Novientri และคณะ [24] ที่พบว่าไฮโดรเจลนาโนคอมโพสิตที่ประกอบด้วย PVA โพลีเอมัลลิจีนิต และซิลเวอร์นาโน สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* เมื่อมีความเข้มข้นในการยับยั้งขั้นต่ำ (minimum inhibitory

concentration; MIC) ของซิลเวอร์ในเตรต อยู่ที่ ~ 46 และ 75 ppm ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นขั้นต่ำในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bacterial concentration; MBC) อยู่ที่ ~ 185 และ 300 ppm ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ดี Laurano และคณะ [11] ได้รายงานไว้ว่าวัสดุปิดแผลทางการค้าโดยทั่วไปนั้น มีการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยความเข้มข้นอย่างต่ำทางคลินิกจะอยู่ในช่วง 5-50 ppm

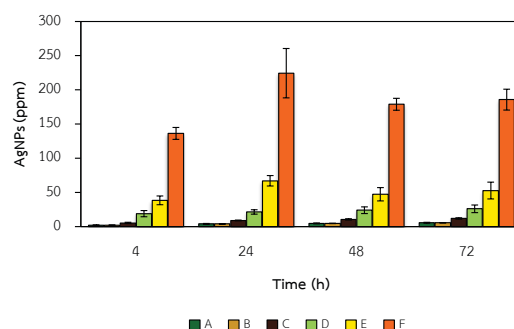


Figure 4 Release of AgNPs from AgNPs-loaded hydrogels measured by ICP-MS for 72 h. A, B, C, D, E and F refer to the hydrogels containing AgNPs at 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/cm², respectively.

4. สรุป

แผ่นไฮโดรเจลที่เตรียมจาก PVA และซิลเวอร์ในเตรตด้วยเทคนิคการแช่แข็งสลับละลาย 2 รอบ ร่วมกับการฉายลำอิเล็กตรอนที่ปริมาณรังสี 25 กิโลเกรย์ เพื่อรีดิวซ์ซิลเวอร์ในเตรตให้เป็นซิลเวอร์นาโนภายในโครงสร้าง สามารถปลดปล่อยปริมาณซิลเวอร์นาโนที่เพียงพอต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ได้ เมื่อส่วนผสมซิลเวอร์ในเตรตตั้งต้นมีความเข้มข้น ≥ 0.5 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณการปลดปล่อยซิลเวอร์นาโนที่ ≥ 65 ppm

5. References

- [1] Rai, M., Kon K., Ingle A., Duran N., Galdiero S. and Galdiero M., 2014, Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects, *Appl Microbiol. Biotechnol.* 98: 1951-1961.
- [2] Prabhu, S. and Poulouse, E.K., 2012, Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, *Int. Nano Lett.* 2: 1-10.
- [3] Li, R., Chen, J., Cesario, T.C., Wang, X., Yuan, J.S. and Rentzepis, P.M., 2016, Synergistic reaction of silver nitrate, silver nanoparticles, and methylene blue against bacteria, *PNAS.* 113(48): 13612-13617.
- [4] Hasan, T., Al-Harmoosh, R. and Al-Khilkhali, H., 2020, Identification of HIV virus in najaf city, Iraq, *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 11(3): 4866-4871.
- [5] Grzelczak, M. and Liz-Marzán, L.M., 2014, The relevance of light in the formation of colloidal metal nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.* 43: 2089-2097.
- [6] Kim, S.-E., Park, J.H., cheol Lee, B., Lee, J.-C. and Kwon, Y.K., 2012, Large-scale synthesis of silver nanoparticles using Ag (I)-S12 polymer through electron beam irradiation, *Radiat. Phys. and Chem.* 81(8): 978-981.
- [7] Alcântara, M.T.S., Lincopan, N., Santos, P.M., Ramirez, P.A., Brant, A.J.C., Riella, H.G. and Lugao, A.B., 2020, Simultaneous hydrogel crosslinking and silver nanoparticle formation by using ionizing radiation to obtain antimicrobial hydrogels, *Radiat. Phys. Chem.* 169: 108777.
- [8] Thanh, N.T., Maclean, N. and Mahiddine, S., 2014, Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution, *Chem. Rev.* 114(15): 7610-7630.
- [9] Nikolić, N., Spasojević, J., Radosavljević, A., Milošević, M., Barudžija, T., Rakočević, L. and Kačarević-Popović, Z., 2023, Influence of poly (vinyl alcohol)/poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) polymer matrix composition on the bonding environment and characteristics of Ag nanoparticles produced by gamma irradiation, *Radiat. Phys. Chem.* 202: 110564.
- [10] Yin, I.X., Zhang, J., Zhao, I.S., Mei, M.L., Li, Q. and Chu, C.H., 2020, The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry, *Int. J. Nanomedicine.* 2555-2562.
- [11] Laurano, R., Boffito, M., Ciardelli, G. and Chiono, V., 2022, Wound dressing products: A translational investigation from the bench to the market, *ER.* 3(2): 182-200.
- [12] Chiangnoon, R., Karawak, P., Eamsiri, J., Nuchdang, S., Thamrongsiripak, N., Neramitmansook, N., Pummarin, S., Pimton, P., Nilgumhang, K. and Uttayarat, P., 2023, Antibacterial Hydrogel Sheet Dressings Composed of Poly (vinyl alcohol) and Silver Nanoparticles by

- Electron Beam Irradiation, Gels. 9(2): 80.
- [13] Husain, M.S.B., Gupta, A., Alashwal, B.Y. and Sharma, S., 2018, Synthesis of PVA/PVP based hydrogel for biomedical applications: a review, Energy Sources A: Recovery Util. Environ. Eff. 40(20): 2388-2393.
- [14] Gupta, S., Goswami S. and Sinha A., 2012, A combined effect of freeze--thaw cycles and polymer concentration on the structure and mechanical properties of transparent PVA gels, Biomed Mater. 7(1): 015006.
- [15] Adelnia, H., Ensandoost, R., Moonshi, S.S., Gavgani, J.N., Vasafi, E.I. and Ta, H.T., 2022, Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future, Eur. Polym. J. 164: 110974.
- [16] Kamoun, E.A., Chen, X., Eldin, M.S.M. and Kenawy, E.R.S., 2015, Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers, Arab. J. Chem. 8(1): 1-14.
- [17] Nho, Y.C., Lim Y.M., Gwon H.J. and Choi E.K., 2009, Preparation and characterization of PVA/PVP/glycerin/antibacterial agent hydrogels using γ -irradiation followed by freeze-thawing, Korean J Chem Eng. 26: 1675-1678.
- [18] Silindir, M. and Özer A.Y., 2009, Sterilization methods and the comparison of E-beam sterilization with gamma radiation sterilization, Fabad J. Pharm. Sci. 34(1): 43.
- [19] Uttayarat, P., Eamsiri, J., Tangthong, T. and Suwanmala, P., 2015, Radiolytic synthesis of colloidal silver nanoparticles for antibacterial wound dressings, Adv. Mater. Sci. Eng. 2015.
- [20] Uttayarat, P., Jetawattana, S., Suwanmala, P., Eamsiri, J., Tangthong, T. and Pongpat, S., 2012, Antimicrobial electrospun silk fibroin mats with silver nanoparticles for wound dressing application. Fibers Polym. 13(8): 999-1006.
- [21] Badi'ah, H., Seede, F., Supriyanto, G. and Zaidan, A., 2019, Synthesis of silver nanoparticles and the development in analysis method. in IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing.
- [22] Bhowmick, S. and Koul, V., 2016, Assessment of PVA/silver nanocomposite hydrogel patch as antimicrobial dressing scaffold: Synthesis, characterization and biological evaluation, Mater. Sci. Eng. C. 59: 109-119.
- [23] Paladini, F. and Pollini M., 2019, Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing application: progress and future trends, Materials. 12(16): 2540.
- [24] Novientri, G., Abbas G.H. and Budianto E., 2019, Nanocomposite hydrogel-based biopolymer modified with silver nanoparticles as an antibacterial material for wound treatment, J. Appl. Pharm. Sci. 9(11): 001-009.